

Respuestas ecofisiológicas al incremento de la temperatura durante la fase de acumulación de aceite en árboles jóvenes de olivo (*Olea europaea*)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Andrea Miserere

Doctorado en Cs. Agropecuarias - Universidad de Buenos Aires- 2020

Lugar de trabajo: Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica de La Rioja (CRILAR-CONICET)



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

M. Cecilia Rousseaux

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)
Doctora en Cs. Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Co-director

Peter S. Searles

B.S. in Biology (University of Maryland)
Ph.D (Utah State University)

Consejero de Estudios

Edmundo L. Ploschuk

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Cs. Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Javier Enrique Gyenge

Biólogo (Universidad Nacional de Córdoba)
Doctor en Biología (Universidad Nacional del Comahue)

JURADO

Natalia Izquierdo

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Mar de Plata)
Doctora en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Mar de Plata)

JURADO

Luis Francisco Hernández

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur)
Ph.D (University of New South Wales)

Fecha de defensa de la tesis: 28 de febrero de 2020

Agradecimientos

A Ceci y Peter, mi Directora y Codirector, por confiar en mí y por ayudarme en todo momento. Su guía y apoyo fueron fundamental para poder descubrir este mundo que es la ciencia y poder realizar esta tesis. ¡Siempre agradecida con Uds!

A Edy, mi Consejero de Estudios, por tomarse con responsabilidad su papel en todo esto y estar siempre dispuesto a darme buenos consejos (incluidos los de fotosíntesis).

A Antonio, por su ayuda con el proyecto y apoyo emocional en momentos difíciles.

Al gabinete 4, los de antes y los de ahora. A Magda, por absolutamente todo, pero en especial por su amistad y por todos los consejos académicos y de vida en general. A Álvaro, Daniel, Agus, por compartir la experiencia, lo bueno y lo malo, de ser becario de CONICET en CRILAR.

A todos los técnicos y personal de CRILAR que me ayudaron con el trabajo en el campito experimental: Tonino, Charly, Topo, Juancito, Hernán, Valente. En especial a Carlitos, nuestro técnico del grupo de Ecofisiología de olivo, por ser el mejor compañero de campo.

A Gustavo Fabre de Palas Ateneas, por permitirnos usar el laboratorio de su finca, y a Fabián Terán del Vivero San Gabriel, por donarme los olivos que utilicé en el experimento.

A mis amigos, por comprender mi ausencia en esos momentos de mucho trabajo.

En especial a mi familia, la que me tocó y la que estoy construyendo. Mis padres y hermanas, por el apoyo incondicional siempre. A Juan, mi compañero de vida, por la paciencia, el apoyo y el ánimo, sobre todo en estos últimos días. ¡Gracias amor!

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución”.

Ing. Agr. Andrea Miserere

Publicaciones derivadas de la tesis

Miserere, A., Searles, P.S., Hall, A.J., García-Inza, G.P., Rousseaux, M.C., 2019. Complementary active heating methods for evaluating the responses of young olive trees to warming. *Sci. Hortic.*, 257: 108754. doi:10.1016/j.scienta.2019.108754

Miserere, A., Searles, P.S., García-Inza, G.P., Rousseaux, M.C., 2018. Elevated temperature affects vegetative growth and fruit oil concentration in olive trees (*Olea europaea*). *Acta Hortic.*, 1199: 523–528. doi:10.17660/ActaHortic.2018.1199.83

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ABREVIATURAS	xviii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULO I	
Introducción general	1
1.1 El calentamiento global y la agricultura.....	2
1.1.1 Aspectos generales: las tendencias mundiales	2
1.1.2 La producción de olivo en Argentina bajo un escenario de calentamiento global	3
1.2 Métodos para investigar el efecto de la temperatura en plantas.....	5
1.3 Impacto del calentamiento global en el olivo	9
1.3.1 Aspectos generales	9
1.3.2 Efectos del calentamiento global sobre la fotosíntesis y economía del agua en olivo.....	11
1.3.3 Efectos del incremento de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de biomasa en olivo.....	15
1.3.4 El rol de la temperatura sobre el rendimiento y la calidad del aceite de oliva.....	16
1.4 Objetivos e Hipótesis	21
1.5 Estructura de la tesis.....	28
CAPÍTULO II	
Métodos complementarios de calentamiento activo para evaluar las respuestas de olivos jóvenes al calentamiento	30
2.1 Introducción.....	31
2.2 Materiales y métodos.....	34
2.2.1. Descripción del sitio y diseño experimental	34
2.2.2 Estructura de las cámaras sin techo.....	36
2.2.3 OTCs control calentadas pasivamente	36
2.2.4 OTCs calentadas activamente	37

2.2.5 Contribución relativa del calentamiento pasivo y activo	40
2.2.6 Gradientes de temperatura dentro de las OTC	40
2.2.7 Evaluación de otras variables microclimáticas	41
2.2.8 Respuestas de crecimiento y rendimiento	42
2.2.9 Análisis estadístico	44
2.3 Resultados	44
2.3.1 Contribución del calentamiento pasivo y activo	44
2.3.2 Gradientes de temperatura.....	47
2.3.3 Evaluación de otras variables microclimáticas	48
2.3.4 Respuestas de crecimiento y rendimiento	51
2.4 Discusión	52
2.4.1 Diseño y prueba de un sistema de calefacción activo con dos métodos de calefacción complementarios.....	52
2.4.2 Evaluación de otras variable microclimáticas.....	55
2.4.3 Respuestas de crecimiento y rendimiento	56
2.5 Conclusión.....	57

CAPÍTULO III

Efectos de la temperatura elevada prolongada en el intercambio de gases en las hojas, el flujo de savia a nivel de árbol entero y los estomas en olivos jóvenes	58
3.1 Introducción.....	59
3.2 Materiales y métodos.....	63
3.2.1 Material vegetal, tratamientos de temperatura y diseño experimental	64
3.2.2 Fotosíntesis de hojas, conductancia estomática, transpiración y eficiencia en el uso del agua.....	65
3.2.3 Fluorescencia de clorofila	67
3.2.4 Flujo de savia del árbol entero	68
3.2.5 Características de los estomas y área foliar.....	69
3.2.6 Análisis estadístico.....	70
3.3 Resultados	71
3.3.1 Temperaturas diarias del aire durante las mediciones de intercambio gaseoso	71

3.3.2 Fotosíntesis de hojas, transpiración y eficiencia en el uso del agua	72
3.3.3 Fluorescencia de clorofila	75
3.3.4 Flujo de savia del árbol entero	76
3.3.5 Aclimatación térmica del intercambio de gases de la hoja	78
3.3.6 Características de los estomas y área foliar.....	81
3.4 Discusión.....	83
3.5 Conclusión.....	89

CAPÍTULO IV

Respuestas del crecimiento vegetativo y reproductivo del olivo (cvs Arbequina y Coratina) al incremento de temperatura durante la fase de síntesis y acumulación de aceite del fruto

91

4.1 Introducción.....	92
4.2 Materiales y Métodos	95
4.2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento	95
4.2.2 Tratamientos térmicos y diseño experimental.....	96
4.2.3 Producción de biomasa vegetativa y su partición a los distintos órganos	96
4.2.4 Rendimiento de aceite y sus componentes	98
4.2.5 Costo energético de la producción de biomasa y la relación biomasa vegetativa/frutos	98
4.2.6 Crecimiento de brotes vegetativos y reproductivos	99
4.2.7 Análisis estadístico.....	100
4.3 Resultados	101
4.3.1 Producción de biomasa y su partición a los distintos órganos del árbol.....	101
4.3.2 Rendimiento de aceite y sus componentes	104
4.3.3 Costo energético de la biomasa producida y relación vegetativa/reproductiva	107
4.3.4 Crecimiento de brotes vegetativos y reproductivos	109
4.4 Discusión.....	111
4.5 Conclusión.....	117

CAPÍTULO V

Respuestas de la calidad del aceite y del fruto al incremento de temperatura durante la fase de síntesis y acumulación de aceite en olivo

118

5.1	Introducción.....	119
5.2	Materiales y Métodos	124
5.2.1	Sitio experimental y material vegetal.....	125
5.2.2	Tratamientos térmicos y diseño experimental.....	125
5.2.3	Dinámica de crecimiento del fruto, de la acumulación de aceite y de la concentración de tocoferoles	126
5.2.4	Valores finales de los parámetros de la calidad de aceite	127
5.2.5	Análisis estadístico.....	130
5.3	Resultados	131
5.3.1	Temperatura del aire durante los periodos bajo tratamiento térmico	131
5.3.2	Dinámicas de crecimiento y acumulación de aceite del fruto	132
5.3.3	Características del fruto a cosecha en árboles bajo una o dos temporadas de calentamiento	136
5.3.4	Composición final de ácidos grasos en frutos de árboles bajo una o dos temporadas de calentamiento.....	138
5.3.5	Dinámica de la concentración de α - y γ -tocoferoles	141
5.3.6	Concentración y contenido final de α - y γ -tocoferoles	143
5.4	Discusión	145
5.5	Conclusión.....	152
CAPÍTULO VI		
	Discusión general.....	154
6.1	Aspectos destacados de los resultados obtenidos y aportes originales de la tesis al conocimiento científico	155
6.2	Implicancias de los resultados obtenidos sobre el sector productivo en la región en el contexto del calentamiento global	161
6.3	Validación de las hipótesis de la tesis	162
6.4	Implicancias para investigaciones futuras.....	172
BIBLIOGRAFÍA.....		176
APÉNDICES.....		192
	Apéndice I	192
	Apéndice II.....	193
	Apéndice III.....	194

Apéndice IV	195
Apéndice V	196
Apéndice VI	197
Apéndice VII	198

ÍNDICE DE CUADROS

<p>Cuadro 2.1. Promedio de temperaturas diarias (24 h), diurnas (7:30 - 19:30 h, hora solar) y nocturnas (19:30 -7:30 h, hora solar) (°C) durante trece días de verano y nueve días de otoño bajo cuatro configuraciones de cámara sin techo (OTC) y temperatura ambiente. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las configuraciones de OTC para el mismo período del día y la temporada determinadas utilizando la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Los valores son promedios \pm 1 error estándar (n = 4 OTCs).....</p>	46
<p>Cuadro 2.2. Gradientes de temperatura horizontal y vertical (°C m⁻¹) dentro de las configuraciones de OTCs seleccionadas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las configuraciones de OTCs para un gradiente de temperatura dado, determinado mediante la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Los valores son promedios \pm 1 error estándar (n = 4 OTCs).....</p>	48
<p>Cuadro 2.3. Respuestas vegetativas y reproductivas de olivos jóvenes al calentamiento en cámaras sin techo (OTCs) calentadas activamente en comparación con las OTCs control calentadas pasivamente durante el período de acumulación de aceite (1 de diciembre de 2015 a 3 de mayo de 2016). También se muestran valores para los árboles bajo las condiciones ambientales al aire libre. Se muestran los promedios \pm 1 error estándar (n = 4). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales según lo determinado mediante la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Los árboles presentaban similar tamaño (i.e., diámetro de tronco y volumen de copa) al iniciar los tratamientos y las variables de crecimiento vegetativo se evaluaron al finalizar el calentamiento.</p>	52
<p>Cuadro 3.1. Temperatura media del aire y déficit de presión de vapor de la cámara de la hoja durante las mediciones de intercambio de gases de hojas control (T0) y calentadas (T+). Todas las hojas se formaron durante el período experimental en las OTCs, con excepción de las hojas de diciembre de 2014. Se muestran los valores medios \pm 1 error estándar (n = 8). Se evaluaron las diferencias estadísticas entre los tratamiento térmicos en cada fecha de medición utilizando un ANOVA de efectos fijos. En todas las fechas se detectaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre tratamientos en ambas variables analizadas.....</p>	72
<p>Cuadro 3.2. Conductancia estomática (g_s, mmol m⁻² s⁻¹) en hojas control (T0) y calentadas (T+) de olivo cvs Arbequina y Coratina durante dos temporadas de crecimiento (2014-15, 2015-16). Las mediciones se realizaron en la tarde y la mañana en 2014-15 y en la tarde en 2015-16. Cada valor representa una media \pm 1 error estándar (n = 4). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmicos (trat.) y cultivar (cv) en cada período de medición utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; ns = no significativo). No se detectó interacción entre los factores en ninguna de las fechas de medición.</p>	75
<p>Cuadro 3.3. Fluorescencia de la clorofila en hojas control (T0) y calentadas (T+) de olivos cvs Arbequina y Coratina durante la segunda temporada (2015-16). Los valores medios \pm 1 error estándar (n = 4) se muestran para cada fecha de medición. Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) o cultivar (cv) en cada período de medición utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; ns = no significativo). No se observó interacción entre los factores.....</p>	76
<p>Cuadro 3.4. Flujo de savia diario (kg día⁻¹ m⁻²) en olivos cv Arbequina creciendo en OTCs control (T0) y calentada (T+). Los datos se registraron a intervalos de 15 minutos</p>	

durante tres días consecutivos en enero y marzo de 2016. Se muestran los valores promedios ± 1 error estándar ($n=4$) para cada tratamiento térmico.78

Cuadro 3.5. Aclimatación térmica de la tasa de fotosíntesis neta a saturación lumínica (A_{\max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la conductancia estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia de uso del agua (EUA, i.e., A_{\max}/E) en hojas control (T0) y calentadas (T+) de olivos cvs Arbequina y Coratina durante la segunda temporada (2015-16). Las hojas formadas en las OTCs T0 o T+ se midieron a 35 °C y 39 °C. Se muestran los valores medios ± 1 error estándar ($n = 4$). Las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.), cultivar (cv), temperatura de medición (temp. medición) o las interacciones entre los factores se evaluaron en cada temporada de crecimiento utilizando un ANOVA (* = significativo a $p \leq 0,05$; *ns* = no significativo). No se observó triple interacción entre los factores.79

Cuadro 3.6. Área foliar individual y características estomáticas en hojas de olivos cvs Arbequina y Coratina que se formaron bajo los tratamientos control (T0) y calentado (T+) en dos temporadas de crecimiento (2014-15 y 2015-16). Se muestran los valores medios ± 1 error estándar ($n = 4$). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción entre ambos factores (int.) en cada temporada de crecimiento utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo a $p \leq 0,05$; *ns* = no significativo). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).82

Cuadro 4.1. Incremento de biomasa seca por órgano y total (g) de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo dos tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron durante un periodo, desde cuaje hasta final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), en 2014-15 o 2015-16, o dos periodos consecutivos (evaluando sólo el incremento de biomasa de la segunda temporada, 2015-16). Los valores corresponden al promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) para cada cultivar y tratamiento térmico. Se indica el *p*-valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. *P*-valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).103

Cuadro 4.2. Equivalentes glucosa (g glucosa) de la biomasa total, vegetativa y de los frutos, y relación equivalentes glucosas de biomasa vegetativa / frutos de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajos los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), que se aplicaron durante un periodo, desde cuaje hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), en 2014-15 o 2015-16, o dos periodos consecutivos, (evaluando sólo el incremento de biomasa de la segunda temporada, 2015-16). La biomasa vegetativa producida antes del período de tratamiento térmico no fue tomada en cuenta para el análisis. Los valores corresponden al promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) para cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el *p*-valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. *P*-valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$), en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).108

Cuadro 5.1. Parámetros de las regresiones bilineales con mejor ajuste obtenidas para el crecimiento de fruto (g) y acumulación de aceite (%) en función de los días desde plena floración en árboles de olivos cvs Arbequina y Coratina control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron durante un periodo, desde cuaje hasta final de la fase de acumulación de aceite, en 2014-15 o 2015-16. Los valores corresponden al

promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo.134

Cuadro 5.2. Características del fruto a cosecha (en abril) en árboles control (T0) y calentados (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron durante una temporada, desde cuaje hasta final de la fase de acumulación de aceite, en 2014-15 o 2015-16, o dos temporadas consecutivas (evaluando solo los frutos de la segunda temporada, 2015-16). Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).137

Cuadro 5.3. Composición final de los principales ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en frutos de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+, 3-4 °C por encima de T0). Los tratamientos térmicos se establecieron durante el periodo de síntesis y acumulación de aceite del fruto (diciembre amayo) durante una (2014-15 o 2015-16) o dos temporadas consecutivas, evaluando sólo los frutos de la segunda. Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) para cada cultivar y tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p < 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).140

Cuadro 5.4. Concentración (mg kg aceite⁻¹; mg kg fruto⁻¹) y contenido (μg fruto⁻¹) final de α - y γ -tocoferol en frutos de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron una vez ocurrido el cuaje y durante la fase de acumulación de aceite de 2014-15 o 2015-16. Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores según lo determinado mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).144

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Diagrama conceptual describiendo las principales variables de interés evaluadas en la tesis a diferente nivel de organización (órgano, planta y cultivo) y su respuesta al incremento de la temperatura desde ocurrido el cuaje y hasta el final de la síntesis de acumulación de aceite. En rojo se indican las respuestas directas e indirectas derivadas de las hipótesis planteadas en los Objetivos Específicos 2, 3 y 4. Con signo negativo (–) se indica una respuesta de disminución (o efecto negativo) mientras que + indica incremento. El cero indica que no hay respuesta. GxT señala interacción genotipo (cultivar) x temperatura.....27
- Figura 2.1.** a) Vista general de la disposición de cámaras sin techo (OTCs). La OTC en el primer plano izquierdo es una OTC con calentamiento activo con la puerta abierta y muestra la falda del polietileno utilizada para extender las paredes laterales de la cámara hasta el nivel del suelo, el dispositivo de calentamiento del túnel de plástico (que se proyecta desde el lado izquierdo de la OTC), la apertura superior parcialmente restringida en la parte superior del OTC (i.e., techo), y la carcasa del calentador (a la derecha de la puerta). La OTC en el primer plano central es un control, y muestra la posición del tubo de entrada de aire (a la derecha de la OTC), sin falda de polietileno y con la parte superior completamente abierta. b) Interior de una OTC con calefacción activa con olivos de dos años en su interior.....35
- Figura 2.2.** Vistas frontal y superior de una cámara sin techo (OTC) control con calentamiento pasivo y con sistema de renovación de aire (a) y de una OTC con calentamiento activo con dos métodos complementarios, un túnel de plástico con piedras negras + un caloventor eléctrico (b). Las cámaras tenían una forma de prisma rectangular con una altura total de 2,0 m y una longitud y anchura de 1,5 m. El material de cubierta de la pared fue polietileno blanco translúcido con protección UV y baja transmisión infrarroja, y se unieron tiras de acetato transparente de 30 cm de ancho a la parte superior de la OTC con calentamiento activo para reducir el tamaño de la abertura superior. Las flechas muestran la posición de los ventiladores utilizados para inyectar aire en la OTC control (un ventilador) y con calentamiento activo (tres ventiladores).39
- Figura 2.3.** Dinámica diaria promedio de la temperatura del aire durante trece días de verano (a) y nueve días de otoño (b) bajo cuatro configuraciones de cámara sin techo (OTC) y temperatura ambiente. Las cuatro configuraciones de OTC fueron: 1) OTC control calentada pasivamente y sin la falda de polietileno en las paredes laterales; 2) OTC control calentada pasivamente con la falda de polietileno en las paredes laterales; 3) OTC calentada activamente sólo por el túnel de plástico; y 4) OTC calentada activamente por el túnel de plástico y un caloventor eléctrico. Los datos son promedios de 4 OTCs por configuración (n = 4). La temperatura se registró a intervalos de 15 minutos.....45
- Figura 2.4.** Diferencias de temperatura promedio diaria (24 h), diurna (7:30 - 19:30 h hora solar) y nocturna (19:30 - 7:30 h, hora solar) en verano y otoño entre las OTC con calentamiento activo con el túnel de plástico + un caloventor eléctrico y las OTCs control, con calentamiento pasivo sin la falda de polietileno en las paredes laterales. Las barras representan los promedios ± 1 error estándar (n = 4 OTCs). Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre las configuraciones de OTC para los diferentes períodos del día y las estaciones determinadas utilizando el test de Fisher LSD ($p \leq 0,05$). La línea horizontal punteada indica la diferencia objetivo entre las configuraciones.....47

Figura 2.5. Humedad absoluta (g m^{-3}) en las OTCs control con calentamiento pasivo o en las OTCs con calentamiento activo con el túnel de plástico + el caloventor eléctrico en comparación con las condiciones ambientales del aire exterior durante 2015-16. Cada punto representa la relación entre el valor registrado en una OTC T0 o T+ y el respectivo valor en el ambiente exterior ($n = 1$). Los puntos se registraron a intervalos de 30 min durante un período de cuatro días de verano. La línea de puntos representa la relación 1:1.....49

Figura 2.6. Dinámica del déficit de presión de vapor (a) y la temperatura del aire (b) en las OTCs control, calentadas pasivamente y las OTCs calentadas activamente con el túnel de plástico y el caloventor eléctrico. Las mediciones se tomaron durante seis días consecutivos de verano en febrero de 2016. El fondo gris indica la noche (19:30 - 7:30 h, hora solar) y el fondo blanco indica el día (7:30 - 19:30 h, hora solar). Los datos son promedios de 8 repeticiones por configuración de OTC ($n = 8$).....49

Figura 2.7. Concentración de CO_2 promedio (de 9:00 a 15:00 h, hora solar) en las OTCs control calentadas pasivamente y las OTCs calentadas activamente por el túnel de plástico y el caloventor eléctrico durante 2014-15 (a) y 2015-16 (b). Las mediciones se realizaron periódicamente durante el verano y el otoño de cada año. Los símbolos sólidos y vacíos indican las medidas de verano y otoño, respectivamente. Cada punto representa la relación entre valor registrado en una OTC T0 y su respectiva T+ ($n = 1$). Los valores se registraron a intervalos de 30 min. La regresión lineal de los puntos en cada temporada (líneas sólidas) no fue estadísticamente diferente ($p > 0,05$) a una función $x=y$, con pendiente = 1 y ordenada al origen = 0 (i.e., relación 1:1; líneas de puntos). Se indica además el coeficiente de determinación (r^2) para las regresiones lineales en cada temporada.50

Figura 3.1. Fotosíntesis neta de la hoja a saturación lumínica (A_{max} ; a, b), transpiración (E; c, d) y eficiencia de uso del agua (EUA; e, f) en hojas de olivo control (T0) y calentados (T+) de los cvs Arbequina (Arb) y Coratina (Cor) durante dos temporadas de crecimiento (2014-15, 2015-16). Las mediciones se realizaron en la tarde (Tar.) y/o en la mañana (Mañ.) en 2014-15 y en la tarde en 2015-16. Cada barra representa una media ± 1 error estándar ($n = 4$). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) en cada período de medición utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; ns = no significativo). La interacción entre los factores no fue significativa en ninguna de las fechas evaluadas.74

Figura 3.2. Dinámica diaria del flujo de savia en base al área foliar (a), déficit de presión de vapor (DPV; b) y temperatura del aire (c) del cv Arbequina en las OTCs control (T0) y calentadas (T+). Los datos corresponden a períodos de 3 días a fines de enero y marzo de 2016. Las líneas representan la media de cuatro repeticiones por tratamiento ($n = 4$). Los datos fueron registrados cada 15 min por un datalogger.....77

Figura 3.3. Fotosíntesis neta a saturación lumínica (A_{max}) en función de la tasa de transporte de electrones (ETR) de hojas de olivos cvs Arbequina (Arb) y Coratina (Cor) bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). En 2015-16 las hojas formadas en las OTCs T0 o T+ se midieron a 35 °C y 39 °C. Los valores corresponden a la medición de febrero de 2016. Cada punto representa una repetición para cada combinación de cultivar x tratamiento térmico x temperatura de medición ($n=4$). El ajuste independiente de cada tratamiento térmico x temperatura de medición se comparó con un ajuste global mediante una prueba F de suma de cuadrados extra. Los parámetros de ajuste de T+ y T0 a 35 °C y T+ a 39 °C no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$) por lo que un modelo lineal ($r^2 = 0,69$; $y = 0,13 * x - 2,4$) caracterizó a estas combinaciones de tratamientos, mientras T0 a 39 °C tuvo una regresión independiente ($r^2=0,70$; $y = 0,14 * x - 11,4$).....80

Figura 3.4 Densidad de estomas (a, b) y tricomas (c, d) en hojas de olivos cvs Arbequina y Coratina formadas bajo los tratamientos control (T0) y calentado (T+) en dos temporadas de crecimiento (2014-15: a y c; 2015-16: b y d). Se muestran los valores medios ± 1 error estándar ($n = 4$). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) en cada temporada de crecimiento utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; *ns* = no significativo). No se observó interacción significativa entre los factores.84

Figura 4.1. Incremento del área foliar ($m^2 \text{ árbol}^{-1}$) en árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo dos tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos se aplicaron desde cuaje hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), durante una temporada, en 2014-15 (a) y 2015-16 (b), o dos temporadas consecutivas (evaluando sólo el incremento de la segunda temporada, c). Los valores corresponden al promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) para cada cultivar y tratamiento térmico. Se indica el *p*-valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. *P*-valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$) en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo.104

Figura 4.2. Componentes del rendimiento de aceite de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), durante uno (en 2014-15: a, d, g; en 2015-16: b, e, h,) y dos periodos de calentamiento, (2015-16, evaluando sólo los frutos de la segunda temporada; c, f, i). Los tratamientos térmicos fueron aplicados desde cuaje de frutos hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo). Las barras representan el valor promedio del tratamiento térmico para cada cultivar ± 1 error estándar ($n = 4$). Se indica el *p*-valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. *P*-valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$) en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).105

Figura 4.3. Rendimiento de aceite ($g \text{ árbol}^{-1}$) de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), durante uno (2014-15: a, d, g; 2015-16: b, e, h,) o dos periodos de calentamiento, evaluando sólo la segunda temporada (2015-16: c, f, i.). Los tratamientos térmicos fueron aplicados desde cuaje de fruto hasta el final de la acumulación de aceite (diciembre a mayo). Las barras representan el valor promedio del tratamiento térmico para cada cultivar ± 1 error estándar ($n = 4$). Se indica el *p*-valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. *P*-valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$) en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).107

Figura 4.4. Longitud de brotes (principal + laterales, en cm) vegetativos (a, b, c) y reproductivos (d, e, f) de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), durante uno (en 2014-15: a, d; en 2015-16: b, e) o dos periodos de calentamiento, evaluando sólo el crecimiento del segundo periodo (2015-16: c, e). Cada periodo de calentamiento se estableció desde cuaje final de frutos hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo). Cada punto representa el valor promedio del tratamiento térmico para cada cultivar ± 1 error estándar ($n = 4$) en la fecha evaluada. Se encontraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre fechas de medición (mes del año) en todos los casos (a-f). Además, la interacción cultivar x fecha de medición fue altamente significativa ($p \leq 0,01$) en los brotes vegetativos de los árboles sometidos a un periodo de calentamiento

en la temporada 2015-16 (b). El cultivar fue significativo ($p \leq 0,05$) en los brotes reproductivos de árboles calentado durante dos periodos (f).....110

Figura 5.1. Temperatura media del aire en el interior de las OTCs control (T0) y calentada (T+), durante la primera (2014-15, a) y segunda (2015-16, b) temporada de experimento. Las OTCs fueron utilizadas en la temporada durante la fase de acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo). Cada símbolo representa el promedio ± 1 error estándar ($n = 8$) del valor medio diario del tratamiento térmico. La segunda temporada, no se registró la temperatura de las OTCs los días entre 7-17 de febrero y 1-3 de mayo, debido a un problema en el almacenador de datos, pero los sistemas de calentamiento y ventilación estuvieron funcionando. También, se indican los valores de la temperatura del aire fuera de las cámaras (Amb) con una línea de puntos y las fechas de endurecimiento de carozo para cada cultivar (flechas negras) y de muestreos de frutos dentro de las OTCs (cosechas parciales, flechas vacías; y cosecha final, flechas rayadas).132

Figura 5.2. Dinámica de la evolución del peso seco del fruto (g) en función de los días desde plena floración en olivos cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+, 3-4 °C por encima de T0). Los tratamientos se aplicaron luego del cuaje final, durante toda la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), en 2014-15 (a y c) o 2015-16 (b y d). El momento de endurecimiento de carozo (EC) en cada temporada y para cada cultivar se indica con una flecha. Cada punto representa el promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento. Se muestra la regresión bilineal con el mejor ajuste para cada caso.133

Figura 5.3. Dinámica de la acumulación de aceite (% BS) en frutos de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos se aplicaron en árboles enteros en la fase de acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo) durante una temporada (2014-15, a y c; 2015-16, b y d). Cada símbolo representa el promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. El momento de endurecimiento de carozo (EC) se indica con una flecha negra. Para cada cultivar x tratamiento térmico se indica el mejor ajuste bilineal.135

Figura 5.4. Dinámica de la concentración en aceite de los principales tocoferoles (α y γ) en función de los DDPF en frutos de olivo cvs Arbequina (a-e) y Coratina (f-h). Los árboles de olivo estuvieron bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+) una vez ocurrido el cuaje y durante toda la fase de acumulación de aceite del fruto (diciembre-mayo) en 2014-15 (a, c, e, g) o 2015-16 (b, d, f, h). Cada punto representa el promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. El momento de endurecimiento de carozo (EC) se indica con una flecha. Se indica además la regresión lineal o bilineal con mejor ajuste (r^2) y el valor de la pendiente (x , en $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$).142

Figura 6.1 Diagrama conceptual describiendo las principales variables de interés evaluadas en la tesis a diferente nivel de organización (órgano, planta y cultivo) y su respuesta al incremento de la temperatura desde ocurrido el cuaje y hasta el final de la síntesis de acumulación de aceite. En rojo se indican las respuestas directas e indirectas. Con signo negativo (-) se indica una respuesta de disminución (o efecto negativo) mientras que + indica incremento. El cero indica que no hay respuesta. GxT señala interacción genotipo (cultivar) x temperatura. El signo ? acompañado de signo + o - señala posibles efectos (de incremento o disminución, respectivamente) no concluyentes a partir de los resultados de esta tesis.....169

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AF	Área foliar
A_{\max}	Tasa de fotosíntesis neta a saturación lumínica
AST	Área seccional del tronco
C_v	cultivar
DDPF	Días desde plena floración
DPV	Déficit de presión de vapor de agua
E	Tasa de transpiración foliar
EC	Endurecimiento de carozo
EG	Equivalentes glucosa
E_{T0}	Evapotranspiración de referencia
ETR	Tasa de transporte de electrones
EUA	Eficiencia del uso del agua
g_s	Conductancia estomática
GEI	Gases de efecto invernadero
IM	Índice de Madurez
MFE	Masa foliar específica
NPQ	Quenching no fotoquímico
OTC	Cámara sin techo
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
T	Tasa de transpiración foliar
T0	Tratamiento control
T+	Tratamiento calentado, a 3-4 °C por encima de T+
PPFD	Flujo de fotones fotosintéticos
PPFDabs	Fracción de PPFD absorbido
F_v / F_m	Rendimiento cuántico máximo de PSII
F_v' / F_m'	Eficiencia intrínseca de PSII
% BS	% en base seca
Φ_{PSII}	Rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II
[CO ₂]	Concentración de dióxido de carbono

RESUMEN

Respuestas ecofisiológicas al incremento de la temperatura durante la fase de acumulación de aceite en árboles jóvenes de olivo (*Olea europaea*)

Los efectos de la temperatura elevada sobre la ecofisiología y producción del olivo han sido escasamente estudiados y más aún a partir de experimentos manipulativos a nivel de árbol entero. El calentamiento global y la expansión del cultivo a nuevas regiones han despertado el interés por abordar estas temáticas. En este sentido, el objetivo de la tesis fue analizar las respuestas de la fotosíntesis y transpiración, la producción y partición de biomasa, y el rendimiento del aceite y su calidad, a incrementos de la temperatura durante la fase de acumulación de aceite en dos cultivares de olivo. Para ello se diseñó un sistema con cámaras sin techo con o sin calentamiento activo para establecer los tratamientos térmicos calentado (3-4 °C) y control, respectivamente. Los olivos, cvs Arbequina y Coratina, fueron calentados desde cuaje final a cosecha de frutos (5 meses) durante una o dos temporadas. Luego de una temporada, la fotosíntesis neta no cambió por el incremento de 3-4 °C pero la transpiración de la hoja aumentó. Aunque la producción de biomasa total por árbol fue similar entre tratamientos, los árboles calentados tuvieron menor peso seco y % de aceite por fruto que los controles. Como consecuencia, el rendimiento de aceite se redujo en los árboles calentados y hubo una mayor partición de la glucosa producida hacia órganos vegetativos que en los controles, que incluyó mayor área foliar por árbol. En contraste, luego de dos temporadas, además del efecto sobre el rendimiento, el calentamiento redujo la biomasa total producida. En relación a la calidad del aceite, el % de ácido oleico disminuyó con la temperatura, en especial en cv

Arbequina, mientras que la concentración de α -tocoferoles en el aceite aumentó. Como consecuencia del calentamiento global el rendimiento del olivo y la calidad de su aceite podrían verse reducidos, mientras que los requerimientos hídricos del cultivo podrían aumentar por mayor área foliar y demanda atmosférica.

Palabras claves: calentamiento activo, cv Arbequina, cv Coratina, fotosíntesis neta, transpiración, producción de biomasa, rendimiento de aceite, concentración de aceite, ácido oleico, α -tocoferol.

ABSTRACT

Ecophysiological responses to the increase in temperature during the oil accumulation phase in young olive trees (*Olea europaea*).

The effects of elevated temperature on olive tree ecophysiology and production have been poorly studied, especially in terms of manipulative experiments at the whole tree level. Global warming and crop expansion to new regions have led to interest in addressing these issues. Thus, the objective of this thesis was to analyze the responses of photosynthesis and transpiration, the production and partition of biomass, and the yield of the oil and its quality to temperature increases during the oil accumulation phase in two olive tree cultivars. A system with open top chambers with or without active heating was designed to establish the heated (3-4 °C) and control treatments, respectively. Olive trees, cvs Arbequina and Coratina, were heated from final fruit set to harvest (5 months) for one or two seasons. After one season, net photosynthesis did not change due to the increase of 3-4 °C, but leaf transpiration increased. Although total biomass production per tree was similar between the treatments, the heated trees had lower dry weight and oil % per fruit than the control. As a consequence, oil yield in the heated trees was reduced and there was a greater partition of the glucose produced towards vegetative organs than in the control, which included greater leaf area per tree. In contrast, after two seasons, as well as the effect on oil yield, heating reduced the total biomass produced. In relation to oil quality, oleic acid % decreased with increasing temperature, especially in cv Arbequina, while the α -tocopherols concentration in oil increased. As a consequence of global warming, olive tree yield and its oil quality could be reduced, while crop water requirements could increase due to greater leaf area and atmospheric demand.

Keywords: active heating, cv Arbequina, cv Coratina, net photosynthesis, transpiration, biomass production, oil yield, oil concentration, oleic acid, α -tocopherol.

Introducción general

1.1 El calentamiento global y la agricultura

1.1.1 Aspectos generales: las tendencias mundiales

El actual calentamiento del sistema climático se evidencia en los aumentos observados de la temperatura promedio mundial del aire y de los océanos, el derretimiento generalizado de la nieve y hielo y el aumento del nivel medio del mar, en los últimos años (IPCC, 2014). El calentamiento se produce por alteraciones en el balance energético del sistema climático, originadas principalmente por el incremento de las concentraciones de los gases de efecto invernadero (GEI) por causas antrópicas, fundamentalmente a partir de 1975. El reporte del IPCC (2007) predice que las emisiones de CO₂ antropógeno, tanto pasadas como futuras, seguirán coadyuvando al calentamiento y al aumento de nivel del mar durante más de un milenio, debido a las escalas de tiempo necesarias para extraer ese gas de la atmósfera. Por esto, se espera que el calentamiento siga en aumento y que durante el corriente siglo experimentemos diversos cambios en el sistema climático, posiblemente mayores a los observados el pasado siglo XX.

Está ampliamente aceptado que la temperatura es la variable más afectada por el cambio climático y sus variaciones son, en cierta medida, las más fáciles de predecir (Jarvis et al., 2010). A nivel global, la temperatura del aire aumentó cerca de 1 °C con respecto a la era preindustrial y se espera que, de continuar la tasa actual de calentamiento, en 2040 el incremento alcance los 1,5 °C (IPCC, 2018) y para finales de siglo entre 1,1°C y 6,4 °C, en los escenarios más contrastantes de GEI (IPCC, 2014). Además, el calentamiento continuará mostrando una variabilidad interanual y decenal y no será uniforme entre las regiones. Se predice, también, que los eventos meteorológicos extremos, como sequías, aumentarán de frecuencia e intensidad. Por otro lado, el IPCC (IPCC, 2007; 2014) identificó a la agricultura como un sector crítico y destacó el impacto que tendrá el incremento de la temperatura sobre la productividad en las distintas regiones

del mundo. A nivel mundial, el potencial de producción alimentaria será altamente afectado si se producen aumentos en la temperatura por encima de los 2 °C (IPCC, 2007; 2014; Brown y Funk, 2008; Lobell et al., 2008).

La temperatura es uno de los factores más importantes que regula el crecimiento y desarrollo de la planta (e.g., Grace, 1987; Semenov y Porter, 1995; Porter y Gawith, 1999; Kozłowski y Pallardy, 2002; Gray y Brady, 2016) y afecta la mayoría de los procesos involucrados en la determinación del rendimiento, por lo que su efecto sobre el rendimiento final es complejo y difícil de predecir. El impacto del pronosticado aumento de las temperaturas sobre los cultivos puede variar ampliamente entre especies y regiones geográficas. Conocer cómo diferentes especies podrían ser afectadas, a nivel de planta y cultivo es, por lo tanto, de suma importancia para poder optimizar las estrategias de manejo, elegir los genotipos más convenientes para cada región, determinar las mejores zonas de producción, entre otras cuestiones. En general, los estudios sobre el tema no han sido suficientes y se han enfocado principalmente en cultivos de cereales y semillas oleaginosas de regiones frías de latitudes medias a altas del hemisferio norte, donde se estima que el incremento de la temperatura sumado al aumento de la concentración del CO₂, tendría un efecto beneficioso (IPCC, 2007). Poco se ha estudiado sobre el impacto en otras especies, sobre todo leñosas (e.g. en vid, Sadras y Soar, 2009) y en regiones más cálidas y áridas, donde la temperatura tiene un efecto más limitante sobre la producción y se cree que su incremento afectará negativamente la agricultura (e.g., en olivo, Ponti et al., 2014; en almendro, olivo y duraznero, El Yaacoubi et al., 2014).

1.1.2 La producción de olivo en Argentina bajo un escenario de calentamiento global

En Argentina las tendencias térmicas en relación al calentamiento global son similares a las observadas en el resto del mundo. En la provincia de La Rioja, desde 1962 al 2013 se registró un aumento de la temperatura media del aire de 0,4 °C y modelos predicen aumentos aún a tasas mayores para los próximos 50 años. A su vez, los incrementos fueron más acentuados en la primavera (1,07 °C, para el mismo periodo de análisis) y el verano (0,51 °C) que en el invierno y el otoño, siendo el incremento de la temperatura nocturna del verano, mayor que la diurna (R. De Ruyver, INTA-Castellar, comunicación personal). La provincia se encuentra dentro de la región del país que presenta los mayores riesgos por el cambio climático debido a que se pronostican los mayores incrementos de temperatura y se esperan condiciones de mayor aridez (i.e., mayor temperatura y déficit de presión de vapor, DPV) (Penalba y Rivera, 2013; SADS, 2015; Zaninelli et al., 2019). La región no sólo está muy alejada del mar, sino que sus características continentales se ven agudizadas por estar encerrada entre las Sierras Pampeanas (por el este), por los Andes (al oeste) y por la Puna (al norte), lo que aumenta su aislamiento de las masas de aire provenientes del mar y genera una compleja gama de características climáticas. Sin embargo, debido a esta compleja orografía existen incertidumbres en las predicciones futuras respecto al transporte de humedad y la precipitación (Penalba y Rivera, 2013).

El olivo es una de las especies frutales más cultivadas mundialmente en agroecosistemas de zonas áridas y semi-áridas. En esta dirección, es una de las especies de árboles frutales de mayor importancia en Argentina, cultivándose principalmente en Cuyo (Mendoza, San Juan) y el Chaco Árido (La Rioja y Catamarca) (Gómez-del-Campo et al., 2010; Searles et al., 2011). En esta última región, donde la temperatura media anual es elevada (20-21 °C), la precipitación escasa (100-400 mm) y la humedad relativa es baja (40-60 %), el cultivo adquiere relevancia económica y crece bajo condiciones climáticas

que difieren marcadamente de aquellas del Mediterráneo, donde la mayoría de los cultivares fueron originados (Rousseaux et al., 2008), generando características particulares en el crecimiento vegetativo y la producción de aceite (Correa-Tedesco et al., 2010; Rondanini et al., 2014). Sin embargo, las variables climáticas (e.g., temperatura, precipitación y altitud) que podrían estar asociadas con estas respuestas no fueron bien estudiadas. Bajo el escenario del calentamiento global, los actuales sistemas productivos olivícolas en Argentina podrían verse severamente afectados. En esta región la temperatura juega un papel limitante importante para la producción agrícola, por la ocurrencia de temperaturas supra-óptimas para el desarrollo de los cultivos. En este sentido, se estima que el efecto del incremento de la temperatura en cultivos de zonas áridas y semi-áridas de latitudes bajas del hemisferio sur, será negativo para la producción agrícola.

1.2 Métodos para investigar el efecto de la temperatura en plantas

En los últimos años debido al calentamiento global hubo un aumento en el interés por estudiar los efectos de la temperatura en la producción agrícola. Hasta la fecha, los estudios sobre el tema se realizaron principalmente de manera indirecta mediante correlaciones basadas en información obtenida a partir de variaciones de la temperatura procedentes de variabilidad espacio-temporal. A pesar de basarse en el uso de herramientas estadísticas sofisticadas, el uso de correlaciones no permite ser muy concluyentes sobre el efecto de la temperatura en la planta porque muchas veces confunden sus efectos con los de otros factores (como tipo de suelo, manejo del cultivo, altitud, precipitación, radiación, déficit de presión de vapor). De todas maneras, son una herramienta útil para dilucidar las tendencias en ambientes contrastantes (Bonada y Sadras, 2015). Resultados inequívocos requieren métodos directos que implican la

manipulación experimental de la temperatura en invernaderos, en cámaras de crecimiento o en condiciones de campo, con cámaras abiertas o cerradas. Aunque estos métodos directos tampoco están exentos de errores.

Los sistemas de calentamiento a campo incluyen estructuras con distinto grado de cerramiento (i.e., desde mayormente abiertos a completamente cerrados). Los sistemas abiertos que usan calentadores infrarrojos espaciados en un anillo hexagonal tienen la ventaja de que los factores microclimáticos como la circulación del aire no se ven afectados, pero obtener aumentos significativos de temperatura puede ser un desafío en condiciones de viento (Kimball et al., 2018). Los sistemas cerrados con cámaras portátiles han permitido elevar la temperatura que rodea a toda la planta (Cicchino et al., 2010; Rattalino Edreira et al., 2011) o calentar partes de plantas (Petrie y Cliengeleffer, 2005), mediante el uso de dispositivos adecuados. Los principales inconvenientes de estos sistemas son compartidos con las cámaras de crecimiento y los invernaderos, como por ejemplo el enriquecimiento de CO₂ de la atmósfera si no se garantiza un correcto intercambio gaseoso con el ambiente exterior. Además, el material usado para la cubierta puede reducir la intensidad de la radiación y cambiar la composición espectral. Por otro lado, la velocidad del aire se reduce en la cámara alterando la capa límite y el balance energético de la planta; la pobre disipación de calor en condiciones más calmas puede causar un excesivo calentamiento de los tejidos vegetales. Debido a la estrecha relación entre temperatura y humedad, se altera el DPV, un indicador preciso de la capacidad evaporativa del aire. Conjuntamente, condiciones de bajo DPV y turbulencia atmosférica reducida en la cámara pueden alterar el intercambio gaseoso y la asimilación de CO₂, confundiendo así los efectos térmicos. Estos inconvenientes pueden ser superados si son incorporados complejos sistemas de control de temperatura, DPV y ventilación (Barton

et al., 2010). Sin embargo estos sistemas encarecen el uso de las estructuras completamente cerradas por sus elevados costos de fabricación y funcionamiento.

Los sistemas abiertos, como las cámaras sin techo (OTC) se usan frecuentemente en estudios en ecosistemas de campo abierto o forestales de latitudes altas (e.g., árticos y antárticos) (e.g., Danby y Hik, 2007; De Frenne et al., 2010). En general, este sistema se utilizó sobre comunidades de bajo porte y calentando de manera pasiva, sin control directo sobre el flujo de energía, basándose principalmente en la captura de energía solar gracias al material de cubierta (Marion et al., 1997). Esto no permite tener un adecuado control sobre la marcha diaria de la temperatura, el viento, el intercambio gaseoso y la humedad relativa dentro de la OTC. Además, las temperaturas nocturnas dentro de las OTC, bajo estas condiciones, pueden ser menores que las del exterior, debido al fenómeno de inversión térmica (Wada et al., 1998). La OTC con calentamiento pasivo, por otro lado, obliga a usar el ambiente exterior como control.

Bien diseñados, los sistemas OTC podrían ser utilizados para calentar árboles jóvenes de olivo y otros frutales sin modificar otras variables, como concentración de CO₂ y otros gases, si adicionalmente se incorpora un sistema de ventilación que garantice el intercambio de aire con el ambiente externo. Paralelamente al calentamiento pasivo, el calentamiento activo a través de artefactos adecuados permitiría lograr aumentos de temperatura cercanos a 4 °C sostenidos a lo largo del día, consiguiendo el seguimiento diario y de los ciclos estacionales de la temperatura y el mantenimiento de la humedad (por lo tanto permite incrementos en DPV). Los sistemas OTC tienen efectos biológicos secundarios mínimos, tales como la interacción de radiación y temperatura y una escala tal que permite un diseño experimental apropiado y toma de muestras (Bonada y Sadras, 2015). Por otro lado, los efectos secundarios potenciales de las OTCs incluyen el secado del suelo, los cambios en la distribución de las precipitaciones y la alteración de la capa

límite del cultivo (Marion et al., 1997; Sadras et al., 2012a). A pesar de sus posibilidades, las OTCs no han sido muy empleadas en frutales por lo que se necesitaría realizar evaluaciones más profundas sobre su desempeño e idoneidad en plantas de mayor tamaño (mayor volumen de aire a calentar).

Los pocos estudios manipulativos de la temperatura realizados en especies frutales leñosas muestran fallas en el diseño, ya que utilizan cámaras con techo y laterales de polietileno sólo en el caso de las tratamientos calentados, no contando con un control adecuado (e.g., Sadras et al., 2012a; Vuletin Selak et al., 2013; Benlloch-González, 2018; 2019). Además no compararon otras variables ambientales que pueden confundir o enmascarar el efecto de la temperatura, como la concentración atmosférica de CO₂. Por otro lado, al calentar solo de manera pasiva, no lograron mantener la diferencia de temperatura a lo largo del día, permaneciendo la temperatura nocturna dentro de las cámaras calentadas igual o más baja a la temperatura del exterior, usado como control. Este último punto es particularmente importante porque se ha demostrado que, tanto en olivo (García-Inza et al., 2016) como en otros cultivos (e.g., en girasol, Izquierdo et al., 2002) no todas las temperaturas a lo largo del día tienen el mismo efecto en determinados procesos de la planta, por ejemplo, en la determinación de la calidad de aceite. En otros trabajos publicados, utilizando cámaras con calentamiento activo en plantas enteras, no lograron aumentos sustanciales de temperatura (e.g., en vid, Sadras et al., 2012b), lo que no permitió ver respuestas claras al incremento de la temperatura. Posteriormente, en olivo, García-Inza et al. (2014), calentando ramas fructíferas a campo establecieron que una función lineal decreciente explicaba las respuestas de la concentración de aceite y la composición de ácidos grasos a la temperatura. Sin embargo, el tamaño reducido de las unidades experimentales impidió analizar otras respuestas a la temperatura del árbol de olivo. Recientemente, Benlloch-González (2018; 2019) usó OTCs con calentamiento

activo a través de un método con resistencias eléctricas para calentar árboles enteros de olivo durante toda la temporada y, al igual que Vuletin Selak et al. (2013), árboles creciendo en el ambiente exterior como control.

1.3 Impacto del calentamiento global en el olivo

1.3.1 Aspectos generales

Es esperable que la temperatura afecte muchos aspectos de la biología del olivo, como su tasa de desarrollo, fotosíntesis y respiración, la tasa de producción de las subunidades (hojas, tallos, raíces), senescencia y mortalidad, entre otros (e.g., Bongi y Long, 1987; Díaz-Espejo et al., 2006; Pérez-López et al., 2008; Benllock-González et al., 2016). Además, algunos estudios correlativos (espaciales y/ o temporales) sugieren que podría modular la producción y calidad de aceite (Ceci y Carelli, 2010; Rondanini et al., 2011; Orlandi et al., 2012; Rondanini et al., 2014). Sin embargo, la respuesta del olivo a la temperatura ha sido un tema escasamente desarrollado, encontrándose muy pocos estudios manipulativos publicados que demuestren el rol directo de la temperatura en estos aspectos de su biología y en la producción de aceite de oliva. En los últimos años, las publicaciones sobre repuestas del olivo a la temperatura se concentraron principalmente en aspectos relacionados a la fenología de la floración (Vuletin Selak et al., 2013; Aybar et al., 2015), y determinación de temperatura base de crecimiento vegetativo y reproductivo (Pérez-López et al., 2008). Manipulando la temperatura en porciones de ramas fructíferas de olivo, García-Inza et al. (2014) demostraron que incrementos de temperatura durante el periodo de síntesis y acumulación de aceite resultan negativos para la producción y calidad del mismo, pero estudios manipulativos

calentando plantas enteras permitirán un entendimiento más profundo sobre los procesos involucrados en ésta y otras posibles respuestas ecofisiológicas.

Por otro lado, el calentamiento global podría alterar la distribución geográfica y abundancia del olivo como señalan algunos trabajos basados en modelos de simulación y series climáticas de regiones del hemisferio norte, como la Cuenca del Mediterráneo, África del Norte, Medio Oriente y California. Estos trabajos destacan que en las zonas más cálidas y desérticas evaluadas, como el sur de California (Gutierrez et al., 2009) y el Medio Oriente (Ponti et al., 2014), la producción olivícola podría verse restringida por las altas temperaturas, obligándola a desplazarse progresivamente hacia zonas más nórdicas (y frías). Estos modelos se basan principalmente en los requerimientos de horas de frío para floración y así establecen fechas de floración y zonas productivas. Sin embargo, la temperatura del invierno es la que más estable ha permanecido los últimos años, y se espera que los mayores incrementos térmicos ocurran en primavera-verano. Además, estos modelos consideran umbrales térmicos óptimos de desarrollo y producción del olivo (considerando principalmente las tasa de fotosíntesis y respiración) pero no brindan información concreta de cómo responde el olivo al incremento de la temperatura. En el hemisferio sur, la información disponible sobre el efecto del calentamiento global y la distribución de las especies es más limitada, y se desconoce qué podría pasar en este sentido, con la producción olivícola.

Paralelamente, se desarrollaron modelos de simulación para predecir el impacto de las condiciones ambientales, incluidas condiciones de temperatura creciente, y prácticas agronómicas sobre distintos aspectos del rendimiento del olivar (Tanasijevic et al., 2014; Morales et al., 2016; López-Bernal et al., 2018; Lorite et al., 2018). Muchos de estos modelos contienen componentes de economía de carbono o de uso del agua. Sin embargo, como los autores de estos trabajos señalan, experimentos manipulativos de la

temperatura en el campo son necesarios para proporcionar información mecanística para mejorar los modelos existentes y poder identificar estrategias de adaptación para la producción de olivos en diferentes escenarios de cambio climático.

1.3.2 Efectos del calentamiento global sobre la fotosíntesis y economía del agua en olivo

La asimilación neta de carbono es afectada por la temperatura como consecuencia de su efecto sobre la duración de la estación de crecimiento y sobre el intercambio neto de carbono (INC). Esta última, de acuerdo a Lin et al. (2012) es un elemento central de la respuesta de las plantas al calentamiento global. La temperatura actúa tanto a nivel de la bioquímica fotosintética, de la respiración y de la sensibilidad estomática, por lo que cada uno de estos procesos debe ser cuantificado para predecir la respuesta de la fotosíntesis al incremento de la temperatura.

En general, se ha sugerido que las temperaturas más altas reducen la ganancia neta de carbono mediante el aumento de la respiración de la planta (DeMatta et al., 2010). En ese sentido, Bonghi y Long (1987), observaron en el laboratorio que en olivo la tasa fotosintética a saturación lumínica es máxima con temperaturas de hoja entre los 15-32 °C, mientras que Díaz-Espejo et al. (2006), en experimentos a campo, reportaron la máxima tasa con temperaturas de hoja de 35 °C. Estudios de olas de calor a corto plazo (i.e., uno o más días de aumentos repentinos de temperatura alrededor de 10 °C) también indican que temperaturas superiores a 35 °C reducen significativamente la conductancia estomática y la fotosíntesis neta (Koubouris et al., 2015; Haworth et al., 2018). Por otro lado, Bonghi et al. (1987), encontraron diferente grado de dependencia térmica de la fotosíntesis según el genotipo evaluado. Así, olivos de zonas más frías o medianamente cálidas como cv Coratina, tuvieron una disminución más marcada (del 50 %) de la

fotosíntesis entre la temperatura óptima y los 40 °C en comparación a cultivares de zonas cálidas como cv Manzanilla, que a esa misma temperatura mantenía el 80 % de su fotosíntesis a máxima tasa. Así, podría esperarse que incrementos en la temperatura que impliquen una alta tasa de ocurrencia de eventos de temperaturas mayores a 32-35 °C generen una menor producción de biomasa debido a una menor fotosíntesis y mayor respiración, aunque la intensidad de la respuesta podría estar condicionada por el genotipo. Sin embargo, ninguno de estos supuestos ha sido probado bajo condiciones de campo y existen incertidumbres acerca de las posibles compensaciones entre los efectos de la temperatura sobre la fotosíntesis neta.

Los resultados arriba mencionados se basan en respuestas instantáneas de la fotosíntesis al incremento de la temperatura sin considerar mecanismos de adaptación fisiológica que podrían ocurrir al aumentar la temperatura de crecimiento de manera prolongada. La mayoría de las plantas, sobre todo perennes leñosas que experimentan un aumento en las temperaturas de la temporada de crecimiento a lo largo de su vida, muestran una capacidad considerable para ajustar sus características fotosintéticas a sus temperaturas de crecimiento (temperatura de aclimatación) (Berry y Björkman, 1980; Yamori et al., 2013; Vico et al., 2019). Sin embargo en olivo, como en otros frutales de interés, las respuestas de aclimatación no han sido evaluadas hasta la fecha por lo que se desconoce si algún tipo de aclimatación fisiológica puede ocurrir ante un escenario de calentamiento global.

Por otro parte, los estomas juegan un importante rol en la fijación de carbono al regular el intercambio gaseoso, además de cumplir otras funciones fisiológicas de importancia, como la modulación térmica del canopeo y la prevención del embolismo. La conductancia estomática depende tanto del grado de apertura del poro como de la densidad y tamaño de los estomas. Mientras que el grado de apertura del poro se ajusta

reversiblemente en respuesta al medio ambiente (interno y externo) actual de la planta (Aphalo y Jarvis, 1991; Damour et al., 2010), la densidad y el tamaño de los estomas responden a las condiciones ambientales (Bosabalidis y Kofidis, 2002) durante el desarrollo foliar y son invariantes después que la hoja queda completamente expandida. En vides bien regadas y expuestas a breves periodos de alta temperatura en el campo, Sadras y Soar (2009) observaron que la conductancia estomática y el enfriamiento evaporativo aumentaron a expensas de la eficiencia en el uso del agua. Además, Sadras et al. (2012b) concluyeron que esta mayor conductancia en hojas de plantas calentadas se debía a un mayor tamaño de estomas (i.e., estomas más largos y anchos). En olivo, ante situaciones ambientales estresantes como sequía, la densidad de estomas (y tricomas) responden de manera diferente según el cultivar analizado, evidenciando una posible dependencia genotípica (Bosabalidis y Kofidis, 2002; Ennajeh et al., 2010). Sin embargo, ante condiciones de árboles bien regados, podría esperarse una respuesta común entre cultivares que favorezca la pérdida de agua para mantener la refrigeración de la hoja y la tasa de fotosíntesis. En olivo, la conductancia estomática es uno de los principales controles sobre la tasa fotosintética (Tognetti et al., 2004) y es altamente dependiente del déficit de presión de vapor (DPV), produciéndose un cierre estomático cuando el mismo supera los 3 kPa (Fernández et al., 1997; Rousseaux et al., 2008). Como una de las consecuencias del aumento de la temperatura es el aumento DPV podría esperarse que, bajo estas condiciones, en ambientes cálidos los estomas se cierren y como consecuencia alcancen un menor INC.

Por un efecto indirecto del calentamiento global puede producirse el aumento de la demanda de agua de la planta debido a un aumento de la transpiración a temperaturas más altas, lo que potencialmente podría reducir la producción (Asseng et al., 2009; Peng et al., 2004). En el NOA, actualmente el sector agrícola extrae anualmente mucha más

agua para el riego del cultivo de la que se repone, considerando la baja precipitación anual de la zona y los altos valores de evapotranspiración (ET_o, 1400-1700 mm). En los próximos años, este problema podría acentuarse debido a las implicancias del cambio climático (Penalba y Rivera, 2013; Zaninelli et al., 2019). Si una región se vuelve más seca y caliente, la disminución en la disponibilidad de agua (por la disminución de la precipitación), será exacerbada por un aumento de la demanda de agua, expresada como evapotranspiración de referencia (ET_o) (Döll, 2002; Moratíel et al., 2011, Tanasijevic et al., 2014). Se espera que la ET_o aumente directamente con el aumento de temperatura y debido a los cambios en la radiación neta (aumento de la radiación de onda larga por efecto de los GEI y disminución de la radiación de onda corta por aumento de la nubosidad) (Tanasijevic et al., 2014). Esta menor disponibilidad de agua en el suelo y aumento de la ET_o podrían generar que las necesidades netas de riego del cultivo aumenten.

Evaluar el flujo de savia es una buena medida para estimar la transpiración del árbol, y con ello el uso de agua de todo el cultivo (Rousseaux et al., 2009). El flujo de savia por unidad de área foliar depende en gran medida de la conductividad hidráulica y la conductancia estomática, por lo que podría ser afectado por la temperatura, al actuar sobre el DPV y la demanda de agua de la planta, como fuera mencionado anteriormente. En árboles jóvenes de olivo, Tognetti et al. (2004) encontraron una buena correlación entre el flujo de savia y el DPV. También Rousseaux et al. (2009) hallaron una respuesta curvilínea entre flujo de savia y DPV para árboles de mayor porte. En este escenario de aumento global de la temperatura y necesidad de un uso racional del agua de riego, estudiar la respuesta de la fotosíntesis, conductancia foliar, y el flujo de savia, ayudará a comprender el rol de la temperatura sobre el consumo de agua y la eficiencia en su uso por parte del cultivo.

1.3.3 Efectos del incremento de la temperatura sobre el crecimiento y la producción de biomasa en olivo

El crecimiento vegetativo aéreo del olivo, incluyendo el incremento en el diámetro del tronco, elongación de ramas, y aumento en la volumen de copa ocurre principalmente en primavera conjuntamente con el aumento de temperatura al fin del invierno (Ferreyra et al., 2001). Como la floración también ocurre tempranamente en la estación, el crecimiento vegetativo y el reproductivo ocurren en simultáneo por varios meses durante la temporada, lo que puede conducir a la competencia por los recursos entre los órganos de la planta. El crecimiento vegetativo se reduce con el cuajado de frutos, porque los frutos son el destino prioritario de los fotoasimilados, principalmente en años de alta carga (e.g., Fernández et al., 2015). Sin embargo, un segundo flujo de crecimiento vegetativo puede ocurrir en el otoño con aportes hídricos de riego o precipitación (Rallo et al., 1994).

En La Rioja y Catamarca el nivel de crecimiento vegetativo observado en los olivos es alto y los árboles forman setos (i.e., filas continuas de vegetación) de gran tamaño debido a la combinación de clima cálido y prácticas de manejo (e.g., riego y poda) (Gómez-del-Campo et al., 2010). Este crecimiento vegetativo excesivo genera reducciones en la radiación fotosintéticamente activa en el interior del seto que limita el desarrollo de los frutos y la acumulación de aceite (Cherbiy-Hoffmann et al., 2012), e implica grandes gastos de podas anuales. Además, es probable que estos altos niveles de crecimiento reduzcan la vida útil de las fincas, como ocurre en otros frutales (Chalmers et al., 1981). Sería esperable que con los pronosticados aumentos de temperatura estos problemas de excesivo vigor se vean exacerbados. El crecimiento vegetativo es claramente dependiente de la temperatura, al estar implicada en la división, expansión y

diferenciación celular, además de modular la fotosíntesis, modificando el intercambio de carbono neto.

La temperatura también afecta la partición de carbono, modificando la relación fuente/destino. Por ejemplo, en maíz el estrés térmico se asoció con una disminución de la partición al grano y este efecto varió entre genotipos tropicales y templados (Rattalino Edreira et al., 2011). En la mayoría de los frutales perennes, la simultaneidad del crecimiento vegetativo y reproductivo puede originar competencia entre ambos por los recursos disponibles si éstos no son suficientes para mantener la tasa potencial de crecimiento (e.g., Grossman y DeJong, 1995). Por eso, se podría esperar que ante temperaturas muy elevadas, la fotosíntesis disminuya y, ante reducciones en el intercambio de carbono neto que limiten los carbohidratos disponibles, la partición de carbono se vea modificada. Sadras y Moran (2013) encontraron en vid que con aumentos en la temperatura aumenta la relación rendimiento de frutos-peso de poda (en kg kg^{-1}). Esto se debe a que, si bien el peso por rama aumentó y con ello el peso de la poda, también lo hizo, y en mayor proporción, el peso de los frutos. Paralelamente observaron una reducción en la concentración de almidón en el tronco (i.e., carbohidratos de reserva), siendo tanto la relación fuente/destino, como la concentración de almidón en tronco dos elementos importantes en el balance de carbono. En olivo, no hay información del efecto de temperatura sobre la partición de biomasa, aunque hay algunas estimaciones generales sobre partición a distintos órganos (e.g., Villalobos et al., 2006; Searles et al., 2009).

1.3.4 El rol de la temperatura sobre el rendimiento y la calidad del aceite de oliva

Las regiones de cultivo de olivo de todo el mundo utilizan cultivares de la Cuenca mediterránea, pero se observó que el rendimiento y calidad del aceite de oliva obtenido en algunos de estos lugares muchas veces difieren marcadamente del obtenido de los

mismos cultivares creciendo en la Cuenca del Mediterráneo (Ceci y Carelli, 2010; Mailer et al., 2010; Rondanini et al., 2014; Borges et al., 2017). Esto probablemente esté relacionado con las características climáticas (temperatura principalmente) asociadas a la latitud y altitud de las zonas no mediterráneas de producción olivícola, que difieren de las correspondientes a la regiones mediterráneas tradicionales, aunque estudios manipulativos de los factores implicados no se han desarrollado en profundidad.

El peso seco del fruto es un factor crítico en la calidad de la aceituna de mesa, por su relación con el calibre de la misma (Fernández et al., 2015), y está implicado indirectamente en la producción de aceite, al ser uno de los determinantes del contenido de aceite (gramos de aceite) por fruto. En general, en olivo el 50 % del peso seco de los frutos a cosecha es aceite, aunque esta proporción es variable entre genotipos y ambientes. El tamaño final del fruto puede describirse como la acumulación de biomasa a una determinada tasa multiplicada por la duración del periodo de crecimiento (Loomis y Connor, 2002). Algunos estudios correlativos en olivo han demostrado que las variaciones en el peso seco del fruto se relacionarían más fuertemente con su tasa de crecimiento que con la duración de su periodo de crecimiento (Rondanini et al., 2014), pero el papel regulatorio de los factores ambientales (e.g., temperatura) detrás de esta respuesta es todavía incierto y las respuestas observadas del peso del fruto al aumento de la temperatura en olivo son contradictorias. Por un lado, Rondanini et al. (2014) reportaron menor tamaño de fruto en algunos cultivares evaluados (e.g., cvs Arauco y Arbequina) en zonas de menor elevación altitudinal (y más cálidos) con respecto a zonas de mayor altitud (y menor temperatura) del noroeste argentino, en un rango de temperaturas medias durante la temporada de crecimiento entre 23-27 °C. En la misma dirección, García-Inza et al. (2014) encontraron que el peso seco de frutos disminuía linealmente cuando la temperatura media diaria superaba los 25 °C, al calentar ramas

reproductivas de cv Arauco. Contrariamente, en un estudio correlativo, Trentacoste et al. (2012), no encontraron relación entre el peso fresco del fruto y la temperatura en diez cultivares analizados en un rango de temperatura más bajo y acotado (18,9-19,7 °C) y García-Inza et al. (2016), reportaron que la temperatura media del aire no tuvo efecto sobre el peso seco del mesocarpo, al calentar ramas fructíferas por periodos cortos de tiempo durante el desarrollo del fruto.

El rol de la temperatura en el control de la síntesis de aceite y la composición de ácidos grasos fue ampliamente estudiado en semillas oleaginosas de cultivos anuales (en soja: Wolf et al., 1982; Thomas et al., 2004; en girasol: Ploschuk y Hall, 1995; Villalobos et al., 1996; Izquierdo et al., 2002; Rondanini et al., 2003; en lino: Green, 1986). En términos generales se observó que aumentos de la temperatura se asociaron negativamente con la concentración de aceite. Con respecto a la composición de ácidos grasos, aumentos en la concentración de ácido oleico se han atribuido al incremento de la temperatura en oleaginosas anuales (e.g., en girasol: Seiler y Brothers, 1999; Izquierdo et al., 2002; Rondanini et al., 2003; en soja: Maestri et al., 1998). Una de las características distintivas del aceite de oliva es que el ácido oleico es el principal ácido graso (55-83 %) y esto se asocia con características positivas desde el punto de vista nutricional como así también con la longevidad de almacenamiento. Por este motivo el % de oleico es uno de los parámetros químicos que más afecta la calidad del aceite y sus valores para la comercialización están regulados por el Consejo Oleícola Internacional (COI; IOOC, 2013). En el NOA, los ácidos grasos de los aceites de algunos cultivares, muchas veces quedan fuera de los límites establecidos por el COI para aceite de oliva extra virgen y esto estaría asociado a las altas temperaturas de la región (Rondanini et al., 2011; Rondanini et al., 2014).

El genotipo es el principal determinante de la composición de ácidos grasos en el aceite de oliva pero también está fuertemente influenciado por el ambiente, siendo uno de los aspectos de la calidad del aceite que parecería ser más afectado por la temperatura. Estudios correlativos (e.g., Orlandi et al., 2012; Rondanini et al., 2014) y manipulativos (García-Inza et al., 2014) en olivo han demostrado que la respuesta de la composición de ácidos grasos a la temperatura es opuesta a lo conocido para oleaginosas anuales y esta diferencia podría deberse a las distintas estructuras del fruto implicadas. El aceite de oliva proviene principalmente del mesocarpo del fruto (cerca del 95 %) y de pequeñas contribuciones de la semilla, mientras que la mayoría de los cultivos oleaginosos anuales acumulan aceite principalmente en el embrión de la semilla. En un estudio manipulativo en ramas fructíferas, García-Inza et al. (2014) observaron que en cv Arauco el porcentaje de aceite y el de ácido oleico disminuyen linealmente al aumentar la temperatura media durante el período de síntesis de aceite. Más aún, esa respuesta a la temperatura se explica por la respuesta de la composición de ácidos grasos del mesocarpo, mientras que la semilla presenta una respuesta a la temperatura curvilínea, similar al de otros aceites de semilla. A su vez, analizando la variabilidad en la dinámica de acumulación de aceite y su composición entre cultivares y zonas de producción, Rondanini et al. (2014) reportó una caída promedio de la concentración de aceite del 3 % por cada °C de incremento de la temperatura media diaria en seis cultivares de olivo y cambios en el perfil de ácidos grasos de diferente magnitud según el cultivar. Mientras que los cultivares Arauco y Arbequina fueron los más sensibles a las variaciones en el ambiente (años y localidades), en producción y composición del aceite, cv Coratina no mostró variaciones significativas en la composición de ácidos grasos en todo el gradiente altitudinal y térmico evaluado. La interacción genotipo x ambiente observada al comparar diferentes localidades y años

posiblemente esté explicada por diferencias en la respuesta a la temperatura, siendo cv Arbequina más sensible que cv Coratina.

Los tocoferoles son uno de los componentes menores más importantes en la determinación de la calidad del aceite por ser considerados antioxidantes naturales y estar implicados en la preservación del aceite durante el almacenamiento. El α -tocoferol es tradicionalmente considerado el principal antioxidante del aceite de oliva (más del 90 % de la proporción total) (Pérez et al., 2019). La concentración de tocoferoles en el aceite de oliva es altamente variable y depende fuertemente del cultivar (Pérez et al., 2019). Sin embargo, se ha sugerido que posibles interacciones genotipo x ambiente (temperatura) pueden modificar su concentración y composición (Bodoira et al., 2015). No hay bibliografía disponible en relación a la dinámica de la acumulación de los principales tocoferoles y su contenido final en el fruto de olivo en respuesta a la temperatura.

Resumiendo, los factores ambientales y las interacciones genotipo x ambiente adquieren importancia relevante cuando los diferentes genotipos son producidos fuera de su zona de origen. Diferencias entre cultivares en la producción y partición de biomasa como respuesta al incremento de la temperatura, podrían ser la explicación a las diferencias entre cultivares del rendimiento graso y muchas veces también en vigor. En este sentido, estudios manipulativos de la temperatura en plantas enteras, en dos genotipos contrastantes, durante gran parte o todo el periodo de desarrollo del fruto y síntesis y acumulación de aceite podrían ser de ayuda para dilucidar cómo la temperatura afecta el rendimiento y la calidad del aceite en olivo.

1.4 Objetivos e Hipótesis

Objetivo General: *Analizar las respuestas de la fotosíntesis y la transpiración, la producción y partición de biomasa, y el rendimiento del aceite y su calidad, a incrementos de la temperatura durante la fase de acumulación de aceite en dos cultivares de olivo (*Olea europaea* cvs *Arbequina* y *Coratina*).*

Objetivo Específico 1: Diseñar y testear un sistema de calentamiento activo utilizando dos métodos de calentamiento complementarios que se pueda usar para evaluar las respuestas de árboles frutales jóvenes como el olivo al calentamiento.

H1OE1: El uso de energía solar y/o resistencia eléctrica permite aumentar la temperatura del aire dentro de OTCs lo suficiente como para simular escenarios de calentamiento global futuros.

H2OE1: El aumento de la temperatura usando aire calentado con energía solar y/o resistencia eléctrica dentro de cámaras suficientemente ventiladas no modifica el contenido de humedad del aire, la concentración de CO₂ ni la radiación incidente, pero provoca un incremento de la demanda atmosférica de vapor de agua.

Predicciones: La temperatura media diaria dentro de la OTC T+ será 4 °C mayor que en la OTC T0. La concentración de CO₂ y la humedad absoluta serán similares en las OTCs T0 y T+, pero el DPV será mayor en T+ que en T0. La radiación PAR será igual en los dos tipos de OTC y corresponderá a 75-90 % de la radiación PAR incidente en el ambiente exterior.

Objetivo Específico 2: Analizar las respuestas de los parámetros de intercambio gaseoso de la hoja (A_{max} , g_s y E), el flujo de savia de toda la planta y algunas características morfo-anatómicas de la hoja, como la densidad y el tamaño de los estomas, a la temperatura de crecimiento durante un periodo prolongado en olivos jóvenes.

H1OE2: El intercambio neto de carbono del olivo durante el verano se ve limitado al superar los 35 °C de temperatura del aire como consecuencia de una menor conductancia estomática en respuesta al incremento del déficit de presión de vapor (DPV) y/o la temperatura. Por el contrario, olivos a mayor temperatura y bien regados tienen mayor transpiración, mediado por una mayor demanda atmosférica (DPV).

H2OE2: La temperatura a la cual se alcanza la mayor tasa fotosintética máxima a saturación lumínica en hojas de olivo depende de las temperaturas experimentadas durante su desarrollo (aclimatación térmica de la hoja). Esto se sustenta en la bibliografía existente donde se señala que numerosas especies leñosas evidencian algún tipo de capacidad de aclimatación térmica de la fotosíntesis que les permite mantener su eficiencia fotosintética a temperatura elevada (Berry y Björkman, 1980; Yamori et al., 2013; Vico et al., 2019).

H3OE2: A una misma temperatura del aire el cv Coratina presenta una mayor resistencia física de la hoja al intercambio gaseoso que cv Arbequina por una mayor presencia de tricomas en su cara abaxial. Por otro lado, las hojas desarrolladas a mayor temperatura y bajo condiciones de buena disponibilidad hídrica presentan menor número de tricomas que las desarrolladas a menor temperatura independientemente del cultivar, lo que facilita la pérdida de agua por transpiración.

Predicciones: Cuando la temperatura del aire en OTC T0 esté alrededor de los 30 °C y en T+ alrededor de los 35 °C, A_{max} y g_s serán mayores en las hojas T0 que en las T+ pero cuando la temperatura durante las mediciones supere los 35 °C en T0 (y 39 °C en T+), acompañada de altos valores de DPV, A_{max} y g_s caerán en ambos tratamientos. Por otro lado, la transpiración de la hoja aumentará en las OTC T+ debido al mayor DPV y en paralelo el flujo de savia de los árboles calentados tendrá una dinámica diaria similar entre tratamientos térmicos pero en T+ será mayor que en los árboles a menor temperatura. Al cruzar las temperaturas de medición (i.e., medir T0 a la temperatura actual de T+ y viceversa) A_{max} será menor en ambos tratamientos en comparación al valor determinado a su temperatura actual debido a la aclimatación de la fotosíntesis a la temperatura de crecimiento de la hoja durante el verano. En las hojas creciendo a mayor temperatura el número de tricomas será menor, independientemente del cultivar. En ambos tratamientos térmicos, la transpiración de la hoja en cv Coratina será menor que en cv Arbequina debido a una mayor cantidad de tricomas en la cara abaxial de la hoja.

Objetivo Específico 3: Determinar el efecto del incremento de la temperatura sobre el crecimiento vegetativo, la producción de biomasa y su partición, y el rendimiento de aceite.

H1OE3: El incremento de la temperatura durante la fase de acumulación de aceite (verano- principios de otoño) disminuye el peso seco y la concentración de aceite en el fruto, siendo destinados menos recursos a los frutos y más a los órganos vegetativos incluidos los brotes en desarrollo.

H2OE3: El incremento de temperatura en más de una temporada tiene un efecto acumulado sobre los árboles de olivo, acentuado por el crecimiento exponencial entre temporadas típico en árboles jóvenes.

Predicciones: En los árboles T+ el crecimiento de brotes y el incremento de biomasa de los órganos vegetativos serán mayores, mientras que su biomasa reproductiva y rendimiento de aceite serán menores con respecto a T0. Los equivalentes glucosa de los frutos serán menores en los árboles T+ y la relación entre la glucosa destinada a órganos vegetativos vs la destinada a frutos será mayor en los árboles T+. El área foliar por árbol será mayor en los árboles calentados. Plantas calentadas la primera y segunda temporada de mediciones presentarán mayores diferencias de producción de biomasa y crecimiento con respecto a los controles, que plantas coetáneas calentadas sólo durante la segunda temporada.

Objetivo Específico 4: Evaluar la respuesta de los principales componentes de la calidad del aceite (ácidos grasos y tocoferoles principales) y de algunas características del fruto a cosecha al incremento de la temperatura del aire durante el desarrollo del fruto.

H1OE4: El calentamiento disminuye la tasa de crecimiento del fruto y esto genera frutos de menor tamaño. Además, debido al crecimiento asincrónico entre la pulpa (mesocarpo) y el carozo (endocarpo + semilla), el incremento de la temperatura alrededor de la síntesis y acumulación de aceite disminuye más el crecimiento de la pulpa que del carozo, que ocurre más tempranamente.

H2OE4: La respuesta del perfil de ácidos grasos al incremento de la temperatura en olivo es cultivar dependiente, siendo en cv Arbequina la proporción de los principales ácidos grasos, como el ácido oleico, muy dependiente de la temperatura mientras que en cv Coratina el perfil es más estable. Esto se sustenta en estudios correlativos previos que sugieren que algunos cultivares como cv Arbequina varían su perfil de ácidos grasos más sensiblemente que otros como cv Coratina al aumentar la temperatura media durante la síntesis y acumulación de aceite (Rondanini et al., 2014).

H3OE4: Los tocoferoles tienen su concentración máxima en los primeros estadios de desarrollo del fruto cuando se produce una activa división celular, ya que se encuentran asociados a las membranas celulares y a medida que el aceite se acumula en el fruto la concentración disminuye por un efecto de dilución. Así, al reducirse la concentración de aceite del fruto por el calentamiento durante el periodo de acumulación de aceite, la concentración de tocoferoles en aceite aumenta por un efecto de “concentración” (efecto indirecto).

Predicciones: Se espera que al analizar las dinámica de crecimiento y de acumulación de aceite de los frutos, aquellos creciendo a mayor temperatura (T+) tengan menor tasa de crecimiento (en peso seco) y de acumulación de aceite (en % de aceite) que los frutos T0. Además, la relación pulpa/ carozo será menor en T+ que en T0 en ambos cultivares. La proporción de ácido oleico será menor en los frutos a mayor temperatura en el cv Arbequina, pero se mantendrá similar a los controles en cv Coratina. Los α - y γ -tocoferoles (principales tocoferoles en el aceite de oliva) tendrán una concentración en el aceite decreciente a medida que avanza la fase de acumulación de aceite. Entre tratamientos, los tocoferoles tendrán una concentración en aceite mayor en los frutos T+

que en los T0, pero al expresar la cantidad de tocoferoles por unidad de fruto el valor será similar entre tratamientos térmicos.

A modo de resumen, en la figura 1.1 se detalla un diagrama conceptual de las principales variables de interés evaluadas como así también las hipótesis correspondientes a los Objetivos Específicos 2 al 4 puestas a prueba en la tesis.

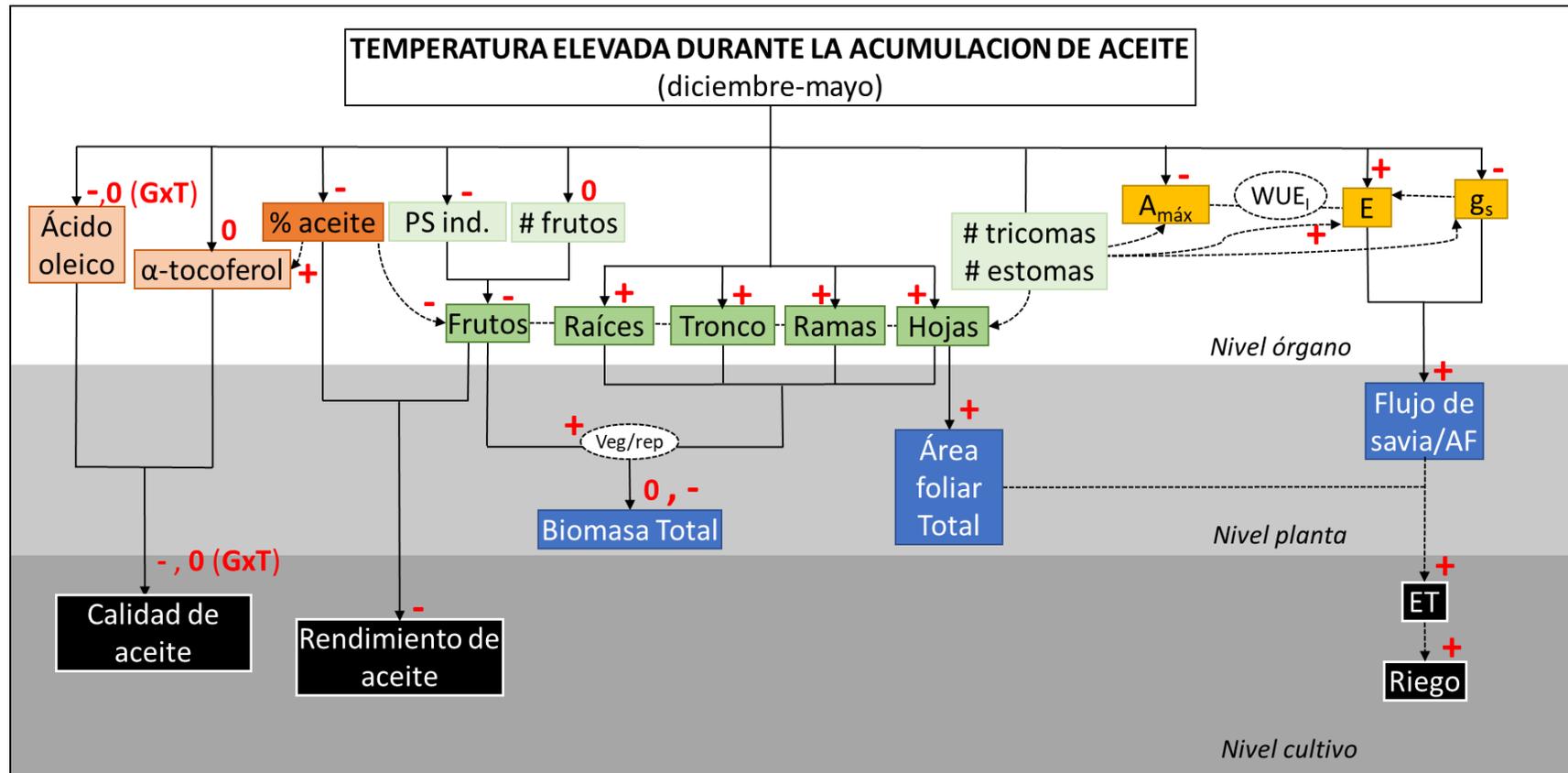


Figura 1.1. Diagrama conceptual describiendo las principales variables de interés evaluadas en la tesis a diferente nivel de organización (órgano, planta y cultivo) y su respuesta al incremento de la temperatura desde ocurrido el cuaje y hasta el final de la síntesis de acumulación de aceite. En rojo se indican las respuestas directas e indirectas derivadas de las hipótesis planteadas en los Objetivos Específicos 2, 3 y 4. Con signo negativo (-) se indica una respuesta de disminución (o efecto negativo) mientras que + indica incremento. El cero indica que no hay respuesta. GxT señala interacción genotipo (cultivar) x temperatura.

1.5 Estructura de la tesis

Para cumplir con los objetivos planteados y poner a prueba las hipótesis formuladas, primero se diseñó y testeó un sistema de calentamiento con cámaras sin techo (OTCs) con dos métodos de calentamiento activo complementarios y una OTC control, con un sistema de ventilación y renovación de aire solamente (primer experimento). Además, árboles de olivo de los cultivares Arbequina y Coratina fueron colocados dentro de las OTCs durante dos temporadas una vez determinado el cuaje de los frutos y durante todo el período de acumulación de aceite (diciembre a mayo) para poder hacer las evaluaciones de las variables fisiológicas y/o productivas pertinentes a cada objetivo específico planteado (segundo experimento). En el **Capítulo II** de la tesis se describe detalladamente el diseño del sistema de OTCs utilizados para lograr los tratamientos térmicos, como así también se presentan los principales resultados obtenidos de las pruebas de su funcionamiento. Este capítulo permite cumplir con el Objetivo Específico 1 y sus resultados permiten poner a prueba las hipótesis planteadas en relación a éste. Por su parte, la metodología específica implementada para medir/calcular las variables fisiológicas o productivas de interés y analizar los datos se describe en la sección “materiales y métodos” de cada capítulo de resultados siguiente (Capítulos III-V). Además del Capítulo II, la tesis se compone de tres capítulos de resultados. En el **Capítulo III**, se evalúa la respuesta del intercambio de gases de la hoja, de la anatomía foliar y de la transpiración de la planta al incremento sostenido de la temperatura entre verano y otoño. Los resultados de este capítulo permiten cumplir con el Objetivo Específico 2 y poner a pruebas las hipótesis asociadas a este objetivo. En el **Capítulo IV** se evalúan las respuestas de la producción de biomasa a nivel de árbol entero, su partición hacia los distintos órganos y el rendimiento de aceite al incremento de la temperatura durante el periodo de acumulación de aceite en árboles bajo tratamiento térmico una o

dos temporadas. Los resultados derivados de este capítulo corresponden al Objetivo Específico 3 y permite poner a prueba las hipótesis planteadas. En el último capítulo de resultados (**Capítulo V**) se evalúan las respuestas de los principales componentes de la calidad del aceite (ácidos grasos y tocoferoles principales) y de algunas características del fruto a cosecha al incremento de la temperatura del aire durante el desarrollo del fruto, en correspondencia con el Objetivo Específico 4 y los resultados permiten poner a prueba sus hipótesis. Finalmente, en el **Capítulo VI** se realiza la confrontación de las hipótesis, se discute los aportes novedosos al conocimiento científico y el alcance de los resultados obtenidos en esta tesis y su posible aplicación o abordaje en investigaciones futuras.

**Métodos complementarios de calentamiento activo para
evaluar las respuestas de olivos jóvenes al calentamiento***

*El contenido de este capítulo fue publicado en la revista *Scientia Horticulturae*: Miserere, A., Searles, P.S., Hall, A.J., García-Inza, G.P., Rousseaux, M.C., 2019. Complementary active heating methods for evaluating the responses of young olive trees to warming. *Sci. Hortic.* 257, 108754.

2.1 Introducción

El interés por determinar los efectos del calentamiento global sobre la producción agrícola creció en las últimas décadas debido a las predicciones de modelos que indican un aumento promedio de la temperatura del aire entre 1,0 y 3,7 °C para finales de siglo (Winkler et al., 2013; IPCC, 2014; Gray y Brady, 2016). Las estimaciones mundiales sugieren que la producción de alimentos se verá afectada negativamente por los aumentos de temperatura por encima de 2-3 °C, incluidas las regiones cálidas, semiáridas y áridas (IPCC, 2007; Brown y Funk, 2008; Challinor et al., 2009). Los árboles frutales se cultivan comúnmente en tales regiones, pero hay poca información disponible sobre sus posibles respuestas de rendimiento al calentamiento (Luedeling et al., 2011; Ponti et al., 2014).

Existen muchos métodos posibles para evaluar las respuestas a la temperatura en árboles y otras plantas. Estos métodos pueden clasificarse principalmente como métodos indirectos o directos. Los métodos indirectos a menudo usan correlaciones entre las variables agrícolas de respuesta y la temperatura del aire a lo largo de un gradiente espacial o durante varios años. Por ejemplo, Rondanini et al. (2014) observaron que el aumento de la temperatura generalmente disminuyó el peso seco del fruto de olivo y la concentración de aceite y cambió la composición de ácidos grasos del aceite al analizar diferentes ubicaciones a lo largo de un gradiente altitudinal durante dos años en el cálido y árido noroeste argentino. Debido a que separar el efecto de la temperatura per se de otros factores que pueden variar entre localidades como suelos, humedad relativa o radiación solar puede ser difícil en el campo (Oishi et al., 2010; Rutishauser et al., 2012), los resultados de tales estudios indirectos no son necesariamente concluyentes (Levin, 1992). Sin embargo, esta metodología es ampliamente utilizada porque los estudios son económicos y generan resultados relativamente rápidos, características que lo convierten en una herramienta valiosa (Elmendorf et al., 2015).

En contraste, los métodos directos exponen las plantas a diferentes condiciones de temperatura de crecimiento manipulando directamente la temperatura en cámaras de crecimiento, invernaderos o en condiciones de campo. Los estudios con cámaras de crecimiento e invernaderos han recibido algunas críticas debido a dinámicas de temperatura diarias y estacionales poco realistas, al igual que la humedad, radiación solar y viento (Bonada y Sadras, 2015). Por otro lado, la mayoría de los sistemas de manipulación de la temperatura a campo calientan los cultivos de forma activa y / o pasiva dentro de estructuras. Estas estructuras pueden ser desde mayormente abiertas hasta completamente cerradas. Los sistemas abiertos que usan calentadores infrarrojos espaciados en un anillo hexagonal tienen la ventaja de que los factores microclimáticos como la circulación del aire no se ven afectados, pero obtener aumentos significativos de temperatura puede ser un desafío en condiciones de viento (Kimball et al., 2018). Por el contrario, los sistemas cerrados permiten más fácilmente mayores aumentos de temperatura, aunque las variables microclimáticas difieren en los sistemas cerrados en comparación con las condiciones del ambiente exterior (Kellomäki et al., 2000; Barton et al., 2010).

Las cámaras sin techo (OTCs,) proporcionan un punto intermedio entre los sistemas de manipulación de campo abiertos y completamente cerrados y se han diseñado con éxito para estudiar la biología de plantas durante más de 20 años (Norby et al., 1997). En estos sistemas, la parte superior abierta (i.e., techo) reduce el sombreado que ocurre en los sistemas más cerrados que están cubiertos con láminas de plástico, y permite ventilar las cámaras para evitar aumentos de humedad y disminuciones en la concentración de CO₂ ambiental (Corelli-Grappadelli y Magnanini, 1993; Long et al., 2005; Bonada y Sadras, 2015). En los sistemas de campo con OTC calentadas pasivamente, la absorción y reemisión de radiación solar por las paredes laterales de la

OTC proporciona una fuente de calor para aumentar la temperatura del aire dentro de la cámara en comparación con las condiciones del ambiente exterior. Desafortunadamente, el nivel de calentamiento en estos sistemas pasivos depende fuertemente de las condiciones meteorológicas prevalecientes, incluidas la nubosidad, la velocidad del viento y el ángulo solar (Marion et al., 1997). En contraste, los sistemas OTC con calentamiento activo con calentadores de resistencia eléctrica además del calentamiento pasivo de la pared lateral, permiten aumentos de temperatura programables y sostenidos durante el día y la noche. Además, se pueden comparar con OTCs usadas como control, con las mismas paredes laterales y, por lo tanto, con condiciones microclimáticas similares a las OTCs calentadas activamente.

A pesar del impacto potencial del calentamiento en la fisiología y producción de los árboles frutales, se ha prestado poca atención al diseño y prueba de sistemas de manipulación de temperatura a campo adecuados en los árboles frutales. Por ejemplo, el olivo es una especie cultivada en aproximadamente 11 millones de hectáreas en regiones semiáridas y áridas bajo una variedad de condiciones ambientales (Lucena et al., 2017; Torres et al., 2017). Sin embargo, como lo mencionó García-Inza et al. (2014) en un estudio manipulativo a nivel de rama, se realizaron pocos estudios de campo sobre cómo los olivos enteros responden al calentamiento. Se utilizaron cámaras de campo cerradas y calentadas pasivamente para evaluar el impacto del aumento de la temperatura durante varios días en la polinización y la producción de frutos (Vuletin Selak et al., 2014). Además, las OTC equipadas con calentamiento activo por resistencia eléctrica se emplearon para estudiar el crecimiento vegetativo y reproductivo del olivo durante ciclos anuales completos (Benlloch-González et al., 2018). En ambos estudios, las respuestas de los árboles calentados en las cámaras se compararon con los árboles en condiciones de ambiente exterior.

Por todo lo anterior, el objetivo de este capítulo fue diseñar y probar un sistema de calentamiento activo con dos métodos de calentamiento complementarios que se puedan utilizar para evaluar las respuestas de árboles frutales jóvenes, como el olivo, al calentamiento. Los dos métodos de calentamiento complementarios incluyeron un método de resistencia eléctrica común similar al de Benlloch-González et al. (2018) y un diseño de túnel de plástico transparente bastante novedoso con piedras ennegrecidas en el interior, a través de las cuales se forzó el aire usando ventiladores para calentar la OTC. Un método de túnel sin piedras se utilizó previamente para calentar arroz en OTCs (Chiba y Terao, 2014). Los métodos de túnel con capacidad de almacenamiento térmico (i.e., piedras) podrían proporcionar un amplio calentamiento durante el día de una manera fácil y a bajo costo (Saxena et al., 2015).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Descripción del sitio y diseño experimental

El estudio se realizó en el campo experimental de CRILAR-CONICET en Anillaco, La Rioja, Argentina (lat. 28° 48' S, longitud 66° 56' O; 1325 msnm). En la figura 2.1 se puede ver una descripción general de la disposición de las OTCs. Dieciséis cámaras sin techo se construyeron en la primavera de 2014. Ocho OTCs se utilizaron como controles, sólo con calentamiento pasivo por el material de la cubierta de las paredes laterales. Las otras ocho OTCs fueron similares a las OTCs control, pero se calentaron activamente. Las OTCs se asignaron en bloques experimentales (4 u 8 bloques según el experimento), y la evaluación de las OTCs se realizó con y sin olivos en su interior dependiendo de las variables a evaluar. Las evaluaciones se realizaron en diferentes



Figura 2.1. a) Vista general de la disposición de cámaras sin techo (OTCs). La OTC en el primer plano izquierdo es una OTC con calentamiento activo con la puerta abierta y muestra la falda del polietileno utilizada para extender las paredes laterales de la cámara hasta el nivel del suelo, el dispositivo de calentamiento del túnel de plástico (que se proyecta desde el lado izquierdo de la OTC), la apertura superior parcialmente restringida en la parte superior de la OTC (i.e., techo), y la carcasa del calentador (a la derecha de la puerta). La OTC en el primer plano central es un control, y muestra la posición del tubo de entrada de aire (a la derecha de la OTC), sin falda de polietileno y con la parte superior completamente abierta. b) Interior de una OTC con calefacción activa con olivos de dos años en su interior.

fechas de medición durante los períodos de verano y otoño de las temporadas de crecimiento 2014-15 y 2015-16.

2.2.2 Estructura de las cámaras sin techo

La cámara tenía forma de prisma rectangular con una altura total de 2 m y una longitud y anchura de 1,5 m. Se utilizó caño metálico de sección cuadrada para construir el marco de la estructura. Las secciones de las paredes de la cámara tenían 1,7 m de alto x 1,5 m de ancho y estaban montadas sobre una base rectangular a 30 cm del suelo, que a su vez estaba unida a cuatro patas de soporte de 30 cm de largo. Como material de cubierta de las paredes se usó polietileno blanco translúcido con protección UV y baja transmitancia infrarroja (150 μm de espesor; Premium Thermal Agrotileno PLDT221510, AgroRedes, Argentina). Las paredes laterales de polietileno se extendían desde la parte superior de la estructura a la base rectangular o se extendían hasta la superficie del suelo por medio de una falda de polietileno (i.e., una extensión de polietileno desde la base rectangular hasta el suelo), según fue necesario. Una de las paredes laterales incluía una puerta para facilitar la entrada a la OTC.

2.2.3 OTCs control calentadas pasivamente

Las OTCs calentadas pasivamente estaban completamente abiertas en la parte superior y no tenían una falda de polietileno que cubriera el espacio de 30 cm desde los bordes inferiores de las paredes laterales hasta la superficie del suelo, algo que permitió cierta ventilación convectiva pasiva. También se conectó un sistema de renovación de aire forzado a cada OTC calentada pasivamente (figura 2.2a). El aire del exterior de la cámara se introdujo en cada OTC a través de una tubería de cloruro de polivinilo (PVC;

110 mm de diámetro) mediante un ventilador axial (92 x 92 x 25 mm, SUNON MagLev 2, China). La toma de aire se ubicó a una altura de 1,0 m sobre el suelo en el lado sur de cada OTC para evitar el calentamiento del aire ambiental por el suelo desnudo. La salida de aire estaba en el centro de la cámara cerca de la superficie del suelo con un deflector de aire situado a 10 cm por encima de la salida y 30 cm por encima de la superficie del suelo para distribuir el aire entrante dentro de la cámara.

2.2.4 OTCs calentadas activamente

El sistema de calentamiento activo constaba de dos métodos complementarios: 1) un túnel de plástico transparente de 6 m de largo con piedras ennegrecidas en el interior a través de la cual se obligaba al aire a calentar las OTCs en días soleados; y 2) un caloventor eléctrico conectado a un ventilador para calentar en días nublados y durante la noche (figura 2.2b). El aire calentado fue conducido a través de una tubería de PVC hacia el centro de la OTC y un deflector de aire por encima de la salida de aire calentado facilitó la distribución del aire dentro de la cámara, de manera similar a la configuración para la OTC control. Con el fin de aumentar aún más el calentamiento de la OTC, las paredes laterales se extendieron hasta el nivel del suelo utilizando una falda de polietileno. Además, se unieron tiras de acetato transparente de 30 cm de ancho (80 μm de espesor, alta transmitancia UV) a la parte superior de la estructura para reducir la abertura de 2,25 m^2 a 0,81 m^2 (figura 2.2b).

El método de calentamiento activo utilizando el novedoso túnel de plástico con piedras ennegrecidas fue diseñado para aprovechar la radiación solar como fuente de calor durante las horas diurnas con poca nubosidad. El túnel de polietileno de 6 m de largo para cada OTC contenía 20-25 piedras pintadas de negro con diámetros de 30-40 cm. Las piedras ennegrecidas absorbían la radiación solar y calentaban el aire, por contacto directo

y por reemisión de radiación de onda larga, que luego era forzado a entrar en la cámara. El túnel se colocó perpendicularmente a la cara norte de cada OTC para recibir la máxima carga de radiación solar posible en este sitio del hemisferio sur (figura 2.2b). El polietileno del túnel fue apoyado en arcos semicirculares con un radio de 0,45 m. El piso del túnel se cubrió con lana de fibra de vidrio para reducir la pérdida de calor en el suelo, y se colocó papel de aluminio sobre la lana para reflejar la luz solar hacia las piedras. El aire fue forzado a través del túnel hacia el centro de la OTC a una velocidad de $1,4 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$ utilizando un ventilador axial en la entrada del túnel y otro en la salida. Los ventiladores fueron programados para funcionar solo durante las horas del día (7:30 a 19:30 h, hora solar, en verano; 8:30 a 18:30 h a principios de otoño).

El segundo método de calentamiento activo fue un caloventor eléctrico, que se utilizó para producir una diferencia de temperatura sostenida entre las OTCs control y calentada durante todo el día y la noche, independientemente de la nubosidad, el ángulo solar y las horas de luz solar. El caloventor eléctrico utilizado (modelo AX-CA-1900 W, Axel, Argentina) generó calor al pasar corriente eléctrica a través de un elemento de resistencia metálico. El caloventor se colocó dentro de una carcasa de metal y se ubicó en el lado sur de la OTC (figura 2.2b). El aire calentado se condujo desde el caloventor eléctrico a través de una tubería de PVC y se expulsó al centro de la OTC por un ventilador axial. Para evitar el calentamiento excesivo de las OTCs, se utilizaron dos sistemas de controlador electrónico centralizado (Cavadevices, Argentina) con 4 pares de sensores de temperatura cada uno (TC1047A, Microchip Inc., China). Un sensor de cada par se colocó dentro de una OTC calentada a una altura de 1,0 m y el otro se colocó dentro de una OTC control a la misma altura. Cada controlador se programó para mantener la diferencia de temperatura entre las OTCs control y calentada activamente cerca de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, encendiendo o apagando los caloventores eléctricos. Los dos métodos de calentamiento fueron

complementarios, ya que el calorventor solo contribuyó al calentamiento cuando el aire del túnel de plástico no estaba lo suficientemente caliente como para alcanzar el objetivo de 4 °C.

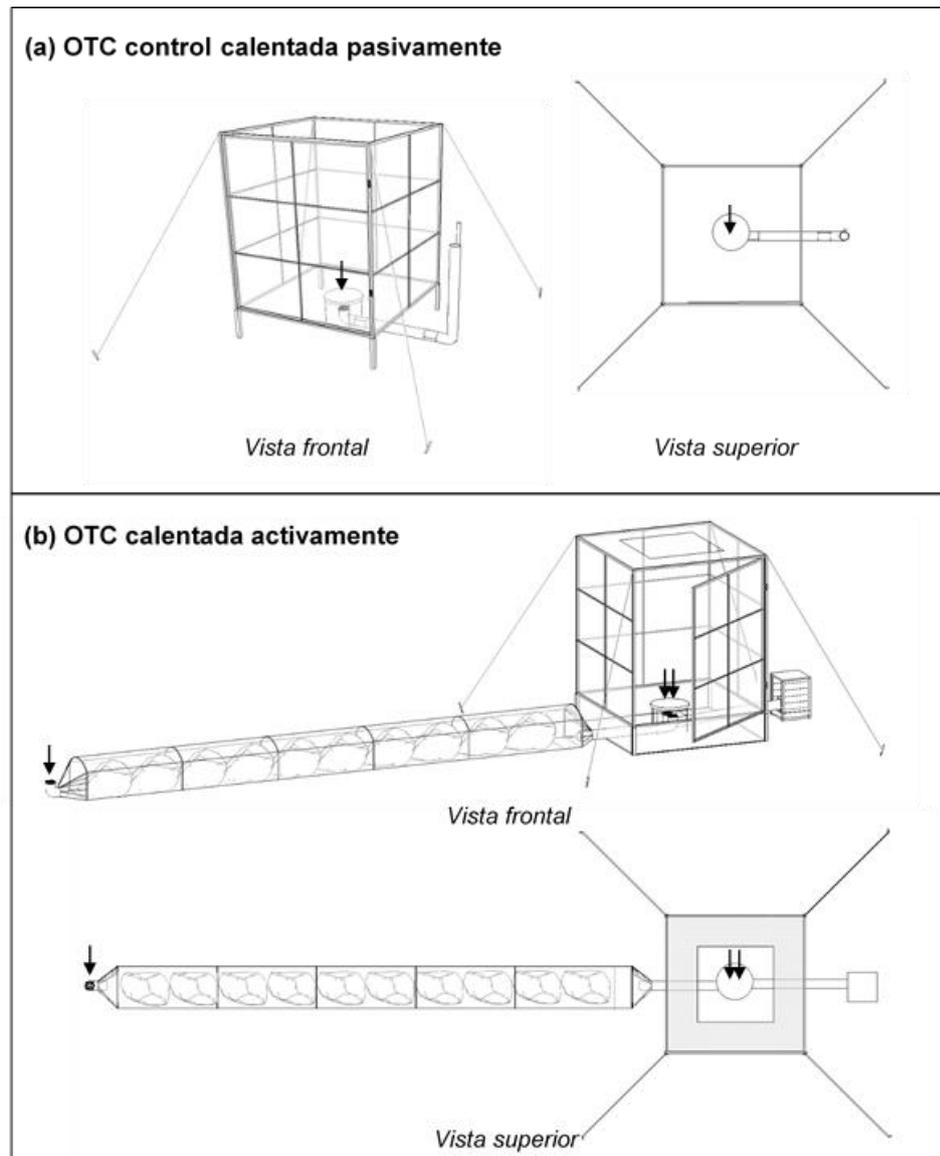


Figura 2.2. Vistas frontal y superior de una cámara sin techo (OTC) control con calentamiento pasivo y con sistema de renovación de aire (a) y de una OTC con calentamiento activo con dos métodos complementarios, un túnel de plástico con piedras negras + un calorventor eléctrico (b). Las cámaras tenían una forma de prisma rectangular con una altura total de 2,0 m y una longitud y anchura de 1,5 m. El material de cubierta de la pared fue polietileno blanco translúcido con protección UV y baja transmisión infrarroja, y se unieron tiras de acetato transparente de 30 cm de ancho a la parte superior de la OTC con calentamiento activo para reducir el tamaño de la abertura superior. Las flechas muestran la posición de los ventiladores utilizados para inyectar aire en la OTC control (un ventilador) y con calentamiento activo (tres ventiladores).

2.2.5 Contribución relativa del calentamiento pasivo y activo

Las contribuciones térmicas de los sistemas de calentamiento pasivo y activo se determinaron usando cuatro configuraciones diferentes de las OTCs: 1) una OTC control calentada pasivamente sin la falda de polietileno en las paredes laterales; 2) una OTC calentada pasivamente con la falda de polietileno en las paredes laterales; 3) una OTC calentada activamente utilizando sólo el calentamiento del túnel de plástico; y 4) una OTC calentada activamente con el túnel de plástico y un caloventor eléctrico. Se utilizaron un total de 16 OTCs para esta evaluación (4 configuraciones de OTCs x 4 bloques). La evaluación se realizó durante varios días durante el verano y el otoño en OTCs vacías sin árboles.

Además de los sensores de temperatura en cada una de las OTCs, se colocó un sensor al aire libre cerca de las OTCs a la misma altura que los otros sensores para determinar la temperatura del aire del ambiente exterior (i.e., fuera de las OTCs). Las temperaturas se registraron cada 15 minutos durante 9 días consecutivos de otoño en 2015 y durante 13 días en el verano de 2016 utilizando un almacenador de datos (Cavadevices, Argentina). Luego se calcularon los valores promedios para las temperaturas diarias (24 h), diurnas (7:30 a 19:30 h, hora solar) y nocturnas (19:30 a 7:30 h, hora solar) para cada configuración de OTC.

2.2.6 Gradientes de temperatura dentro de las OTC

Los gradientes de temperatura horizontal y vertical dentro de las OTCs vacías se determinaron utilizando nueve posiciones a dos alturas diferentes (0,3 y 1,5 m). Las mediciones se realizaron en condiciones de cielo despejado entre las 13:00 y las 13:30 h, hora solar, el 27 de mayo de 2015, utilizando lecturas instantáneas de un sensor de

temperatura portátil (Hygroskop A1, Rotronic ag, Suiza). Las posiciones horizontales a cada altura consistían en una matriz cuadrada con la posición central ubicada sobre el deflector de aire. El gradiente horizontal se estimó utilizando las diferencias de temperatura promedio entre el punto central en cada nivel horizontal y las ocho posiciones horizontales equidistantes restantes. El gradiente vertical se determinó como el valor medio de la diferencia de temperatura entre las dos alturas en cada posición horizontal.

2.2.7 Evaluación de otras variables microclimáticas

Las dinámicas diarias, semanales y estacionales de humedad relativa (HR) y temperatura se registraron durante el verano y el otoño durante dos años consecutivos para determinar el contenido absoluto de vapor de agua y la dinámica del déficit de presión de vapor (DPV) en las OTCs. Para estas mediciones, se utilizaron las OTCs control calentadas pasivamente sin la falda de polietileno y las OTCs calentadas activamente con el túnel de plástico + el caloventor eléctrico. Se usaron un total de 16 OTCs (2 configuraciones de OTCs x 8 bloques) con cada OTC conteniendo cuatro olivos bien regados en su interior, para incluir posibles efectos de microclima mediados por la vegetación que crece bajo diferentes regímenes de temperatura. Los árboles tenían de 2 a 3 años de edad y crecían en macetas de 30 l, que se insertaron en cavidades de 30 cm de profundidad en el suelo, de modo que la parte superior de la maceta estaba a nivel de la superficie del suelo. La HR se registró cada 30 minutos con un almacenador de datos colocando un sensor de humedad (Cavadevices, Argentina) a una altura de 1,0 m en el centro de una OTC calentada activamente, un sensor en una OTC calentada pasivamente y otro fuera de las OTCs. Después de unos días, los sensores fueron rotados a otro par de OTCs. En contraste, todas las OTCs contenían sensores de temperatura. El contenido

absoluto de vapor de agua del aire y DPV se calcularon a partir de los datos de los sensores de acuerdo con la ecuación general de gases y Allen et al. (1998), respectivamente.

Durante 2014-15 y 2015-16, se evaluaron las diferencias potenciales en las concentraciones de CO₂ entre las OTCs calentadas activa y pasivamente con condiciones ambientales fuera de las OTCs para las horas de luz diurna, cuando se considera que la asimilación de CO₂ de la hoja está cerca de los valores máximos (9:00 a 15:00 h, hora solar). Se colocó un sensor infrarrojo de CO₂, no dispersivo (Cavadevices, Argentina) en una OTC calentada activamente y una OTC control calentada pasivamente, así como en condiciones ambientales a una altura de 1,0 m durante períodos de aproximadamente 7 días. Al igual que las mediciones de HR, los sensores se trasladaron a otro par de OTCs después de cada período de medición, y las OTCs contenían olivos jóvenes. Las concentraciones de CO₂ se registraron cada 30 minutos con un almacenador de datos.

La radiación fotosintéticamente activa incidente (PAR, 400-700 nm) se midió dentro (I) y afuera (I_o) de tres cámaras vacías (una calentada pasivamente y dos calentadas activamente) al comienzo y al final del primer año. Las mediciones se realizaron a las 8:00, 10:00 y 13:00 h, hora solar, dentro de las cámaras en cinco posiciones horizontales a una altura de 30 cm sobre la superficie del suelo utilizando una barra de luz de integración lineal de 1 m de largo (BAR-RAD 100, Cavadevices, Argentina). También se tomó una medición fuera de cada OTC al mismo tiempo. La transmitancia PAR se determinó como I / I_o en cada OTC.

2.2.8 Respuestas de crecimiento y rendimiento

Para probar aún más el funcionamiento de las OTC, olivos de tres años de cv Arbequina se colocaron en OTCs control calentadas pasivamente y OTCs calentadas activamente poco después del endurecimiento del carozo, el 1 de diciembre de 2015

cuando el cuaje de frutos finalizó, y permanecieron en las OTC hasta el 3 de mayo de 2016, hasta el final del período de acumulación de aceite. Estos árboles presentaban similar tamaño y desarrollo foliar al momento de colocarse en las OTCs y se usaron para determinar algunas respuestas básicas de crecimiento y rendimiento. Se asignaron cuatro árboles por OTC a cuatro OTCs control, cuatro OTCs calentadas activamente, y cuatro árboles fuera de las OTCs, bajo condiciones ambientales. Los árboles se regaron diariamente utilizando emisores de goteo para satisfacer completamente sus necesidades de agua. Para más detalles sobre las condiciones de crecimiento (e.g., fertilización, riego, etc.) de estos árboles ver sección 3.2.1 del capítulo siguiente (Capítulo III).

Se realizaron algunas determinaciones de crecimiento y rendimiento al final de la temporada en uno de los cuatro árboles por OTC y en los cuatro árboles bajo condiciones ambientales. Se midió el diámetro del tronco usando un calibre digital a una altura de 20 cm sobre la superficie del suelo y se calculó el área seccional del tronco (AST) como el área de un círculo. Se obtuvo la masa foliar específica (MFE; g m^{-2}) sobre la base de peso seco de una muestra de 50 hojas, con un disco de hoja tomado de cada hoja con un sacabocados. El área foliar por árbol se calculó como el peso seco total de la hoja por árbol dividido por su MFE. El índice de madurez de la fruta (IM) se calculó para una muestra de 50 frutos basándose en la evaluación estándar del color de la piel y la pulpa usando una escala de 0 a 7 (Uceda y Hermoso, 2001). La concentración de agua de la fruta se calculó en base a los pesos frescos y secos de la misma muestra. La concentración de aceite (%) de la pasta seca se determinó utilizando un equipo de espectroscopía de resonancia magnética (SLK AC-100, Spinlock SRL, Córdoba, Argentina). El contenido de aceite del fruto se calculó como $\text{g de aceite fruto}^{-1}$ basado en el peso seco del fruto individual y la concentración de aceite del fruto (%). Finalmente, se determinó la relación pulpa/carozo en peso seco para una muestra de 30 frutos.

2.2.9 Análisis estadístico

Las diferencias en la temperatura del aire, los gradientes de temperatura horizontal y vertical y las concentraciones de CO₂ entre las configuraciones de OTCs se analizaron utilizando ANOVA para efectos fijos y pruebas LSD de Fisher para comparaciones de medias múltiples ($p \leq 0,05$). Las respuestas agrícolas al calentamiento se analizaron mediante ANOVA de una vía y LSD de Fisher. Todos estos análisis se realizaron con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2016).

2.3 Resultados

2.3.1 Contribución del calentamiento pasivo y activo

El curso diario de la temperatura del aire en las OTCs fue muy similar al de la temperatura ambiente (figura 2.3). Durante los períodos de medición, la temperatura ambiente promedio diaria del aire fue de 24,5 y 14,6 °C en verano y otoño, respectivamente (cuadro 2.1). La temperatura diaria promedio en las OTCs control calentadas pasivamente con o sin la falda de polietileno unida a las paredes laterales fue menos de 1,0 °C mayor que el aire ambiente, y no se produjeron diferencias estadísticamente significativas en la temperatura entre estas configuraciones de OTCs (cuadro 2.1). Durante el día, las paredes laterales de plástico calentaron las OTCs casi 2 °C al comparar las OTCs calentadas pasivamente sin la falda y el aire ambiente, pero enfriaron ligeramente las OTCs durante la noche. Las OTCs calentadas activamente sólo con el túnel de plástico mostraron temperaturas diarias más altas (aproximadamente 1 a 2 °C) y diurnas (aproximadamente 3 °C) que las de ambas configuraciones de OTCs control en el verano, pero no en el otoño (cuadro 2.1). Como era de esperar, el efecto

térmico del túnel fue casi cero durante la noche debido a que no había radiación solar para calentar.

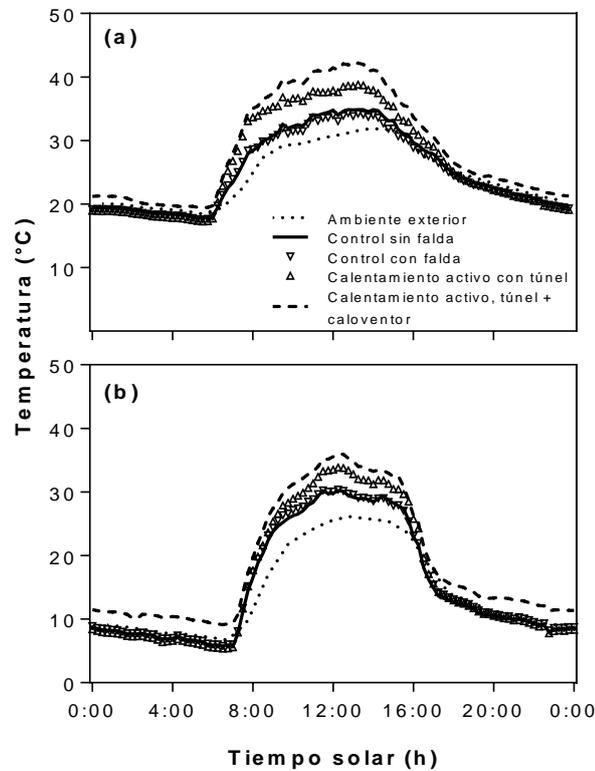


Figura 2.3. Dinámica diaria promedio de la temperatura del aire durante trece días de verano (a) y nueve días de otoño (b) bajo cuatro configuraciones de cámara sin techo (OTC) y temperatura ambiente. Las cuatro configuraciones de OTC fueron: 1) OTC control calentada pasivamente y sin la falda de polietileno en las paredes laterales; 2) OTC control calentada pasivamente con la falda de polietileno en las paredes laterales; 3) OTC calentada activamente sólo por el túnel de plástico; y 4) OTC calentada activamente por el túnel de plástico y un caloventor eléctrico. Los datos son promedios de 4 OTCs por configuración ($n = 4$). La temperatura se registró a intervalos de 15 minutos.

Las OTCs calentadas activamente con el túnel de plástico y el caloventor eléctrico registraron temperaturas sustancialmente mayores que las OTCs sólo con el calentamiento del túnel. La contribución térmica diaria del caloventor eléctrico, calculada como la diferencia de temperatura entre la OTC calentada activamente con el túnel de plástico y el caloventor eléctrico y la OTC calentada activamente sólo con el túnel, fue

de aproximadamente 2,5 °C tanto en verano como en otoño. El calentamiento activo por el caloventor durante el día también fue similar entre las estaciones (i.e., 2,4 °C y 2,3 °C en verano y otoño, respectivamente). Por la noche, el caloventor proporcionó sólo 2.0 °C de calentamiento en verano, pero un promedio de 3,6 °C en otoño. Las OTCs calentadas activamente con el túnel de plástico y el caloventor eléctrico tuvieron temperaturas diarias aproximadamente 4,5 °C mayores que la temperatura ambiente en ambas estaciones (cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Promedio de temperaturas diarias (24 h), diurnas (7:30 - 19:30 h, hora solar) y nocturnas (19:30 -7:30 h, hora solar) (°C) durante trece días de verano y nueve días de otoño bajo cuatro configuraciones de cámara sin techo (OTC) y temperatura ambiente. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las configuraciones de OTC para el mismo período del día y la temporada determinadas utilizando la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Los valores son promedios \pm 1 error estándar ($n = 4$ OTCs).

Estación del año y momento del día	Tratamiento				
	Pasivamente calentada sin falda	Pasivamente calentada con falda	Activamente calentada sólo con túnel	Activamente calentada (túnel + caloventor)	Ambiente exterior
Verano					
Diaria	25,4 \pm 0,2 c	24,9 \pm 0,3 c	26,6 \pm 0,4 b	28,9 \pm 0,2 a	24,5
Diurna	30,8 \pm 0,3 c	30,1 \pm 0,4 c	33,5 \pm 0,6 b	35,9 \pm 0,2 a	28,9
Nocturna	20,2 \pm 0,1 b	20,0 \pm 0,3 b	20,1 \pm 0,2 b	22,1 \pm 0,3 a	20,8
Otoño					
Diaria	15,4 \pm 0,2 c	15,8 \pm 0,2 bc	16,3 \pm 0,1 b	19,0 \pm 0,4 a	14,6
Diurna	22,6 \pm 0,6 b	23,5 \pm 0,6 b	24,9 \pm 0,4 b	27,1 \pm 0,4 a	21,0
Nocturna	8,1 \pm 0,2 b	8,3 \pm 0,2 b	7,6 \pm 0,3 b	11,2 \pm 0,6 a	9,2

La diferencia de temperatura entre las dos configuraciones de OTCs principales, que fueron la OTC control calentada pasivamente sin la falda de polietileno en las paredes laterales y la OTC calentada activamente con el túnel de plástico y el caloventor eléctrico, se evaluó durante los períodos de verano y otoño (figura 2.4). La diferencia de

temperatura diaria entre las dos configuraciones fue muy similar entre temporadas con promedios de aproximadamente 3,5 °C. Estos valores se acercaron al objetivo elegido de 4,0 °C. Durante el día, la diferencia fue algo más alta que el valor objetivo, mientras que fue más baja durante la noche (particularmente en el verano cuando sólo fue 1,9 °C).

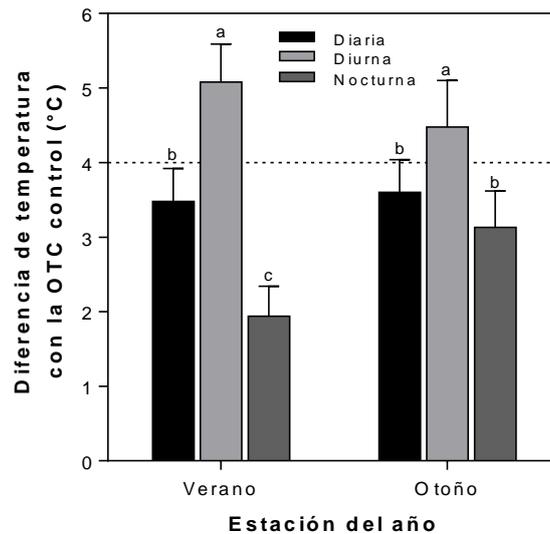


Figura 2.4. Diferencias de temperatura promedio diaria (24 h), diurna (7:30 - 19:30 h, hora solar) y nocturna (19:30 - 7:30 h, hora solar) en verano y otoño entre las OTC con calentamiento activo con el túnel de plástico + un caloductor eléctrico y las OTCs control, con calentamiento pasivo sin la falda de polietileno en las paredes laterales. Las barras representan los promedios \pm 1 error estándar ($n = 4$ OTCs). Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre las configuraciones de OTC para los diferentes períodos del día y las estaciones determinadas utilizando el test de Fisher LSD ($p \leq 0,05$). La línea horizontal punteada indica la diferencia objetivo entre las configuraciones.

2.3.2 Gradientes de temperatura

Los gradientes de temperatura horizontal para las tres OTCs probadas fueron inferiores a $1,0 \text{ } ^\circ\text{C m}^{-1}$, mientras que los gradientes de temperatura vertical fueron inferiores a $0,2 \text{ } ^\circ\text{C m}^{-1}$ en todos los casos (cuadro 2.2). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diseños OTC.

Cuadro 2.2. Gradientes de temperatura horizontal y vertical ($^{\circ}\text{C m}^{-1}$) dentro de las configuraciones de OTC seleccionadas. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las configuraciones de OTCs para un gradiente de temperatura dado, determinado mediante la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Los valores son promedios \pm 1 error estándar ($n = 4$ OTCs).

Gradiente de temperatura	Tratamiento		
	OTC control sin falda	OTC con calentamiento activo con túnel	OTC con calentamiento activo con túnel + caloventor
Horizontal	0,31 \pm 0,25 a	0,91 \pm 0,41 a	0,58 \pm 0,36 a
Vertical	0,17 \pm 0,09 a	-0,04 \pm 0,13 a	0,11 \pm 0,10 a

2.3.3 Evaluación de otras variables microclimáticas

Basándose en la línea de regresión 1:1, la humedad absoluta calculada de las OTCs control, pasivamente calentadas y las OTCs calentadas activamente con el túnel de plástico y el caloventor eléctrico fueron similares a los valores medidos fuera de las OTCs (figura 2.5). Por lo tanto, los diseños OTC no influyeron en la cantidad de agua por unidad de volumen de aire con olivos jóvenes en las cámaras bajo nuestras condiciones climáticas. La dinámica diaria de DPV fue conducido por la temperatura, con valores más altos de DPV en las OTCs calentadas activamente que en las OTCs control calentadas pasivamente (figura 2.6).

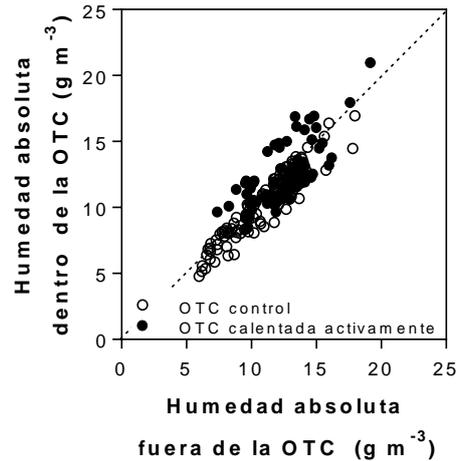


Figura 2.5. Humedad absoluta (g m^{-3}) en las OTCs control con calentamiento pasivo o en las OTCs con calentamiento activo con el túnel de plástico + el calorventor eléctrico en comparación con las condiciones ambientales del aire exterior durante 2015-16. Cada punto representa la relación entre el valor registrado en en una OTC T0 o T+ y el respectivo valor en el ambiente exterior ($n = 1$). Los puntos se registraron a intervalos de 30 min durante un período de cuatro días de verano. La línea de puntos representa la relación 1:1.

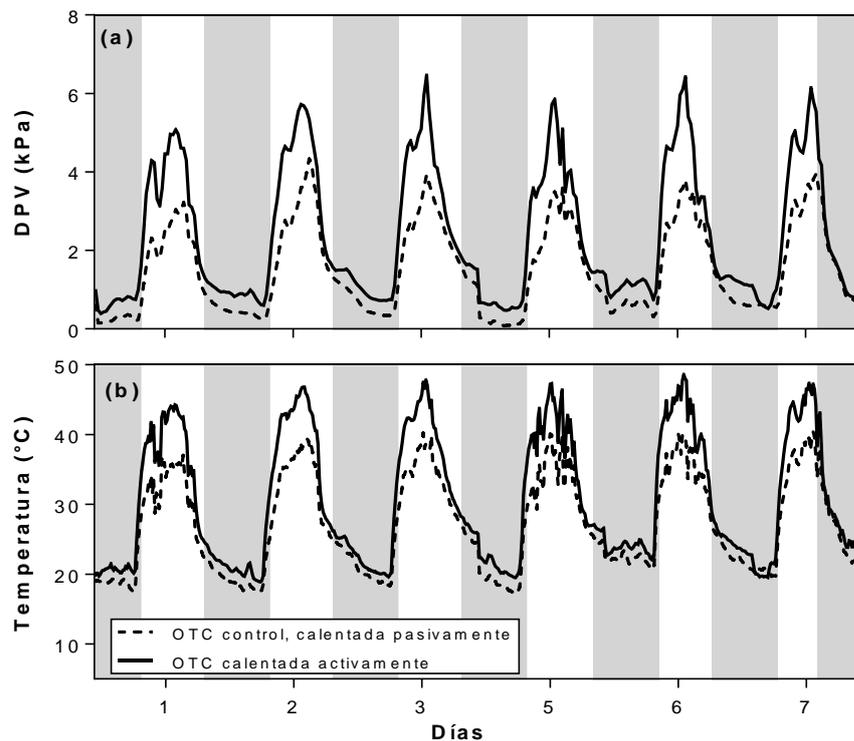


Figura 2.6. Dinámica del déficit de presión de vapor (a) y la temperatura del aire (b) en las OTCs control, calentadas pasivamente y las OTCs calentadas activamente con el túnel de plástico y el calorventor eléctrico. Las mediciones se tomaron durante seis días consecutivos de verano en febrero de 2016. El fondo gris indica la noche (19:30 - 7:30 h, hora solar) y el fondo blanco indica el día (7:30 - 19:30 h, hora solar). Los datos son promedios de 8 repeticiones por configuración de OTC ($n = 8$).

La concentración media de CO₂ (9:00 - 15:00 h, hora solar) con olivos jóvenes dentro de las cámaras no difirió entre las dos configuraciones principales de OTC en ninguno de los dos años. Las OTCs control calentadas pasivamente tuvieron promedios de 427 ppm en 2014-15 y 422 ppm en 2015-16, mientras que las OTCs calentadas activamente tuvieron un promedio de 424 ppm en ambos años. Se encontró una relación 1:1 en las concentraciones de CO₂ dentro de cada una de las dos configuraciones de OTC en ambos años (figura 2.7).

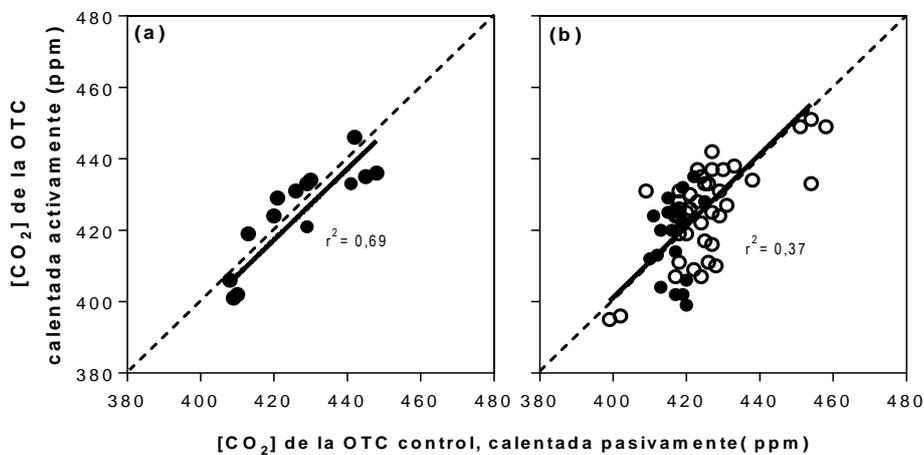


Figura 2.7. Concentración de CO₂ promedio (de 9:00 a 15:00 h, hora solar) en las OTCs control calentadas pasivamente y las OTCs calentadas activamente por el túnel de plástico y el calorventor eléctrico durante 2014-15 (a) y 2015-16 (b). Las mediciones se realizaron periódicamente durante el verano y el otoño de cada año. Los símbolos sólidos y vacíos indican las medidas de verano y otoño, respectivamente. Cada punto representa la relación entre valor registrado en una OTC T0 y su respectiva T+ (n = 1). Los valores se registraron a intervalos de 30 min. La regresión lineal de los puntos en cada temporada (líneas sólidas) no fue estadísticamente diferente ($p > 0,05$) a una función $x=y$, con pendiente = 1 y ordenada al origen = 0 (i.e., relación 1:1; líneas de puntos). Se indica además el coeficiente de determinación (r^2) para las regresiones lineales en cada temporada.

Al comienzo de la temporada, el PAR medido dentro de las OTCs calentadas pasiva y activamente fue el 78 % del PAR fuera de las OTCs debido a las paredes laterales de polietileno y la estructura metálica de las cámaras. La reducción en la abertura en la parte superior de las OTCs calentadas activamente usando acetato transparente no afectó significativamente la transmitancia de PAR (Apéndice I). Después de 7 meses, la

transmitancia de PAR fue solo ligeramente menor (75 %) que al comienzo de la temporada.

2.3.4 Respuestas de crecimiento y rendimiento

El área foliar y la masa foliar específica fueron similares al final del período de acumulación de aceite entre los árboles de las OTCs calentadas activa y pasivamente, así como los bajo condiciones ambientales exteriores (cuadro 2.3). El área seccional del tronco (AST) no mostró una diferencia significativa debido al calentamiento entre los árboles jóvenes de las OTCs, aunque AST fue estadísticamente mayor (16 %) en las OTCs calentadas activamente en comparación con las condiciones al aire libre.

El número de frutos por árbol fue similar entre los tres grupos experimentales como se esperaba, dado que el calentamiento se realizó durante el período de acumulación de aceite después de que se produjo el cuaje de frutos. El rendimiento por árbol no se vio afectado significativamente por el calentamiento, pero el contenido de aceite por fruto y la concentración de aceite del fruto fueron significativamente menores en las OTCs calentadas activamente en comparación a los de las OTCs calentadas pasivamente y los bajo el ambiente exterior. El peso individual del fruto fue significativamente menor en las OTCs calentadas activamente en comparación con las OTCs calentadas pasivamente, y fue intermedio en las condiciones de ambiente exterior. El IM y la concentración de agua de los frutos fueron similares entre los tres grupos experimentales. Finalmente, la relación pulpa/carozo fue un 50 % mayor en T0 que en T+ y el ambiente exterior, mientras que no hubo diferencias entre estos últimos dos grupos.

Cuadro 2.3. Respuestas vegetativas y reproductivas de olivos jóvenes al calentamiento en cámaras sin techo (OTCs) calentadas activamente en comparación con las OTCs control calentadas pasivamente durante el período de acumulación de aceite (1 de diciembre de 2015 a 3 de mayo de 2016). También se muestran valores para los árboles bajo las condiciones ambientales al aire libre. Se muestran los promedios \pm 1 error estándar ($n = 4$). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales según lo determinado mediante la prueba LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Los árboles presentaban similar tamaño (i.e., diámetro de tronco y volumen de copa) al iniciar los tratamientos y las variables de crecimiento vegetativo se evaluaron al finalizar el calentamiento.

Respuestas agrícolas	Condiciones experimentales		
	Fuera de las OTCs	OTCs pasivamente calentada	OTCs activamente calentada
Crecimiento vegetativo			
Área seccional del tronco (cm ²)	5,20 \pm 0,20 a	5,78 \pm 0,20 ab	5,96 \pm 0,20 b
Área foliar (m ² árbol ⁻¹)	2,07 \pm 0,20 a	1,89 \pm 0,20 a	2,07 \pm 0,10 a
Masa foliar específica (g m ⁻²)	240 \pm 6,0 a	242 \pm 6,5 a	235 \pm 11,3 a
Rendimiento			
Número de frutos (# árbol ⁻¹)	644 \pm 134 a	726 \pm 58 a	776 \pm 86 a
Rendimiento de frutos frescos (g árbol ⁻¹)	1528 \pm 111 a	1657 \pm 68 a	1301 \pm 153 a
Peso seco del fruto (g fruto ⁻¹)	0,88 \pm 0,12 ab	0,95 \pm 0,06 a	0,63 \pm 0,05 b
Contenido de aceite del fruto (g fruto ⁻¹)	0,35 \pm 0,06 a	0,41 \pm 0,03 a	0,20 \pm 0,02 b
Concentración de aceite del fruto (%)	39,0 \pm 1,68 a	42,9 \pm 1,08 a	30,8 \pm 1,30 b
Índice de Madurez	2,7 \pm 0,68 a	3,8 \pm 0,55 a	3,3 \pm 0,33 a
Concentración de agua del fruto (%)	59,1 \pm 0,6 a	58,5 \pm 0,6 a	61,7 \pm 2,4 a
Pulpa/carozo (en peso seco)	1,9 \pm 0,19 b	2,5 \pm 0,15 a	1,4 \pm 0,09 b

2.4 Discusión

2.4.1 Diseño y prueba de un sistema de calefacción activo con dos métodos de calefacción complementarios

El uso complementario del túnel de plástico con piedras ennegrecidas y el caloventor eléctrico permitió mantener una diferencia de temperatura del aire diaria (24 h) de casi 4 °C entre la OTC control pasivamente calentada y la OTC activamente calentada, tanto en verano como en otoño (figura 2.4). El calentamiento pasivo en las OTCs control dio como resultado un aumento diario de temperatura de solo 1 °C en

comparación con el ambiente exterior. Sin embargo, se reconoce que las paredes laterales aumentaron la temperatura del aire durante el día (07:30 – 19:30 h, hora solar) dentro de las OTCs en casi 2 °C en comparación con la temperatura del aire del ambiente exterior, pero enfriaron ligeramente las OTCs durante la noche (cuadro 2.1, figura 2.3) El enfriamiento nocturno es un fenómeno común (conocido como inversión térmica) en invernaderos sin calefacción, especialmente en noches despejadas con baja velocidad del viento (Montero et al., 1985; Mesmoudi et al., 2012).

El método de calentamiento activo utilizando el túnel de plástico con piedras ennegrecidas fue muy útil en el verano durante el día, cuando aportó 3,4 °C de la diferencia objetivo de 4 °C entre las OTCs control pasivamente calentadas y las OTCs activamente calentadas (cuadro 2.1). Durante la noche sin radiación solar para calentar las piedras, el túnel obviamente tuvo poco o ningún efecto. En otoño, el túnel sólo aportó 1,3 °C durante el día y tendió a enfriar la cámara por la noche (cuadro 2.1). Este enfriamiento podría deberse a que las piedras lograron temperaturas más bajas que la temperatura ambiente exterior en las largas y frescas noches de otoño y al ventilador axial dentro de la OTC, que aspira aire del túnel y lo inyecta en la OTC. El diseño final de la OTC eliminó este efecto no deseado al usar entradas de aire separadas en la cámara desde el túnel y el caloventor eléctrico (figura 2.2), lo que permitió que los ventiladores asociados con el sistema de túnel se apagaran por la noche.

Este método de calentamiento con túnel con piedras no se ha informado previamente en los diseños de OTCs hasta donde sabemos, aunque se han contemplado diseños similares para invernaderos de plástico (Saxena et al., 2015). Además, Chiba y Terao (2014) usaron túneles de plástico sin piedras para introducir aire caliente en las OTCs en arrozales. El calentamiento solar del aire es económico, fácil de realizar y consume poca electricidad. Sin embargo, tiene un uso muy limitado en regiones con

condiciones de nubosidad frecuente. La selección de piedras según sus propiedades térmicas (dada su composición mineral y la relación superficie/volumen) podría ser un criterio útil para mejorar la eficiencia en los días soleados, pero estas propiedades no se evaluaron en esta tesis. En nuestro caso, se usaron grandes piedras de granito principalmente debido a su disponibilidad en la región.

El calentamiento activo utilizando el calor eléctrico fue un complemento necesario para el método de calentamiento del túnel (cuadro 2.1). Por supuesto, este fue particularmente el caso durante la noche cuando los calosventores proporcionaron todo el calentamiento. Sin embargo, su contribución térmica fue menor de lo previsto en la noche en el verano porque a menudo se activaba un interruptor de seguridad para evitar el sobrecalentamiento y posterior daño de los calosventores. Durante la noche en otoño con bajas temperaturas del aire ambiente, los calosventores rara vez se apagaron y la diferencia de temperatura en comparación con las OTCs control estaba cerca del objetivo de 4 °C. Al mediodía, el aumento de la temperatura en algunos días calurosos y soleados a menudo superó la diferencia en la temperatura objetivo entre las OTCs calentadas activamente y las OTCs control, calentadas pasivamente (figura 2.3a). Este efecto no deseado podría haber ocurrido debido a un retraso en el apagado de los calosventores por el sistema del controlador después de alcanzar el aumento de temperatura de +4 °C. Agregar un controlador secundario para apagar los ventiladores del sistema de túnel durante el día cuando la temperatura en las OTCs excede la temperatura objetivo podría mejorar esta situación.

En general, el uso complementario de los métodos de túnel plástico y calor eléctrico demostró ser una forma económica y viable de aumentar la temperatura diaria (4 °C) entre las OTC control, calentadas pasivamente y las OTCs calentadas activamente (figura 2.4). Si bien un aumento de 4 °C está en el extremo superior de las predicciones

del calentamiento global, dicho aumento proporciona cierto margen de error en el diseño del sistema, y las diferencias de temperatura de varios grados son comunes entre las zonas de producción en nuestra región montañosa debido a altitud (Rondanini et al., 2014; Aybar et al., 2015). Estudios recientes con olivos también emplearon un aumento de temperatura similar (Benlloch-González et al., 2018, 2019), lo que puede ayudar a facilitar la comparación entre los estudios.

2.4.2 Evaluación de otras variable microclimáticas

Las estructuras OTCs fueron diseñadas para minimizar las diferencias en la humedad del aire entre las OTCs control, calentadas pasivamente y las OTCs calentadas activamente usando un sistema de ventilación y renovación de aire. Con los olivos en las cámaras para simular mejor las condiciones experimentales, la humedad absoluta en ambos tipos de OTCs fue similar a la humedad medida en el ambiente exterior (i.e., al aire libre) (figura 2.5). Algunos diseños de OTCs agregan vapor de agua al sistema de ventilación de los controles pasivamente calentados para mejorar el enfriamiento durante el día (Norby et al., 1997), lo que puede aumentar la humedad absoluta, pero en nuestras OTCs no se realizó un control activo del vapor de agua de control. Dada la humedad absoluta similar en nuestras dos configuraciones de OTC, el DPV fue mayor en las OTCs calentadas activamente durante el día y la noche (figura 2.6). Estudios previos con OTCs también han reportado un mayor DPV con mayor temperatura en las OTCs calentadas activamente (Marion et al., 1997; Sadras et al., 2012a), y un mayor DPV forma esencialmente una parte intrínseca de tales sistemas. En nuestra región andina, los modelos climáticos regionales predicen que la aridez aumentará a mediados de siglo (Penalba y Rivera, 2013; SADSAN, 2015; Zaninelli et al., 2019).

La importancia de evaluar posibles alteraciones en las concentraciones de gases como el CO₂ en los sistemas experimentales de calentamiento ha sido recomendada durante mucho tiempo (Marion et al., 1997). El agotamiento de [CO₂] por las plantas dentro de sistemas de túneles largos incluso se ha utilizado como una metodología experimental para crear un gradiente de [CO₂] sub-ambiente para evaluar las respuestas de las plantas a diferentes condiciones de este gas, como lo revisaron Gerhart y Ward (2010). Con nuestro diseño, no se observaron cambios significativos en la [CO₂] entre las OTCs control y las calentadas activamente durante la parte crítica del día de alta irradiancia (9:00 a 15:00 h, hora solar), cuando ocurre la mayor parte de la fotosíntesis de los cultivos, con la [CO₂] manteniéndose alrededor de 420 ppm en ambas estaciones (figura 2.7). Por lo tanto, el uso de ventiladores axiales tanto en los conductos de salida de aire calentado en la OTC calentada activamente como en el sistema de ventilación y renovación de aire de la OTC calentada pasivamente fue ampliamente efectivo. Además, la radiación fotosintéticamente activa en las OTCs fue superior al 75 % de los valores incidentes al aire libre, lo que está por encima del nivel de saturación de luz fotosintética para árboles frutales jóvenes (e.g., Bongti et al., 1987; Rosati et al., 1999; Greer, 2018).

2.4.3 Respuestas de crecimiento y rendimiento

Para probar más a fondo el diseño OTC, el crecimiento vegetativo y el rendimiento de olivos cv Arbequina fueron evaluados al final del período de acumulación de aceite en las OTCs calentadas pasiva y activamente, así como en condiciones ambientales al aire libre. No se observaron diferencias importantes entre las OTCs calentadas pasivamente y el aire libre para las variables medidas (cuadro 2.3). Estudios anteriores también han señalado que la biomasa a menudo no se ve afectada por la presencia o ausencia de una cámara (Drake et al., 1989; Kellomäki et al., 2000). Sin embargo, variables fisiológicas

como el flujo de savia pueden verse afectadas si la humedad u otros factores no están bien controlados en la cámara (Kellomäki et al., 2000). Aunque el rendimiento de frutos por árbol no fue significativamente diferente entre las OTCs calentadas pasiva y activamente en este estudio, algunos componentes del rendimiento como el contenido de aceite por fruto y la concentración de aceite del fruto fueron más bajos en las OTCs calentadas activamente. Otras observaciones iniciales en nuestro sitio experimental con las mismas configuraciones de OTCs mostraron disminuciones similares en los parámetros del aceite con un cultivar adicional, cv Coratina (Miserere et al., 2018). Además, al comparar olivos grandes cv Picual en OTCs calentadas activamente con árboles al aire libre durante tres años en Andalucía (España), tanto el rendimiento de frutos como la concentración de aceite se redujeron por el calentamiento (Benlloch-González et al., 2019). Si bien las diferencias significativas en nuestro estudio parecen ser poco comunes debido a la cámara en sí, el uso de las OTCs control con la misma estructura que las OTCs calentadas activamente proporciona la garantía de que las variables de microclima no afectarán las respuestas de la planta.

2.5 Conclusión

Los resultados de la evaluación detallada de los sistemas de calentamiento de OTCs mostrados en este capítulo proporcionan una base metodológica para futuros estudios agrícolas y fisiológicos de las respuestas de los árboles frutales jóvenes al calentamiento. Las OTCs control, pasivamente calentadas tuvieron promedios diarios de temperatura dentro de 1 °C superior a la de las condiciones ambientales exteriores, y el uso complementario de dos métodos de calentamiento activo permitió mantener de manera confiable un aumento fijo de temperatura diaria en comparación con estos controles.

Efectos de la temperatura elevada prolongada en el intercambio de gases en las hojas, el flujo de savia a nivel de árbol entero y los estomas en olivos jóvenes *

* Los resultados de este capítulo incluyeron datos de anatomía foliar de olivo adaptados de las tesis de grado de Matías Curcio (Facultad de Agronomía, UBA) bajo la dirección de G.P. García Inza y P.S. Searles y de Romina Zabaleta (Facultad de Ingeniera, Universidad Nacional de San Juan) bajo la dirección de P.S. Searles.

3.1 Introducción

La respuesta de la fotosíntesis de las hojas y la transpiración a los aumentos prolongados de la temperatura se ha evaluado en un gran número de especies leñosas comunes tanto de ecosistemas naturales como usadas en las plantaciones forestales (e.g., Tranquillini et al., 1986; Gunderson et al., 2000; Cunningham y Read, 2002; Pons y Welschen, 2003; Doughty y Goulden, 2008; Clark et al., 2010; Gunderson et al., 2010; Lin et al., 2012, Way et al., 2013; Reich et al., 2015; Sendall et al., 2015; Marchin et al., 2016). Estos estudios han demostrado que bajo un escenario de calentamiento climático especies de altas latitudes o altitudes pueden beneficiarse de un calentamiento moderado (e.g., aumentando la fotosíntesis en mayor medida que la respiración oscura, R_{dark}), mientras que especies de regiones más cálidas, como bosques tropicales o subtropicales, no lo harán (ver revisión por Way y Oren, 2010). No obstante, parece que la respuesta del intercambio neto de CO_2 al aumento de la temperatura depende de muchos factores, incluido el tipo funcional de la planta, la temperatura inicial, la proximidad de los árboles a su umbral fisiológico óptimo y la capacidad de aclimatación térmica de la especie. En vid (*Vitis vinifera*), una importante trepadora leñosa, su ecofisiología en condiciones de temperatura elevada se ha estudiado ampliamente (Greer y Weston, 2010; Greer y Weedon, 2012; Sadras et al., 2012b; Salazar-Parra et al., 2015). Sin embargo, en especies de árboles frutales no hay información disponible sobre cómo la fotosíntesis y la transpiración pueden responder a los aumentos prolongados de la temperatura a nivel de la hoja o de árbol entero, incluyendo si se produce la aclimatación térmica, a pesar de su considerable importancia económica.

El olivo (*Olea europaea*), originario de la Cuenca Mediterránea, es una de las especies leñosas cultivadas más antiguas del mundo (Zohary y Spiegel-Roy, 1975; Besnard et al., 2011; 2018). Sus pequeñas hojas perennes con su orientación vertical y su

alta reflectividad, debido a la presencia de tricomas en la superficie de la cara abaxial, contribuyen a que los olivos se adapten bien a los veranos cálidos y secos del Mediterráneo (Connor, 2005; Fernández, 2014). Debido al aumento de la demanda internacional de aceite de oliva, la producción de olivo se ha extendido a nuevos entornos de cultivo, incluidas las regiones del hemisferio sur que a menudo tienen temperaturas anuales medias más altas que el Mediterráneo mismo (Torres et al., 2017). Además, es probable que el cambio climático global incremente las temperaturas en la mayoría de las regiones en las próximas décadas, con resultados muy diferentes a escala regional (IPCC, 2014; Seneviratne et al., 2018).

La temperatura es uno de los principales factores ambientales que controlan la fenología, la fisiología, el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Berry y Björkman, 1980; Bitá y Gerats, 2013). Por este motivo, se han desarrollado varios modelos de simulación para predecir diferentes aspectos del rendimiento del olivar en condiciones de temperatura creciente, usando componentes de economía de carbono o de uso del agua (Tanasišević et al., 2014; Morales et al., 2016; López-Bernal et al., 2018; Lorite et al., 2018). Sin embargo, faltan experimentos manipulativos de la temperatura en el campo para comprender cómo la fotosíntesis y la transpiración responden a los aumentos de la temperatura a largo plazo e identificar posibles mecanismos de aclimatación térmica de la hoja. Es probable que dichos estudios proporcionen información para mejorar los modelos de predicción existentes y, de este modo, permitan identificar estrategias de adaptación para la producción de olivos en diferentes escenarios de cambio climático.

Los estomas desempeñan un papel clave en la fotosíntesis y la transpiración de las hojas porque regulan el intercambio de dióxido de carbono y de agua. La conductancia estomática depende tanto del grado de apertura de los poros como de la densidad y tamaño de los estomas, los cuales están influenciados por factores ambientales como la

temperatura, la humedad y la concentración de dióxido de carbono (Aphalo y Jarvis, 1991; Damour et al., 2010; Urban et al., 2017a, b). En olivo, una gran cantidad de estudios experimentales han evaluado las respuestas del intercambio de gases en las hojas al déficit de agua (ver revisiones de Connor y Fereres 2005; Fernández, 2014). Bajo estrés hídrico leve a moderado la fotosíntesis disminuye, principalmente debido a las reducciones en la conductancia estomática, mientras que con el estrés hídrico grave las limitaciones bioquímicas no estomáticas se hacen evidentes.

Las respuestas del intercambio de gases en las hojas de olivos a la temperatura elevada han sido menos abordadas. Las respuestas instantáneas a corto plazo a la temperatura en condiciones controladas en cámara de crecimiento indican que la fotosíntesis neta máxima se obtiene a aproximadamente 35 °C cuando las concentraciones intercelulares de dióxido de carbono no son limitantes (Díaz-Espejo et al., 2006). Cuando se aumentó la temperatura en otro experimento de respuesta instantánea sin controlar estrictamente el déficit de presión de vapor (DPV), una temperatura óptima más baja de 30 °C fue observada debido a las reducciones en la conductancia estomática, que parecían ser cultivar dependientes (Bongi et al., 1987). Se sabe que la conductancia estomática disminuye en la mayoría de los cultivares de olivo al aumentar el DPV (Fernández et al., 1997; Moriana et al., 2002; Rousseaux et al., 2008). Estudios de olas de calor a corto plazo, en los que los olivos fueron expuestos durante uno o más días a aumentos repentinos de temperatura alrededor de 10 °C, también han indicado que las temperaturas por encima de 35 °C reducen considerablemente la conductancia estomática y la fotosíntesis neta (Koubouris et al., 2015; Haworth et al., 2018). Sin embargo, no se han informado los efectos de un aumento prolongado de la temperatura de crecimiento en el intercambio de gases de la hoja de olivo.

A su vez, la forma de la respuesta a corto plazo de la tasa de fotosíntesis neta a saturación lumínica (A_{max}) a la temperatura depende de las temperaturas que experimenta la hoja en escalas de tiempo más largas (días a estaciones; Vico et al., 2019). Las temperaturas experimentadas por la hoja inducen la aclimatación térmica, un conjunto de ajustes en las hojas de tipo fisiológicos, estructurales y bioquímicos, que afectan el intercambio gaseoso de la hoja (Kattge y Knorr, 2007; Slot y Kitajima, 2015; Yamori et al., 2013). Muchas especies leñosas muestran una capacidad considerable para ajustar, por ejemplo, las características fotosintéticas a su temperatura de crecimiento y, por lo tanto, mantienen una fotosíntesis eficiente a la nueva temperatura de crecimiento (Berry y Björkman, 1980; Yamori et al., 2013; Vico et al., 2019). La aclimatación térmica se produce en las hojas preexistentes. Sin embargo, cambios en la anatomía de la hoja también pueden ser parte del proceso de aclimatación, por lo que hojas que se desarrollan bajo nuevas condiciones de temperatura están más aclimatadas que las hojas que se desarrollaron antes del cambio de temperatura. En especies leñosas, la aclimatación térmica de la fotosíntesis se ha explorado principalmente en árboles forestales (Way y Oren, 2010; Crous et al., 2011; Crous et al., 2013) y no hay estudios que indiquen que este tipo de ajuste ocurra en olivo.

Las mediciones de flujo de savia de todo el árbol han demostrado ser una estimación confiable e integrada de la transpiración diaria en olivos (Fernández et al., 1997; Fernández et al., 2006; López-Bernal et al., 2017a). El flujo diario de savia también está bien relacionado con la temperatura media diaria del aire, ya que aumenta linealmente por encima de 13 °C en árboles adultos en condiciones de campo (Rousseaux et al., 2009). Desde la perspectiva de una escala de análisis superior, las mediciones de flujo de savia de toda la planta son una herramienta útil para proporcionar una confirmación de las respuestas de intercambio de gases a nivel de la hoja (López-Bernal

et al., 2015, Hernández-Santana et al., 2016; 2018), aunque los fenómenos como las oscilaciones estomáticas deben considerarse cuidadosamente (López-Bernal et al., 2017b). Mecanísticamente, se puede obtener una mayor comprensión de las mediciones de intercambio gaseoso de la hoja a partir de las mediciones de la densidad y el tamaño de los estomas y otras características morfológicas de la hoja. El riego deficitario en olivos aumentó la densidad de estomas y tricomas en diferente grado en dos cultivares (Ennajeh et al., 2010). Dicha adaptación podría explicar, al menos en parte, la mayor fotosíntesis de la hoja y la menor transpiración bajo estrés hídrico en el cultivar más fenotípicamente plástico. Por otro lado, cuando en vid se calentó 1-2 °C durante toda la temporada de crecimiento para simular el calentamiento global, la densidad estomática no se vio afectada pero la longitud y el ancho de los estomas aumentaron en las hojas formadas en condiciones de temperatura elevada (Sadras et al., 2012b). Este estudio concluyó que tales respuestas deberían incorporarse en los modelos actuales de conductancia foliar. Estas respuestas a temperaturas elevadas aún no han sido evaluadas en olivos.

Los objetivos de este capítulo fueron: 1) evaluar las respuestas de la fotosíntesis y la transpiración de las hojas a una temperatura de crecimiento elevada prolongada (+4 °C) en olivos jóvenes; y 2) evaluar el flujo de savia de toda la planta y las características de las hojas, como la densidad y el tamaño del estoma, en estas mismas condiciones. Para ello, dos cultivares de olivo se cultivaron en cámaras sin techo (OTCs) control y calentada, 4 °C por encima del T₀, durante el verano- principio de otoño. Además, un aumento moderado en el DPV acompañó el aumento de la temperatura en las OTC calentadas, en concordancia con las predicciones climáticas de la región que indican que la aridez aumentará a mediados de siglo en nuestra región andina (SADSN, 2015).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Material vegetal, tratamientos de temperatura y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo durante el verano y el otoño, desde el cuaje final de frutos (principios de diciembre) hasta el final del período de acumulación de aceite (principios de mayo) durante dos temporadas de crecimiento (2014-15, 2015-16) en el campo experimental de CRILAR- CONICET, en La Rioja, Argentina (28° 48' S, 66° 56' O; 1325 m.s.n.m). Se utilizaron olivos de los cultivares Arbequina y Coratina de dos (2014-15) y tres años de edad (2015-2016) que estuvieron bajo tratamiento durante la temporada de medición solamente. El área foliar por árbol al comienzo del experimento fue de alrededor de 0,5 m² en la primera temporada y 1,5 m² la segunda. Todos los árboles se obtuvieron de un vivero comercial (San Gabriel S.A.P.E.M; La Rioja, Argentina) y se trasplantaron a macetas de plástico de 30 l apenas un año antes de la primera temporada. Los árboles se irrigaron diariamente durante el experimento utilizando riego por goteo para satisfacer sus necesidades de agua en función de la temperatura diaria promedio del tratamiento calentado utilizando las funciones de flujo de savia corregida por área foliar obtenidas previamente (Rousseaux et al., 2009). La fertilización se realizó manualmente a intervalos mensuales con macronutrientes (15 N: 15 P: 15 K) y una vez por semana desde floración hasta cosecha con micronutrientes (B, 0,02 % en peso; Cu, 0,01 %; Fe, 3 %; Mn, 1 %; Zn, 1 %, Mo 0,007 %) + nitrógeno (2,8 %) + magnesio (0,5 %) (Aminoquelant minors, Brometan, Spain).

Para los tratamientos de temperatura se utilizaron cámaras sin techo (OTCs) que incluían un control (T₀), que estaba ~1 °C por encima de la temperatura ambiente exterior, y un tratamiento calentado (T₊), a 4 °C por encima de T₀. El diseño de las cámaras y la descripción del funcionamiento del sistema de calentamiento fueron detallados en el Capítulo II. En cada temporada de tratamiento, los árboles estuvieron dentro de las OTCs desde final de cuaje (diciembre) hasta final de la acumulación de aceite (principios de

mayo). El resto del año todos los árboles permanecieron bajo las mismas condiciones ambientales afuera, en el vivero del campo experimental.

La temperatura del aire dentro de cada OTC se midió cada 15 min usando sensores de temperatura (TC1047S, Microchip Inc. China) conectados a un registrador de datos (Cavadevices, Argentina). Los sensores se colocaron a una altura de 1,0 m dentro de abrigos para evitar la radiación directa. La humedad relativa (HR) se registró cada 30 minutos utilizando un par de sensores conectados a un registrador de datos. Se colocó un sensor dentro de una OTC T+ y otro en una T0. Después de unos días, los sensores se movieron a otro par de OTCs. El déficit de presión de vapor (DPV) se calculó en función de la humedad relativa y la temperatura (Allen et al., 1998).

El diseño experimental fue en bloques completos al azar, con dos factores (cultivar y temperatura) a dos niveles cada uno (i.e., un total de 16 OTCs). Se utilizaron bloques de modo de controlar el potencial efecto de problemas eléctricos en sectores de la parcela experimental y probables diferencias de presión en las mangueras de riego asociadas a la posición en el terreno. Cada OTC contenía cuatro árboles en macetas colocadas dentro de cavidades individuales de 30 cm de profundidad en el suelo, quedando la parte superior a la misma altura que el suelo circundante, con el fin de no calentar las raíces. Además, en la base de estos pozos, se colocaron ladrillos para ayudar al buen drenaje de las macetas y evitar la proliferación de las raíces de los árboles más allá del fondo de la maceta. Se utilizaron uno o dos árboles por OTC para los objetivos de este estudio.

3.2.2 Fotosíntesis de hojas, conductancia estomática, transpiración y eficiencia en el uso del agua

Las tasas de fotosíntesis bajo irradiación de saturación (A_{\max}), de conductancia estomática (g_s) y de transpiración (E) se midieron en una hoja por OTC que estuviera

totalmente expandida. Las mediciones en 2014-15 se realizaron durante la mañana (3 h antes del mediodía solar) y la tarde (2 h después del mediodía solar) en tres ocasiones durante el transcurso de la temporada utilizando un sistema de fotosíntesis portátil (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA). En 2015-16, las mediciones se realizaron sólo en la tarde, para acomodar mediciones más detalladas de fluorescencia de clorofila en la segunda temporada. Con la excepción de las mediciones de diciembre en 2014-15, todas las hojas medidas se desarrollaron en las OTCs bajo condiciones de tratamiento.

La temperatura dentro de la cámara de la hoja se ajustó en función de las temperaturas del aire en las OTCs al momento de realizar las mediciones, de manera que las OTCs T+ tenían una temperatura 4 °C más alta que las OTCs T0. El aumento de la temperatura de la cámara de la hoja para el tratamiento T+ se obtuvo utilizando un sistema doble Peltier. Cuando fue necesario, el enfriamiento de la cámara se logró con ventiladores asociados con el sistema Peltier y la cámara de hojas. Debido al considerable tiempo necesario para cambiar la temperatura de la cámara de la hoja, las hojas se midieron en cuatro OTCs a la temperatura T0, luego las hojas de ocho OTCs a la temperatura T+ y, finalmente, las hojas de las cuatro OTCs T0 restantes.

Para obtener con precisión A_{\max} , se proporcionó una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mediante diodos emisores de luz que entremezclaron 90 % de luz roja y 10 % de luz azul. El flujo de aire dentro del sistema y la concentración de CO_2 de referencia se controlaron automáticamente a $300 \mu\text{mol s}^{-1}$ y 400 ppm, respectivamente. Se tomaron lecturas cuando se alcanzó una condición de estado estacionario, aproximadamente un minuto después de que la hoja se colocó en la cámara. A partir de los datos de A_{\max} y E, se calculó la eficiencia del uso del agua (EUA) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{EUA} = A_{\max} / E \quad (3.1)$$

Por último, el intercambio gaseoso de hojas formadas en condiciones T0 o T+ se midió en las temperaturas tanto de las OTCs T0 y como de las T+ en dos ocasiones en 2015-16, para evaluar las posibles respuestas de aclimatación a la temperatura de A_{max} , g_s , E y EUA.

3.2.3 Fluorescencia de clorofila

Los parámetros de fluorescencia de clorofila modulados se midieron simultáneamente con los parámetros de intercambio de gas del Li-Cor durante ambas estaciones (2014-15 y 2015-16). La tasa de transporte de electrones (ETR), se calculó como:

$$ETR = \Phi_{PSII} \times PPFD_{abs} \times 0,5 \quad (3.2)$$

donde Φ_{PSII} es el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II, $PPFD_{abs}$ es la fracción de PPFD absorbido (0,85), y 0,5 es la constante que explica la partición de electrones entre el PSII y el PSI. El rendimiento cuántico efectivo de PSII se estimó utilizando:

$$\Phi_{PSII} = (Fm' - Ft) / Fm' \quad (3.3)$$

donde Fm' es la intensidad de fluorescencia máxima producida por un flash de saturación de 1 s ($7000 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD) y Ft es la intensidad de fluorescencia a estado estacionario de la fotosíntesis bajo un PPFD de $1500 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$. La eficiencia intrínseca de PSII (Fv' / Fm'), parámetro que describe la eficiencia cuántica si todos los centros de PSII estuvieran abiertos, se calculó como:

$$Fv' / Fm' = (Fm' - Fo') / Fm' \quad (3.4)$$

donde Fo' es la intensidad de fluorescencia mínima después de un pulso oscuro de 6 s y un pulso de rojo lejano de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5 s (que comenzó 1 s antes de que se apague la luz).

El rendimiento cuántico máximo de PSII (F_v/F_m) se estimó en la mañana (10:00 – 11:00 h, hora solar) siguiente a las mediciones de intercambio gaseoso de la tarde en el segundo año (2015-16). Las hojas se mantuvieron durante 30 minutos en la oscuridad dentro de sobres de papel de aluminio según lo recomendado por Murchie y Lawson (2013). El cálculo de F_v/F_m fue:

$$F_v / F_m = (F_m - F_o) / F_m \quad (3.5)$$

donde F_m es la intensidad máxima de fluorescencia producida por un flash de saturación de 1 s ($7000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD) en la oscuridad y F_o es la fluorescencia mínima antes del pulso de flash.

3.2.4 Flujo de savia del árbol entero

El flujo de savia se midió en cuatro árboles T0 y cuatro árboles T+ cv Arbequina (i.e., un árbol por OTC) durante tres días consecutivos en febrero y tres días consecutivos en marzo de 2016 utilizando el método de balance de calor (Flow 32, Dynamax Inc., TX, EE. UU.). El método consiste en aplicar una cantidad conocida de calor (P_{in}) en todo el perímetro del tronco y medir la disipación de calor vertical (i.e., hacia arriba y abajo; Q_u y Q_d) y radial (Q_r) utilizando termocuplas. El calor disipado por el flujo de la savia (Q_f) se calcula descontando de P_{in} los valores de Q_u , Q_d y Q_r , mientras que la tasa de flujo (F) es Q_f dividida por la diferencia promedio de temperatura (dT) entre las termocuplas de flujo ascendente y descendente y la capacidad calorífica del agua (C_p). El flujo de savia no se midió en cv Coratina debido a limitaciones en el tamaño de sensores disponibles. Los sensores (modelos SGB16 y SGB25) se instalaron en el tronco principal a una altura de 20 cm por encima del suelo, y el diámetro del tronco varió entre 21,4 y 25,0 mm. Los troncos se limpiaron antes de la instalación, pero no se modificaron de otro modo. La potencia suministrada a los sensores se ajustó diariamente cambiando la entrada

del calentador (se utilizaron 5 W o menos) para evitar el calentamiento del tronco, lo que puede provocar el agrietamiento de la corteza y otros daños (Rousseaux et al., 2009). Los sensores se conectaron a un registrador de datos Campbell CR10X (Campbell Scientific, Logan, UT, EE. UU.) y se obtuvieron promedios de 15 min de datos que se registraron cada 60 s. El flujo de savia (g h^{-1}) de cada árbol se corrigió luego por su área foliar total ($\text{g h}^{-1} \text{m}^{-2}$). Además, se llevó a cabo un breve experimento durante un día completo en árboles cv Arbequina de similar tamaño y edad para evaluar si los valores de flujo de savia promediados cada 5 min indicaban si se habían producido oscilaciones estomáticas en estos árboles jóvenes.

3.2.5 Características de los estomas y área foliar

Se tomaron muestras en la madrugada de un par de hojas completamente expandidas del mismo nudo y de dos árboles por OTC para determinar sus características morfo-anatómicas. Estas hojas se desarrollaron bajo los tratamientos térmicos, T0 y T+, y las muestras se tomaron durante los veranos de 2014-15 y 2015-16. Una de las hojas del par se usó para determinar la densidad estomática, las dimensiones estomáticas (longitud, anchura y su relación) y la densidad del tricomas en la superficie abaxial de la hoja. La otra hoja se usó para determinar la masa foliar específica y área foliar. En el laboratorio en condiciones de oscuridad, los tricomas se retiraron utilizando cinta adhesiva para facilitar la aplicación de una capa delgada de esmalte de uñas transparente para obtener improntas de hojas. El esmalte de uñas se aplicó en el centro de la hoja, a ambos lados de la nervadura central. Se usó una pinza de punta fina para despegar la impronta una vez seca. Las improntas se observaron utilizando un microscopio compuesto con un aumento de 500x (microscopio DMLB LEICA, Leica Inc., Buffalo, NY, EE. UU.). Se capturaron tres imágenes de área foliar conocida por impresión de hoja

utilizando el software Leica QWin, a las que se le contaron todos los estomas y las bases de todos los tricomas eliminados. La longitud y anchura del estoma se midieron en cinco estomas por imagen para un total de 15 estomas por impronta de hoja.

Para determinar la masa foliar específica y el área foliar se obtuvieron dos discos de área conocida ($33,16 \text{ mm}^2$) de cada hoja usando un sacabocados. Los discos y el resto de la hoja se secaron en un horno a $75\text{-}80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar un peso constante y luego se pesaron con una balanza de precisión. El área de la hoja (cm^2) se calculó dividiendo el peso seco de toda la hoja por la masa específica de la hoja (mg cm^{-2}).

3.2.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando ANOVA para efectos fijos y una prueba de Duncan posterior, para evaluar las diferencias entre las medias de tratamiento ($p \leq 0,05$) con el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2018). Los supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos se confirmaron previamente mediante las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Los datos de la relación ancho/largo de estomas y de la transpiración de la hoja correspondientes a la medida de aclimatación de febrero se transformaron utilizando las funciones $\frac{1}{x}$ y $\sqrt[2]{x}$ respectivamente ya que la distribución no era normal. Sin embargo en los cuadros 3.5 y 3.6 se muestran los valores promedios sin transformar para cada combinación de tratamientos para una mejor interpretación de los datos. Adicionalmente, a partir de las mediciones simultáneas de intercambio gaseoso y fluorescencia obtenidos de las mediciones de aclimatación se evaluó la relación entre A_{max} y ETR ajustando la mejor regresión lineal para cada combinación de tratamiento térmico x temperatura de medición y, a partir de la prueba F de suma de cuadrados extra, se compararon los ajustes

independientes vs un ajuste global usando utilizando el software Graph-Pad Prism versión 6.01 (GraphPad Prism Software, Inc., LaJolla, CA, EE. UU.).

3.3 Resultados

3.3.1 Temperaturas diarias del aire durante las mediciones de intercambio gaseoso

Durante las mediciones de intercambio de gases, la temperatura del aire y el DPV en la cámara de la hoja fueron mayores en el tratamiento T+ que en T0 para todas las fechas de medición ($p \leq 0,01$; cuadro 3.1), imitando las condiciones térmicas dentro de las OTCs. La temperatura del aire durante las mediciones de verano en la cámara de la hoja para T0 fue de 30 a 35 °C, mientras que la de T + fue de 33 a 40 °C. Por lo tanto, la temperatura de la cámara de la hoja en el tratamiento T+ fue de 3-5 °C superior a la de T0. En la medición de otoño del segundo año, los valores de temperatura de la cámara foliar fueron mucho más bajos (15 a 20 °C), pero se mantuvo la diferencia significativa entre las temperaturas para T0 y T+.

Cuadro 3.1. Temperatura media del aire y déficit de presión de vapor de la cámara de la hoja durante las mediciones de intercambio de gases de hojas control (T0) y calentadas (T+). Todas las hojas se formaron durante el período experimental en las OTCs, con excepción de las hojas de diciembre de 2014. Se muestran los valores medios \pm 1 error estándar ($n = 8$). Se evaluaron las diferencias estadísticas entre los tratamiento térmicos en cada fecha de medición utilizando un ANOVA de efectos fijos. En todas las fechas se detectaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre tratamientos en ambas variables analizadas.

Temporada	Meses	Momento del día	Temperatura del aire (°C)		Déficit de presión de vapor (kPa)	
			T0	T+	T0	T+
2014-2015	Diciembre	Mañana	30,4 \pm 0,5	33,0 \pm 0,3	1,65 \pm 0,07	1,97 \pm 0,04
	Febrero	Tarde	35,4 \pm 0,2	40,4 \pm 0,4	2,92 \pm 0,07	3,94 \pm 0,12
		Mañana	31,4 \pm 0,2	36,4 \pm 0,6	1,88 \pm 0,09	2,54 \pm 0,05
	Marzo	Tarde	29,5 \pm 0,1	33,7 \pm 0,2	1,57 \pm 0,01	2,35 \pm 0,05
		Mañana	30,0 \pm 0,5	34,7 \pm 0,3	1,96 \pm 0,04	2,65 \pm 0,07
2015-2016	Febrero	Tarde	34,5 \pm 0,1	39,1 \pm 0,1	2,12 \pm 0,02	3,35 \pm 0,03
	Marzo	Tarde	34,5 \pm 0,0	39,1 \pm 0,0	3,04 \pm 0,04	3,71 \pm 0,06
	Mayo	Tarde	15,2 \pm 0,0	20,6 \pm 0,2	0,97 \pm 0,02	1,48 \pm 0,03

3.3.2 Fotosíntesis de hojas, transpiración y eficiencia en el uso del agua

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en A_{\max} entre las hojas de T0 y T+ en ninguna de las fechas evaluadas (figura 3.1a y b). Con la excepción de las mediciones de diciembre de 2015, todas las hojas medidas se formaron durante el período experimental. Cv Arbequina tuvo valores de A_{\max} significativamente más altos que cv Coratina por la tarde a mediados del verano (febrero de 2015 y 2016), pero no más tarde en la temporada. Los valores promedio más altos registrados en el verano para ambos cultivares fueron de aproximadamente 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los valores de A_{\max} fueron consistentemente más bajos en ambos cultivares cuando se midieron en otoño (mayo del año 2) a temperaturas más bajas.

A diferencia de A_{\max} , la tasa de transpiración de las hojas (E) fue mayor en las hojas T+ que en las hojas T0 en la mayoría de las fechas evaluadas durante el verano (figura 3.1c y d). Las tasas de transpiración fueron bajas ($\sim 2 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el otoño

(mayo) debido a las bajas temperaturas (cuadro 3.1), y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. No se encontraron diferencias en E entre los cultivares ($p \leq 0,05$) en el año 1, aunque E fue más alta en cv Arbequina que en cv Coratina durante el verano del segundo año.

Debido a la mayor E en las hojas del tratamiento T+, la EUA (A_{\max}/E) fue más baja en las hojas calentadas T+ que en las hojas de control T0 en todas las mediciones de verano (figura 3.1e y f). En el otoño, la EUA fue mucho más alta que en el verano debido a la baja E, pero no hubo diferencias entre las hojas T0 y T+.

La conductancia estomática fue similar entre los tratamientos, excepto en las mediciones realizadas en la mañana de febrero en el año 1, donde T+ tuvo valores más altos que T0, y en mayo en el año 2, donde el patrón fue el inverso (cuadro 3.2). En adición, g_s fue similar entre cultivares excepto en las mediciones realizadas en febrero y marzo en el año 2, donde cv Arbequina tuvo valores más altos que cv Coratina.

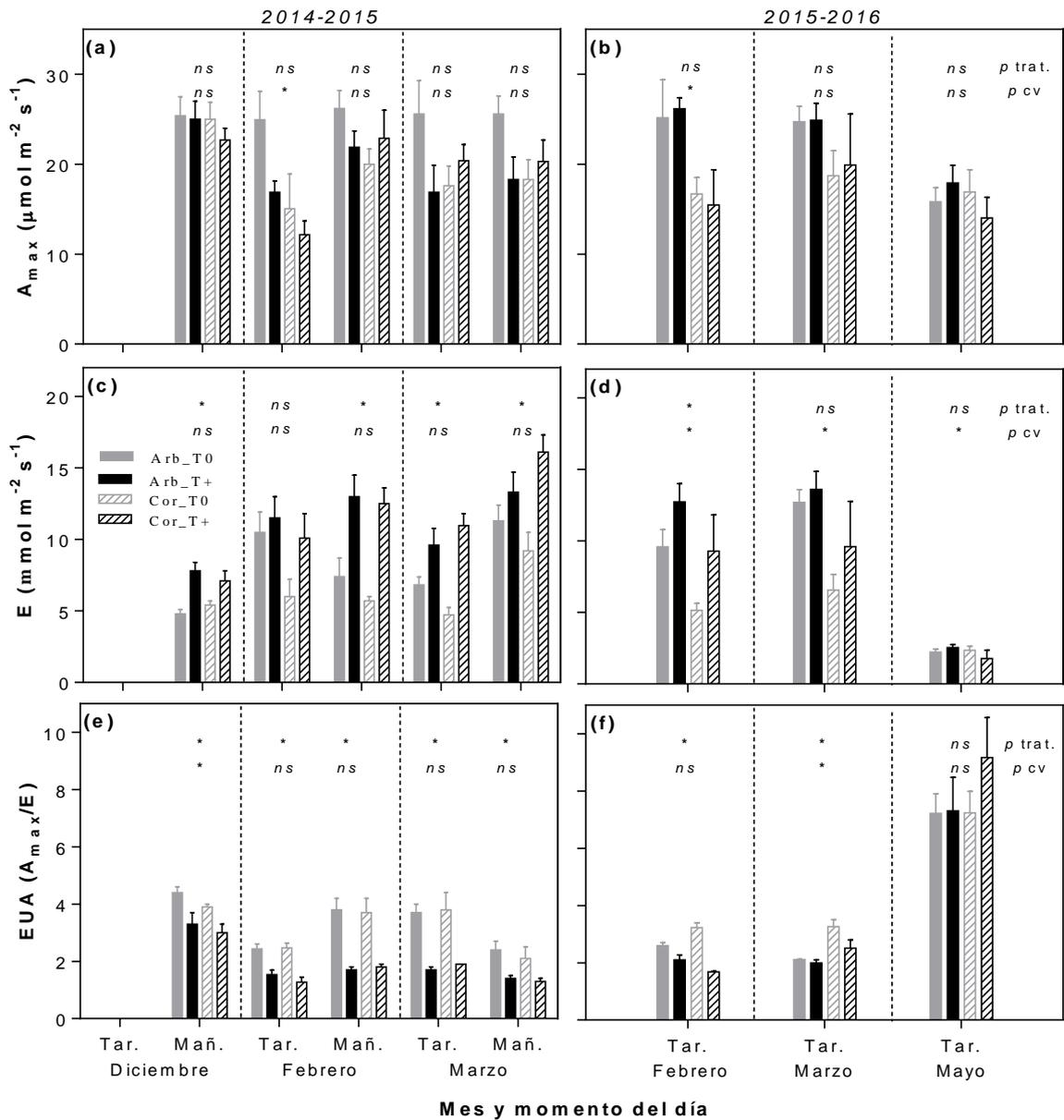


Figura 3.1. Fotosíntesis neta de la hoja a saturación lumínica (A_{max} ; a, b), transpiración (E ; c, d) y eficiencia de uso del agua (EUA; e, f) en hojas de olivo control (T0) y calentados (T+) de los cvs Arbequina (Arb) y Coratina (Cor) durante dos temporadas de crecimiento (2014-15, 2015-16). Las mediciones se realizaron en la tarde (Tar.) y/o en la mañana (Mañ.) en 2014-15 y en la tarde en 2015-16. Cada barra representa una media ± 1 error estándar ($n = 4$). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) en cada período de medición utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; ns = no significativo). La interacción entre los factores no fue significativa en ninguna de las fechas evaluadas.

Cuadro 3.2. Conductancia estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en hojas control (T0) y calentadas (T+) de olivo cvs Arbequina y Coratina durante dos temporadas de crecimiento (2014-15, 2015-16). Las mediciones se realizaron en la tarde y la mañana en 2014-15 y en la tarde en 2015-16. Cada valor representa una media \pm 1 error estándar ($n = 4$). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmicos (trat.) y cultivar (cv) en cada período de medición utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; *ns* = no significativo). No se detectó interacción entre los factores en ninguna de las fechas de medición.

Temporada	Mes	Momento del día	cv Arbequina		cv Coratina		<i>p</i> -valor	
			T0	T+	T0	T+	Trat.	cv
2014-2015	Diciembre	Mañana	202 \pm 8	261 \pm 22	231 \pm 28	240 \pm 29	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	Febrero	Tarde	235 \pm 37	182 \pm 29	132 \pm 33	162 \pm 36	<i>ns</i>	<i>ns</i>
		Mañana	276 \pm 35	361 \pm 39	208 \pm 12	343 \pm 34	*	<i>ns</i>
	Marzo	Tarde	298 \pm 26	270 \pm 38	200 \pm 24	309 \pm 22	<i>ns</i>	<i>ns</i>
		Mañana	394 \pm 28	332 \pm 48	315 \pm 40	404 \pm 27	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	2015-2016	Febrero	Tarde	297 \pm 43	240 \pm 25	154 \pm 15	170 \pm 48	<i>ns</i>
Marzo		Tarde	273 \pm 20	231 \pm 23	138 \pm 26	156 \pm 49	<i>ns</i>	*
Mayo		Tarde	175 \pm 18	126 \pm 10	186 \pm 22	103 \pm 30	*	<i>ns</i>

3.3.3 Fluorescencia de clorofila

Similar a A_{max} , no se encontraron diferencias en el rendimiento cuántico efectivo de PSII (Φ_{PSII}) y la tasa de transporte de electrones (ETR), de T0 y T+ durante el verano de 2014-15 (datos no mostrados) y 2015-16 (cuadro 3.3). Cv Arbequina también tuvo valores de Φ_{PSII} y ETR significativamente más altos que el cv Coratina en la tarde de febrero de 2016 como ocurrió con A_{max} . En el verano, la relación Fv/Fm, que se midió temprano en la mañana, fue de alrededor de 0,80, independientemente del tratamiento térmico y el cultivar. Sin embargo, en el otoño (mayo), Fv/Fm fue significativamente mayor en las hojas T+ de ambos cultivares que en las hojas T0, probablemente debido a las temperaturas frías limitantes en las hojas T0 (aprox. 1,5 °C) en comparación con las hojas T+ (~5,0 °C).

Cuadro 3.3. Fluorescencia de la clorofila en hojas control (T0) y calentadas (T+) de olivos cvs Arbequina y Coratina durante la segunda temporada (2015-16). Los valores medios \pm 1 error estándar (n=4) se muestran para cada fecha de medición. Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) o cultivar (cv) en cada período de medición utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; *ns* = no significativo). No se observó interacción entre los factores.

Mes	Cultivar/ Temperatura	Hojas adaptadas a la luz			Hojas adaptadas a la oscuridad		
			Φ_{PSII}^1	ETR ²	Fv/Fm ³	Fo	Temp. noche anterior (°C)
Febrero	Arbequina	T0	0,32 \pm 0,02	203 \pm 12	0,80 \pm 0,01	383 \pm 46	29,4 \pm 0,3
		T+	0,31 \pm 0,02	193 \pm 14	0,77 \pm 0,01	429 \pm 66	31,3 \pm 0,4
	Coratina	T0	0,26 \pm 0,03	167 \pm 19	0,79 \pm 0,00	358 \pm 88	29,7 \pm 0,1
		T+	0,22 \pm 0,04	138 \pm 26	0,72 \pm 0,05	570 \pm 12	31,2 \pm 0,4
		<i>p</i> trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
		<i>p</i> cv	*	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Marzo	Arbequina	T0	0,27 \pm 0,02	174 \pm 14	0,81 \pm 0,01	384 \pm 46	20,9 \pm 0,3
		T+	0,28 \pm 0,01	179 \pm 9	0,80 \pm 0,01	344 \pm 90	22,4 \pm 0,4
	Coratina	T0	0,25 \pm 0,01	160 \pm 7	0,81 \pm 0,01	530 \pm 8	21,3 \pm 0,1
		T+	0,19 \pm 0,04	122 \pm 27	0,79 \pm 0,01	532 \pm 25	23,4 \pm 0,5
		<i>p</i> trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
		<i>p</i> cv	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>
Mayo	Arbequina	T0	0,12 \pm 0,01	75 \pm 7	0,63 \pm 0,03	478 \pm 27	1,3 \pm 0,2
		T+	0,16 \pm 0,01	99 \pm 5	0,68 \pm 0,01	375 \pm 92	5,3 \pm 1,1
	Coratina	T0	0,13 \pm 0,01	84 \pm 3	0,59 \pm 0,02	402 \pm 63	1,6 \pm 0,1
		T+	0,12 \pm 0,03	74 \pm 16	0,68 \pm 0,02	336 \pm 128	4,9 \pm 0,4
		<i>p</i> trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	*
		<i>p</i> cv	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

3.3.4 Flujo de savia del árbol entero

El flujo de savia a nivel del árbol entero proporcionó una medición integrada de la transpiración. El flujo de savia por unidad de área foliar durante dos períodos de 3 días consecutivos durante el verano de 2015-16 siguió una dinámica similar que el DPV y la temperatura en ambos tratamientos térmicos, con los mayores valores durante las horas diurnas (figura 3.2). En promedio, el flujo de savia diario en T+ fue alrededor de 20 % mayor en enero y 80 % en marzo que en T0, aunque estas diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas (cuadro 3.4). Además, el flujo de savia diario fue mayor tanto en los árboles T0 y T+ durante el período de enero que en marzo debido

a las mayores temperaturas y el DPV en enero. Por último, un breve experimento con una alta frecuencia de medición del flujo de savia (i.e., cada 5 min) no indicó ninguna oscilación pronunciada en el flujo de savia en las condiciones experimentales (Apéndice II), lo cual afianza la confiabilidad en las determinaciones de g_s .

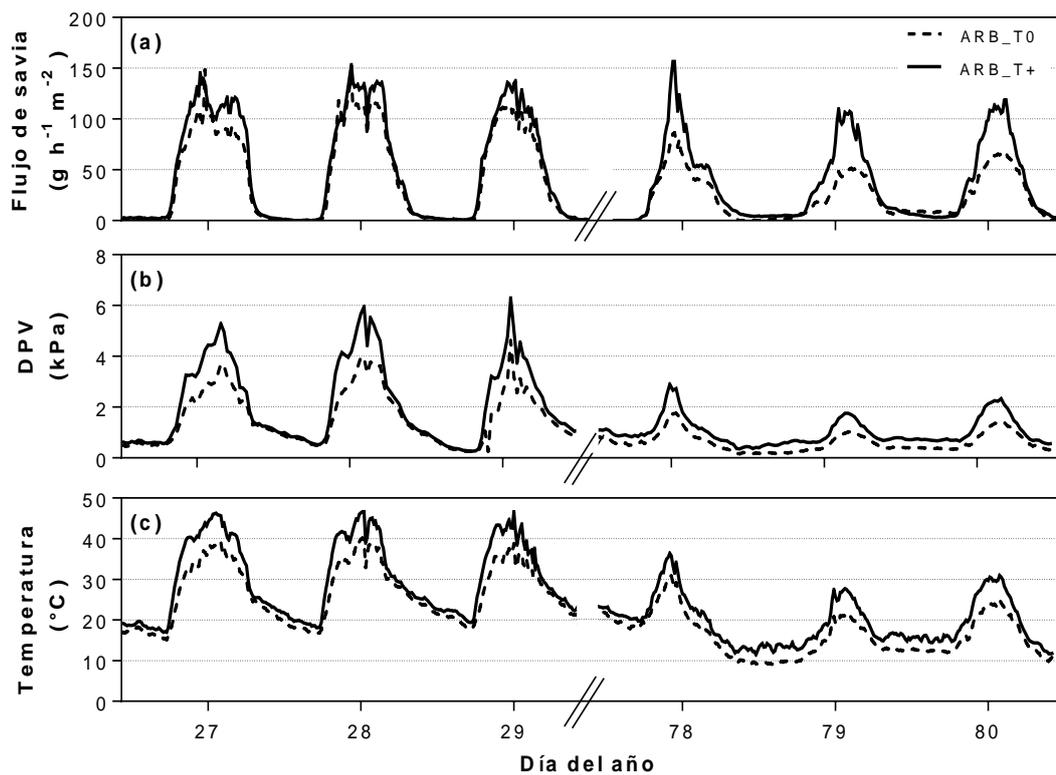


Figura 3.2. Dinámica diaria del flujo de savia en base al área foliar (a), déficit de presión de vapor (DPV; b) y temperatura del aire (c) del cv Arbequina en las OTCs control (T0) y calentadas (T+). Los datos corresponden a períodos de 3 días a fines de enero y marzo de 2016. Las líneas representan la media de cuatro repeticiones por tratamiento ($n = 4$). Los datos fueron registrados cada 15 min por un datalogger.

Cuadro 3.4. Flujo de savia diario ($\text{kg día}^{-1} \text{m}^{-2}$) en olivos cv Arbequina creciendo en OTCs control (T0) y calentada (T+). Los datos se registraron a intervalos de 15 minutos durante tres días consecutivos en enero y marzo de 2016. Se muestran los valores promedios \pm 1 error estándar ($n=4$) para cada tratamiento térmico.

Mes	Día del año	Flujo de savia diario ($\text{kg día}^{-1} \text{m}^{-2}$)	
		T0	T+
Enero	27	1,02 \pm 0,09	1,32 \pm 0,27
	28	1,11 \pm 0,13	1,28 \pm 0,29
	29	0,97 \pm 0,17	1,14 \pm 0,24
	Promedio	1,04 \pm 0,12	1,25 \pm 0,27
Marzo	78	0,54 \pm 0,05	0,96 \pm 0,19
	79	0,43 \pm 0,04	0,93 \pm 0,18
	80	0,60 \pm 0,06	1,03 \pm 0,22
	Promedio	0,53 \pm 0,05	0,97 \pm 0,20

3.3.5 Aclimatación térmica del intercambio de gases de la hoja

En febrero y marzo de la segunda temporada, A_{max} , g_s y E se midieron en las hojas T0 y T+ a 35 °C (i.e., la temperatura del aire en las OTCs T0 en el momento de la medición) y también a 39 °C (i.e., la temperatura del aire de las OTCs T+) (cuadro 3.5). En febrero, A_{max} de T0 y T+ fueron mayores cuando se evaluaron a sus respectivas temperaturas de medición (i.e., T0 a 35 °C y T+ a 39 °C) en comparación a las mediciones con las temperaturas cruzadas (i.e., T0 a 39 °C y T+ a 35 °C) (p trat x temp. medición \leq 0,05). Contrariamente, E fue estadísticamente mayor en T+ en comparación con el control T0, independientemente de la temperatura de medición. Como consecuencia, E_{UA} fue mayor en T0 medido a 35 °C seguido por T0 a 39 °C, mientras que T+ tuvo los valores más bajos y no hubo diferencia entre las mediciones a 35 y 39 °C en T+ (p trat x temp medición \leq 0,05). En cuanto a g_s , se detectaron diferencias significativas entre las dos temperaturas de medición, siendo g_s a 35 °C mayor que a 39 °C, independientemente del tratamiento térmico y cultivar. En adición, hubo diferencias significativas en A_{max} , g_s y E , siendo los valores en cv Arbequina mayores que en cv Coratina.

Cuadro 3.5. Aclimatación térmica de la tasa de fotosíntesis neta a saturación lumínica (A_{\max} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la conductancia estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), la transpiración (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y eficiencia de uso del agua (EUA, i.e., A_{\max}/E) en hojas control (T0) y calentadas (T+) de olivos cvs Arbequina y Coratina durante la segunda temporada (2015-16). Las hojas formadas en las OTCs T0 o T+ se midieron a 35 °C y 39 °C. Se muestran los valores medios \pm 1 error estándar ($n = 4$). Las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.), cultivar (cv), temperatura de medición (temp. medición) o las interacciones entre los factores se evaluaron en cada temporada de crecimiento utilizando un ANOVA (* = significativo a $p \leq 0,05$; *ns* = no significativo). No se observó triple interacción entre los factores.

Mes	Cultivar	Temp. de medición (°C) ¹	Trat. térmico	Parámetros fotosintéticos de intercambio de gases				
				A_{\max}	g_s	E	EUA	
Febrero	Arbequina	35	T0	25,2 \pm 4,2	297 \pm 43	9,6 \pm 1,2	2,6 \pm 0,1	
		35	T+	19,0 \pm 1,4	282 \pm 35	10,5 \pm 0,9	1,8 \pm 0,0	
		39	T0	19,6 \pm 1,8	147 \pm 22	8,7 \pm 1,0	2,3 \pm 0,1	
		39	T+	26,2 \pm 1,2	240 \pm 25	12,7 \pm 1,3	2,1 \pm 0,2	
		Coratina	35	T0	16,7 \pm 1,9	154 \pm 15	5,2 \pm 0,5	3,2 \pm 0,2
			35	T+	11,1 \pm 3,5	176 \pm 50	6,5 \pm 1,6	1,6 \pm 0,2
			39	T0	14,0 \pm 2,2	114 \pm 20	5,9 \pm 1,0	2,4 \pm 0,2
			39	T+	15,5 \pm 3,9	170 \pm 48	9,3 \pm 2,5	1,7 \pm 0,0
				<i>p</i> trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	*
				<i>p</i> cv	*	*	*	<i>ns</i>
				<i>p</i> temp. medición	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>
				<i>p</i> trat. x cv	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
				<i>p</i> trat. x temp. medición	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
				<i>p</i> cv x temp. medición	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Marzo	Arbequina	35	T0	24,7 \pm 1,7	273 \pm 20	12,7 \pm 0,9	1,9 \pm 0,0	
		35	T+	24,1 \pm 2,4	277 \pm 30	12,9 \pm 1,3	1,9 \pm 0,2	
		39	T0	25,8 \pm 1,7	215 \pm 29	12,8 \pm 1,5	2,1 \pm 0,2	
		39	T+	24,9 \pm 1,9	231 \pm 23	13,6 \pm 1,3	1,8 \pm 0,1	
		Coratina	35	T0	18,7 \pm 2,8	138 \pm 26	6,6 \pm 1,1	2,9 \pm 0,2
			35	T+	16,6 \pm 2,2	164 \pm 40	7,7 \pm 1,7	2,3 \pm 0,3
			39	T0	26,0 \pm 1,2	167 \pm 30	10,0 \pm 1,6	2,8 \pm 0,4
			39	T+	19,9 \pm 5,7	156 \pm 49	9,6 \pm 3,2	2,2 \pm 0,2
				<i>p</i> trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*
				<i>p</i> cv	*	*	*	*
				<i>p</i> temp. medición	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
				<i>p</i> trat. x cv	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
				<i>p</i> trat. x temp. medición	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
				<i>p</i> cv x temp. medición	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

¹ Temperatura del aire de la cámara de la hoja durante las mediciones.

En marzo se encontraron diferencias entre los cultivares para A_{max} , g_s y E , pero no se encontraron entre el tratamiento térmico, la temperatura de medición o la interacción entre ambos factores (cuadro 3.5). La EUA fue más baja en T+ que en T0 a cualquier temperatura de medición y también se detectaron diferencias entre los cultivares, pero no hubo interacciones entre ninguno de los factores evaluados.

Paralelamente a las mediciones de intercambio de gases de febrero, F_v'/F_m' no fue afectado ni por el tratamiento térmico ni por la temperatura de medición pero sí hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre cultivares. La relación F_v'/F_m' fue 0,51 en cv Arbequina y 0,41 en cv Coratina. La relación entre A_{max} y ETR ajustó en una misma regresión lineal en todas las combinaciones de tratamiento térmico x temperatura de medición ($r^2 = 0,69$), con excepción de T0 a 39 °C que tuvo una regresión significativamente diferente ($p \leq 0,05$, $r^2 = 0,70$) e independiente del resto (figura 3.3).

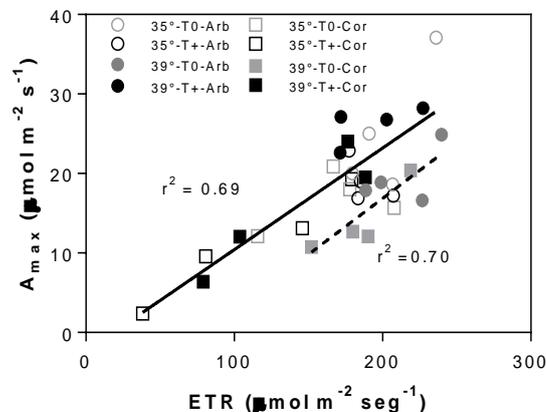


Figura 3.3. Fotosíntesis neta a saturación lumínica (A_{max}) en función de la tasa de transporte de electrones (ETR) de hojas de olivos cvs Arbequina (Arb) y Coratina (Cor) bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). En 2015-16 las hojas formadas en las OTCs T0 o T+ se midieron a 35 °C y 39 °C. Los valores corresponden a la medición de febrero de 2016. Cada punto representa una repetición para cada combinación de cultivar x tratamiento térmico x temperatura de medición ($n = 4$). El ajuste independiente de cada tratamiento térmico x temperatura de medición se comparó con un ajuste global mediante una prueba F de suma de cuadrados extra. Los parámetros de ajuste de T+ y T0 a 35 °C y T+ a 39 °C no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0,05$) por lo que un modelo lineal ($r^2 = 0,69$ y $y = 0,13 * x - 2,4$) caracterizó a estas combinaciones de tratamientos, mientras T0 a 39 °C tuvo una regresión independiente ($r^2=0,70$; $y = 0,14 * x - 11,4$).

3.3.6 Características de los estomas y área foliar

El área foliar de hojas individuales mostró una interacción entre factores significativa la primera temporada de crecimiento, con las hojas de cv Coratina que se formaron en las OTCs T0+ con menos área que las hojas de las OTCs T0, mientras que en cv Arbequina el área de las hojas fue similar entre tratamientos térmicos (cuadro 3.6). En contraste, no se observó interacción en la segunda estación de crecimiento. La masa foliar específica fue muy similar entre cultivares y estaciones de crecimiento, y no se encontró respuesta a la temperatura en ninguna de las estaciones.

Los estomas en la superficie abaxial de la hoja tendieron a ser más largos y más anchos en las hojas formadas en las OTCs T+ que las hojas de las OTCs T0 en cada cultivar durante las dos estaciones de crecimiento (cuadro 3.6), con diferencias estadísticamente significativas detectadas para el ancho en la primera estación de crecimiento y la longitud y el ancho en la segunda temporada de crecimiento. Además, la relación entre longitud y anchura del estoma fue menor en las hojas T+ que en las T0 en la primera temporada.

La densidad de estomas y tricomas también se determinó en ambas estaciones (figura 3.4). En la primera temporada, no hubo diferencias significativas en la densidad estomática entre los tratamientos de temperatura o los cultivares (figura 3.4a). Sin embargo, la densidad estomática fue mayor en las hojas T+ que en las hojas T0 de la segunda temporada en ambos cultivares (2015-16, figura 3.4b). En contraste, la densidad de tricomas fue menor en las hojas T+ en ambos cultivares en la primera temporada, pero no se encontraron diferencias significativas en la segunda temporada (figura 3.3c y d). En ambas temporadas, cv Coratina tuvo una mayor densidad de tricomas que en cv Arbequina.

Cuadro 3.6. Área foliar individual, masa foliar específica y características estomáticas en hojas de olivos cvs Arbequina y Coratina que se formaron bajo los tratamientos control (T0) y calentado (T+) en dos temporadas de crecimiento (2014-15 y 2015-16). Se muestran los valores medios \pm 1 error estándar ($n = 4$). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción entre ambos factores (int.) en cada temporada de crecimiento utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo a $p \leq 0,05$; *ns* = no significativo). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \text{ int} \leq 0,05$).

Temporada	Cultivar	Tratamiento térmico	Características anatómicas				
			Hoja		Estoma		
			Área (cm ²)	Masa foliar específica (mg cm ⁻²)	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Relación largo/ancho
2014-2015	Arbequina	T0	3,03 \pm 0,24c	16,5 \pm 0,3	20,3 \pm 0,3	11,3 \pm 0,3	1,80 \pm 0,08
		T+	3,20 \pm 0,16 c	14,8 \pm 1,0	20,8 \pm 0,3	13,1 \pm 0,1	1,58 \pm 0,01
	Coratina	T0	4,81 \pm 0,35 a	15,9 \pm 0,6	21,3 \pm 0,5	12,3 \pm 0,4	1,73 \pm 0,03
		T+	3,57 \pm 0,28 b	15,5 \pm 0,7	22,3 \pm 1,0	13,4 \pm 0,9	1,67 \pm 0,05
	<i>p</i> trat.	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	*	
	<i>p</i> cv	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
	<i>p</i> int.	*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
2015-2016	Arbequina	T0	4,68 \pm 0,31	16,5 \pm 0,3	22,3 \pm 0,5	15,2 \pm 0,3	1,47 \pm 0,02
		T+	5,01 \pm 0,17	15,8 \pm 0,7	23,4 \pm 0,4	16,1 \pm 0,5	1,45 \pm 0,04
	Coratina	T0	5,29 \pm 0,32	15,5 \pm 0,6	22,4 \pm 0,4	14,9 \pm 0,2	1,50 \pm 0,01
		T+	4,68 \pm 0,61	15,7 \pm 0,5	23,3 \pm 0,2	15,4 \pm 0,3	1,52 \pm 0,02
	<i>p</i> trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	*	<i>ns</i>	
	<i>p</i> cv	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	
	<i>p</i> int.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	

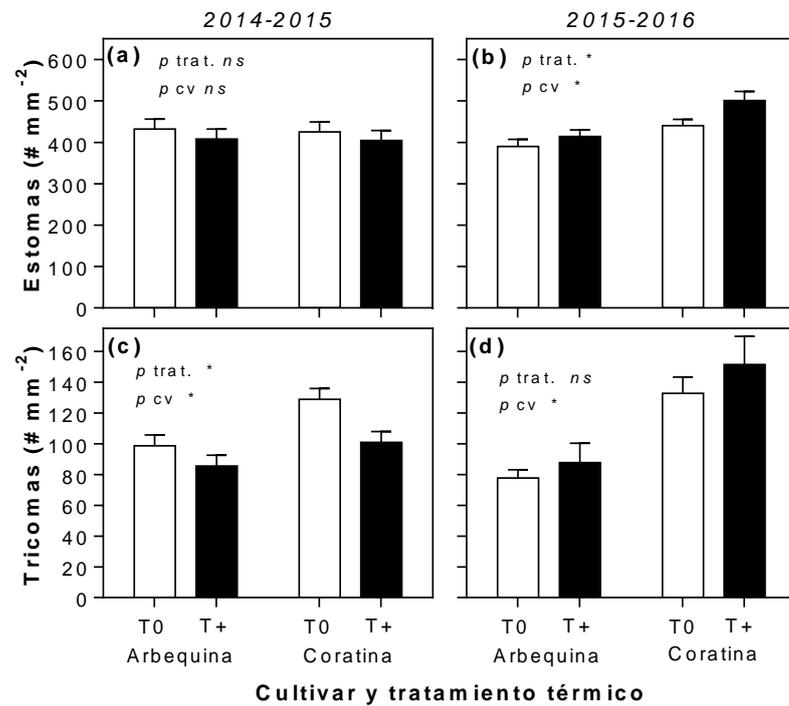


Figura 3.4 Densidad de estomas (a, b) y tricomas (c, d) en hojas de olivos cvs Arbequina y Coratina formadas bajo los tratamientos control (T0) y calentado (T+) en dos temporadas de crecimiento (2014-15: a y c; 2015-16: b y d). Se muestran los valores medios \pm 1 error estándar ($n = 4$). Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) en cada temporada de crecimiento utilizando un ANOVA de dos vías (* = significativo en $p \leq 0,05$; ns = no significativo). No se observó interacción significativa entre los factores.

3.4 Discusión

En las últimas décadas creció el interés por comprender cómo el aumento de la temperatura debido al calentamiento global podría impactar en la producción de olivo en áreas áridas y semiáridas, pero existen datos limitados a partir de experimentos de campo sobre esta temática. Además, acompañando el incremento de la temperatura se espera un incremento del DPV debido a condiciones de mayor aridez en algunas regiones, como por ejemplo en la región Andina (Penalba y Rivera, 2013; Zaninelli et al., 2019). Un primer paso para este propósito sería entender cómo la temperatura alta y el DPV afectan los parámetros de intercambio de gases de la hoja. Durante el experimento realizado para

este capítulo, los árboles calentados de olivo cvs Arbequina y Coratina de 2-3 años fueron expuestos a altas temperaturas durante el verano y principios de otoño, alcanzando aproximadamente 40 °C en los meses más cálidos. Además, hubo un moderado incremento del DPV en las OTCs T+ (cuadro 3.1) con la excepción de algunos mediodías de fines de febrero, donde el DPV alcanzó valores altos de 6-7 kPa (e.g., figura 3.2b).

El intercambio de agua y de carbono de la hoja son dos procesos estrechamente interrelacionados y tienen el potencial de limitar el crecimiento y el rendimiento de las plantas. Ambos procesos son muy sensibles al estrés abiótico, como la alta temperatura, y los mecanismos estomáticos y no estomáticos podrían estar detrás de las respuestas de las plantas. Además, los efectos de la alta temperatura en los parámetros de intercambio gaseoso en hojas de olivo podrían variar según el grado de estrés térmico, pero está bien documentado que también varían según el estado hídrico de la planta (Haworth et al., 2018; Marino et al., 2018). En nuestro estudio, los olivos bien regados, expuestos a altas temperaturas (3-5 °C por encima del control) no mostraron una disminución aparente en la actividad de la fotosíntesis, a pesar de haber estado expuestos a una temperatura del aire de alrededor de 40 °C durante algunas mediciones (figura 3.1a y b; cuadro 3.1). De hecho, los valores de A_{\max} fueron de alrededor de 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en todo el rango de 30-40 °C cubierto durante las mediciones de ambos años. En contraste, Ben Ahmed et al. (2007) informaron que olivos cv Chemlali en campo e irrigados con 66 % de ETc tenían una A_{\max} máxima a 30 °C, pero llegaron a casi cero a 40 °C. Los valores de fotosíntesis mostrados en este capítulo están en concordancia con los informados por Marino et al. (2018), Albarracín et al. (2017) en cv Arbequina y Angelopoulos et al. (1996) en el cv Coratina, en un rango de temperatura y DPV similar al de los controles T0 expuestos en nuestros resultados. De manera similar, bajo nuestras condiciones el calentamiento no afectó g_s , que estuvo alrededor de los 240 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cuadro 3.2). Similar a la

fotosíntesis, los valores de g_s aquí reportados fueron moderados a altos, comparables a los reportados por Trentacoste et al. (2018) y Albarracín et al. (2017) en cv Arbequina en condiciones bien irrigadas y fuera de OTCs.

La energía de la luz absorbida por las moléculas de clorofila puede: conducir la fotosíntesis (fotoquímica), volver a emitirse como calor (“Quenching no fotoquímico”, NPQ) o ser reemitida como luz (fluorescencia); los tres procesos compiten entre sí. Por lo que el rendimiento de la emisión de fluorescencia de la clorofila proporciona información valiosa sobre la eficiencia cuántica de la etapa fotoquímica y la disipación de calor (ver revisiones de Murchie y Lawson 2013). En consistencia con la medición de la asimilación de carbono, en verano no se encontraron diferencias en los parámetros de fluorescencia de la clorofila entre las hojas de árboles creciendo a mayor temperatura en comparación con los controles (cuadro 3.3). La medición de F_v/F_m es una técnica ampliamente utilizada para medir el estrés en hojas adaptadas a la oscuridad ya que este parámetro es un buen indicador del rendimiento cuántico máximo de la química del PSII (ver revisiones de Murchie y Lawson, 2013; Adams y Demmig-Adams, 2004). En presencia de cualquier condición estresante, se espera una reducción de F_v/F_m debido a la fotoinhibición del PSII o la inducción de “quenching” sostenido. Sin embargo, en este estudio, tanto las hojas de los olivos calentados como las de los controles mostraron un alto F_v/F_m , alrededor de 0,8 en verano, valor esperable en condiciones no estresantes. Además, el rendimiento cuántico efectivo de PSII y la tasa de transporte de electrones de las hojas adaptadas a la luz no mostraron cambios como consecuencia del aumento de la temperatura, lo que fortalece los resultados anteriores. En oposición, en otoño (i.e., en la medición de mayo) los parámetros F_v/F_m , Φ_{PSII} y ETR fueron más bajos que en verano, indicando condiciones de crecimiento estresantes para las hojas, probablemente debido a

las bajas temperaturas del aire, principalmente en la noche cuando estuvieron por debajo de 2 °C en las OTCs T0 y alrededor de 5 °C en las OTCs T+ (cuadro 3.3).

A pesar de que la temperatura elevada sostenida no afectó A_{\max} ni g_s , los olivos a mayor temperatura tuvieron una mayor E y, como consecuencia, una menor EUA , y una tendencia similar se observó en el flujo de savia (figura 3.1b y c; figura 3.2a y cuadro 3.4). Dado que el calentamiento no afectó g_s , la mayor transpiración y flujo diario de savia en estos árboles calentados está explicado, al menos en parte, por el mayor DPV asociado a la temperatura más alta. Resultados similares fueron reportados en vides (*vitis vinifera*) bien regadas, donde un calentamiento moderado de 1-2 °C dio como resultado un mayor flujo de savia debido a una área foliar mayor y un DPV ligeramente más alto mientras que la conductancia estomática se mantuvo similar que en el control (Bonada et al., 2018). En condiciones de alta temperatura y disponibilidad limitada de agua en el suelo, está bien documentado que los olivos muestran una estrategia de uso del agua conservativa que reduce la conductancia de los estomas y, por lo tanto, reduce la tasa de fotosíntesis. Sin embargo, bajo las condiciones de campo del experimento de este capítulo con árboles bien regados y DPV moderado a alto, a medida que aumenta la temperatura, g_s no se ve afectado mientras que tasa de transpiración foliar aumenta y con ello la demanda de agua del cultivo.

Las respuestas a nivel de hoja a los cambios en el entorno térmico se producen en un rango de escalas temporales que van desde minutos a temporadas. A escalas de tiempo corto (e.g., minutos a horas), la temperatura del aire (y de la hoja) afecta directamente muchos procesos fisiológicos como la fotosíntesis y la respiración. Las caídas de A_{\max} observadas en este trabajo al cambiar la temperatura instantánea de medición (cuadro 3.5) no estuvieron relacionadas con aumentos de fluorescencia (i.e., F_v/F_m) ni cambios en la relación F_v'/F_m' , parámetro que describe la eficiencia cuántica si todos los centros de

PSII estuvieran abiertos. Este último parámetro refleja cambios en la proporción de NPQ, pero bajo nuestras condiciones este valor se mantuvo estable indicando que la energía absorbida fue destinada a los procesos fotoquímicos de la fotosíntesis y no fue reemitida como calor. En contraste, la distinta relación entre A_{\max} y ETR encontrada en T0 al cambiar su temperatura instantánea de 35 a 39 °C (figura 3.3) proporciona evidencia de que cuando se somete a los árboles de olivo a una temperatura más elevada que aquella a la cual está aclimatado, pueden ocurrir transporte de electrones a destinos alternativos como la fotorrespiración, el metabolismo del nitrógeno y la donación de electrones al oxígeno (i.e., reacción de Mehler). Así los olivos T0 medidos a 39 °C destinaron 25 % menos electrones a fotosíntesis neta que cuando fueron medidos a 35 °C. Además, aunque no se encontró una interacción entre tratamiento térmico y temperatura de medición, g_s se redujo a la mitad (en cv Arbequina) o un cuarto (en cv Coratina) en hojas T0 medidas a 39 °C con respecto a hojas de los mismos árboles medidas a 35 °C señalando una limitación estomática de A_{\max} al aumentar la temperatura instantánea. Por otra parte, las causas del aumento de la fotosíntesis de T+ al aumentar la temperatura de medición (cuadro 3.5) son desconocidas en este experimento, pero no parecerían ser las mismas que para T0.

Las temperaturas de crecimiento pueden impulsar la aclimatación térmica de variables fisiológicas, estructurales, bioquímicas y, también, cambios en la anatomía de las hojas que en su conjunto pueden influir sobre el intercambio de gases. La aclimatación térmica de los procesos fisiológicos es un rasgo común en las plantas que les permite hacer frente a su nueva temperatura de crecimiento sin pérdida de eficiencia fisiológica. Un estudio previo indicó que dentro de las especies C3, las plantas leñosas perennifolias muestran una mayor homeostasis de la fotosíntesis que las leñosas caducifolias (e incluso las plantas C4 y CAM), y propuso que la aclimatación fotosintética podría ser

particularmente importante en las especies perennes leñosas que podrían experimentar un aumento en las temperaturas de la temporada de crecimiento a lo largo de su vida (Yamori et al., 2013), como el olivo. Los resultados presentados en este capítulo indican que en verano, la fotosíntesis en cada tratamiento térmico (i.e., T0 y T+) fue más eficiente cuando la medición se realizó a su correspondiente temperatura, sugiriendo algún tipo de aclimatación térmica (cuadro 3.5), pero los mecanismos detrás de esta respuesta no son del todo claros. En un trabajo reciente sobre 75 géneros y 111 especies de plantas, incluidas las especies C3 y C4, el corrimiento de la temperatura óptima de fotosíntesis fue el cambio relacionado con la aclimatación más comúnmente observado en la fotosíntesis neta, y de esta forma el desempeño del intercambio de CO₂ de la hoja no se vio afectado por el incremento de 4 °C de la temperatura de crecimiento (Vico et al., 2019). En mayo (otoño) la temperatura del aire en ambos tratamientos no representaba el ambiente térmico en el que se habían desarrollado las hojas en las que se midió la fotosíntesis (i.e., eran temperaturas más bajas que en los meses anteriores). Esto podría ser la causa por la que en la medición de mayo no se observaron respuestas de aclimatación térmica de la fotosíntesis como las observadas en la medición de febrero. La escala de tiempo en que se produce la aclimatación térmica de la hoja (i.e., la velocidad de aclimatación) es todavía incierto en los diferentes grupos funcionales de plantas, particularmente cuando se consideran condiciones naturales donde la temperatura fluctúa en múltiples escalas de tiempo (segundos, días, estaciones, etc.) (Sendall et al., 2015; Vico et al., 2019).

La plasticidad de las características morfológicas y anatómicas de la hoja al entorno de crecimiento ha sido ampliamente reportada en plantas (e.g., en *Arabidopsis*, Stewart et al., 2016; en *Populus*, Schumaker et al., 1997; en roble, Rodríguez-Calcerrada et al., 2008; en vid, Sadras et al., 2012b). En olivo, los cambios morfo-anatómicos, como

una reducción en el tamaño de las hojas, un aumento en la densidad de los tricomas, una disminución del tamaño de las células epidérmicas y mesófilas, se han explorado ampliamente en condiciones de estrés hídrico, solo o combinado con alta temperatura o salinidad (Bosabalidis y Kofidis, 2002; Bacelar et al., 2004; Bacelar et al., 2006; Ennajeh et al., 2010; Trentacoste et al., 2018), pero no hay información disponible sobre lo que sucede sólo al alterar la temperatura. En todos estos casos, bajo sequía ocurren alteraciones morfo-anatómicas (genotipo dependiente), para ahorrar agua en detrimento de la fotosíntesis. Por el contrario, en olivos cv Arbequina y cv Coratina bien regados a medida que aumenta la temperatura, se producirían ciertas modificaciones morfo-anatómicas de las hojas que podrían favorecer la pérdida de agua (transpiración), relacionadas, como por ejemplo, con una mayor densidad de estomas o una menor densidad de tricomas y algunos cambios en el tamaño de los estomas o su relación largo/ancho (figura 3.4 y cuadro 3.6), aunque los resultados no son concluyentes y se necesita mayor análisis sobre estas posibles repuestas.

3.5 Conclusión

En este capítulo se mostró que el aumento de la temperatura asociado a un DPV más alto podría aumentar la tasa de transpiración del olivo y el requerimiento de agua necesario para su producción. Sin embargo, nuestra comprensión sobre los mecanismos detrás de esta respuesta a la temperatura elevada sostenida está fragmentada. Así, por un lado, en condiciones de buen riego, la temperatura elevada aumenta la tasa de transpiración foliar sin cambios importantes en la fotosíntesis y conductancia estomática, y como consecuencia, reduce la eficiencia en el uso del agua del olivo. Además, se producirían algunas modificaciones anatómicas y morfológicas de las hojas para favorecer la pérdida de agua de manera irreversible. Estos mecanismos ayudarían a

mantener el enfriamiento evaporativo de la hoja. La aclimatación de la fotosíntesis a la temperatura parecería ocurrir en olivo, aunque estudios más profundos y concluyentes son necesarios para determinar los mecanismos detrás de esta respuesta. Por otro lado, independientemente de la temperatura instantánea, hojas de olivos creciendo a mayor temperatura presentan mayor tasa de transpiración foliar y menor EUA que hojas creciendo a menor temperatura, sugiriendo que algunas modificaciones anatómico-morfológicas al menos a nivel de hoja (e.g., mayor densidad o tamaño de estomas) posibilitan la mayor pérdida de agua sin modificar la conductancia estomática. Estos resultados sugieren que el calentamiento global implicaría una mayor demanda de agua del olivo en las próximas décadas para la producción del cultivo.

**Respuestas del crecimiento vegetativo y reproductivo del olivo
(cvs Arbequina y Coratina) al incremento de temperatura
durante la fase de síntesis y acumulación de aceite del fruto***

* Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en la revista *Acta Horticultura: Miserere, A., Searles, P.S., García-Inza, G.P., Rousseaux, M.C., 2018. Elevated temperature affects vegetative growth and fruit oil concentration in olive trees (*Olea europaea*). Acta Hortic., 1199: 523–528.*

4.1 Introducción

La producción de olivo (*Olea europaea*) podría verse afectada por el calentamiento global en las próximas décadas (García Inza et al., 2014; 2016; Benllock-Gonzales et al., 2018; 2019; Miserere et al., 2018). Tradicionalmente, el cultivo del olivo se ha desarrollado en la Cuenca del Mediterráneo, sin embargo, en las últimas décadas se ha ido desplazando a regiones más cálidas del hemisferio sur, como consecuencia del incremento de la demanda mundial de aceite de oliva (Gómez del campo et al., 2010; Torres et al., 2017). Hacia finales de este siglo, la temperatura media del aire podría incrementar entre 2 y 5 °C (IPCC, 2014), con resultados muy diferentes a escala regional, debido a las variaciones en el ritmo del cambio climático entre regiones (Seneviratne et al., 2018). Bajo este escenario, en las regiones áridas o semiáridas con veranos cálidos, como aquellas donde se desarrolla el cultivo de olivo, se espera que el calentamiento tenga un impacto negativo sobre la agricultura (Giorgi y Lionello, 2008; IPCC, 2014). En este sentido, entender cómo el incremento de la temperatura podría afectar la producción de biomasa y su partición hacia los órganos vegetativos y reproductivos resulta de interés agronómico.

El efecto del incremento de la temperatura de crecimiento sobre la producción de biomasa y el crecimiento de leñosas ha sido ampliamente estudiado en especies forestales (e.g., Cunningham y Read, 2002; Clark et al., 2010; Wertin et al., 2011; Way et al., 2013). Por ejemplo, usando datos de 63 estudios manipulativos de calentamiento, Way y Oren (2010) examinaron la respuesta de crecimiento de 58 especies leñosas a cambios en la temperatura de crecimiento. Los autores encontraron que temperaturas elevadas incrementan el crecimiento (i.e., longitud del brote, diámetro del tallo y biomasa) en especies de hoja caduca más que en árboles de hoja perenne. Por otro lado, las especies de zonas templadas o boreales tienden a ver favorecido su crecimiento ante aumentos de

temperatura, mientras que las especies tropicales, creciendo cerca de a su límite superior de temperatura, son más susceptibles a disminuciones del crecimiento por el calentamiento. Además, observaron que los árboles que se desarrollaron a temperaturas elevadas no sólo tuvieron cambios en su tasa de crecimiento, sino que tuvieron una partición de biomasa diferente que a su temperatura de referencia, asignando más biomasa a las hojas y menos a las raíces y creciendo más alto para un diámetro de tallo dado.

En especies frutales, hay numerosas publicaciones con el foco de atención puesto sobre el efecto del incremento de la temperatura en la floración y el corrimiento de la fenología (e.g., en olivo: Vuletin Selak et al., 2013; 2014; en duraznero: Hedhly et al., 2005; en vid: Sadras y Moran, 2013; en manzano y peral: Guédon y Legave, 2008; Legave et al., 2015), pero el efecto del calentamiento sobre el crecimiento y la producción de biomasa ha sido poco estudiado, y menos aún con experimentos manipulativos de la temperatura a campo y a nivel de árbol entero. En árboles jóvenes de naranjo creciendo en cámaras de gradiente de temperatura, se observó un incremento de la biomasa total al aumentar la temperatura de crecimiento hasta 6 °C por encima de la temperatura ambiental de Gainesville, FL, USA (Allen y Vu, 2009). Además de los cambios en biomasa total, cambios en la partición entre crecimiento vegetativo/reproductivo en respuesta al aumento de la temperatura podrían ocurrir en frutales leñosos con consecuencias sobre la producción y el manejo del cultivo. Por ejemplo, en vid, Sadras y Moran (2013) observaron que con aumentos de la temperatura del aire aumenta la relación rendimiento de frutos/peso de poda (en kg kg^{-1}), ya que si bien ambos parámetros aumentan, el peso de los frutos, lo hace en mayor proporción.

Específicamente en olivo, hay un gran desconocimiento sobre cómo el incremento prolongado de la temperatura podría afectar la producción de biomasa, el crecimiento vegetativo y reproductivo y, consecuentemente, el rendimiento. A partir de un trabajo

previo, se ha establecido un umbral mínimo de temperatura de crecimiento de 7 °C para el tronco, de 13-14 °C para los brotes y volumen de la copa y de 15 °C para los frutos (Pérez-López et al., 2008). Además, con temperaturas superiores a 35 °C el crecimiento podría verse limitado por una caída en la tasa neta de fotosíntesis (Díaz-Espejo et al., 2006), pero esto no ha sido verificado en estudios a campo. Recientemente, en un trabajo manipulativo a campo usando cámaras sin techo, se relacionó un incremento de 4 °C en la temperatura ambiente a lo largo del ciclo reproductivo con un mayor crecimiento vegetativo y una reducción en el rendimiento de frutos (Benlloch-González et al., 2019). Sin embargo, estas respuestas estuvieron en gran parte asociadas a una significativa reducción en el número de frutos cuajados en los árboles calentados y no a un efecto de la temperatura sobre los otros componentes del rendimiento (peso y concentración de aceite) y partición de biomasa (Benlloch-González et al., 2018).

La producción de olivo, al igual que en otros frutales, depende del equilibrio entre la biomasa que se destina a crecimiento vegetativo y reproductivo. El crecimiento vegetativo aéreo ocurre principalmente en primavera, al aumentar la temperatura al final del invierno (Ferreira et al., 2001). Además, la floración también ocurre tempranamente en la estación. Finalmente, un segundo flujo de crecimiento vegetativo puede ocurrir en el otoño con aportes hídricos de riego o precipitación (Rallo et al., 1994). Como consecuencia, el crecimiento vegetativo y el reproductivo ocurren en simultáneo por varios meses durante la temporada, lo que puede conducir a la competencia por los recursos entre los órganos de la planta, sobre todo si estos son limitados. Así, la reducción del crecimiento vegetativo en árboles jóvenes y adultos con elevada carga se ha atribuido a la competencia por los asimilados entre brotes y frutos (Connor y Fereres, 2005; Castillo-Llanque y Rapoport, 2011; Fernández et al., 2015; Rosati et al., 2018).

Considerando todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del incremento de la temperatura durante la fase de acumulación de aceite sobre el crecimiento, la producción de biomasa total y su partición a los distintos órganos en árboles jóvenes de olivo. Para ello utilizamos olivos de 2-3 años de edad, de los cvs Arbequina y Coratina, elegidos por presentar tasas de crecimiento contrastantes. Los olivos fueron sometidos a calentamiento (3-4 °C por encima del control) utilizando cámaras sin techo (OTCs) a campo, durante una o dos temporadas consecutivas. El tratamiento térmico se aplicó una vez establecido el cuaje final de frutos para no generar diferencias entre tratamientos en el número de frutos por árbol, y consecuentemente sobre el crecimiento vegetativo y reproductivo en respuesta a la carga. La información obtenida en este estudio brinda un enfoque general importante sobre la producción de aceite del olivo asociada al calentamiento global.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

El material vegetal y las condiciones de crecimiento de las plantas fueron previamente descritas en el capítulo anterior (Capítulo III) por tratarse del mismo experimento. Los dos cultivares de olivo (*Olea europea*) utilizados presentan diferencias en su hábito de crecimiento: cv Arbequina es de lento crecimiento, mientras que cv Coratina es de rápido crecimiento (Vivaldi et al., 2015). Los árboles presentaban similar diámetro de tronco, altura y densidad de copa al momento de su selección y todas sus flores fueron removidas el año previo al inicio del experimento, de modo de asegurar una alta floración de retorno similar entre árboles.

4.2.2 Tratamientos térmicos y diseño experimental

Se establecieron dos niveles de tratamiento térmico usando cámaras sin techo (OTCs): el tratamiento control (T0), a 1 °C por encima de la temperatura del aire del ambiente exterior, y el tratamiento calentado (T+), programado para mantenerse a 4 °C por encima de T0. El momento de aplicación de los tratamientos y el diseño experimental fueron descritos en el Capítulo III, por tratarse del mismo experimento. El diseño de las cámaras y la descripción del sistema de funcionamiento fueron detallados previamente en el Capítulo II. En 2014-15 se logró una diferencia promedio de casi 3 °C entre T+ y T0 mientras que en 2015-16 la diferencia fue de casi 4 °C.

Para los objetivos de este estudio se evaluaron árboles que estuvieron bajo tratamiento térmico sólo una de las temporadas (durante 2014-15 o 2015-16) y árboles que lo estuvieron las dos temporadas. Para ello, dentro de cada OTC se usaron dos árboles por temporada. Al final de la primera temporada, uno de los árboles se cosechó para determinar biomasa y el otro se movió al vivero hasta el inicio de la segunda temporada. En la segunda temporada, estos árboles que ya estuvieron bajo tratamiento térmico la primera temporada regresaron a sus correspondientes OTCs y un nuevo grupo de árboles de la misma edad fueron asignados a las OTCs para evaluar el efecto de una temporada de tratamiento sobre árboles de 3 años de edad. Los árboles permanecieron en vivero a temperatura ambiente cuando no estuvieron bajo tratamiento térmico dentro las OTCs.

4.2.3 Producción de biomasa vegetativa y su partición a los distintos órganos

La producción de biomasa (g árbol^{-1}) total y por órgano se determinó en árboles bajo una y dos temporadas de tratamiento. Para ello, se estimó la biomasa por árbol antes de iniciar el periodo de calentamiento (biomasa inicial) y al final del periodo de

calentamiento (biomasa final), y por diferencia se obtuvo el incremento de biomasa en ese periodo, para cada tratamiento. La biomasa inicial se estimó de diferentes maneras, según la temporada y periodos de calentamiento. En 2014-15, se usó el valor promedio para cada cultivar obtenido a partir de la biomasa de 4 árboles ($n = 4$) sin tratamiento previo, que fueron cosechados en diciembre de 2014. En 2015-16, se usó el valor promedio para cada cultivar obtenido a partir de la biomasa de los 4 árboles ($n = 4$) controles (T0) al finalizar la temporada anterior. Por otro lado, en los árboles con dos temporadas de calentamiento se usó como biomasa inicial el correspondiente valor promedio de los 4 árboles ($n = 4$) de cada cultivar y tratamiento (T0 o T+) obtenido al finalizar la temporada anterior, ya que sólo se evaluó la biomasa producida durante el tratamiento en la segunda temporada. La biomasa final se determinó en todos los casos al final del periodo de calentamiento (principios de mayo), ya sea de árboles bajo una o dos temporadas de tratamiento. En todos los caso, se cosechó un árbol entero por repetición ($n = 4$), separando sus diferentes órganos vegetativos (i.e., raíces, tronco, ramas, hojas) y frutos. La biomasa de cada órgano se secó en estufa a 75 °C hasta obtener un peso constante y luego se obtuvo el peso seco por órgano y total.

Paralelamente, se evaluó el incremento de área foliar (AF, $m^2 \text{ árbol}^{-1}$) en estos árboles bajo una o dos temporadas de tratamiento. Para ello se utilizó el mismo criterio que para el incremento de biomasa, utilizando un valor estimado de AF inicial y otro final, obtenido una vez finalizado el periodo de calentamiento. Para calcular el AF de cada árbol cosechado, una muestra de 50 discos de hojas de superficie conocida fueron llevados a estufa a 75 °C para determinar su peso seco y estimar la masa foliar específica. El AF se calculó como el producto entre el peso total de las hojas cosechadas y la masa foliar específica.

4.2.4 Rendimiento de aceite y sus componentes

El rendimiento de aceite por árbol (g) y sus componentes (i.e., número de frutos, peso seco por fruto y concentración de aceite) se determinaron a partir de los frutos cosechados al final de cada periodo de calentamiento en las temporadas 2014-15 y 2015-16. Para ello todos los frutos de los dos árboles por OTC fueron cosechados y secados en estufa a 75 °C para obtener el peso seco. La primera temporada, como los dos árboles por OTC tuvieron un sólo periodo de calentamiento, los frutos de ambos fueron usados como sub-muestras. El número de frutos por árbol se estimó a partir del peso seco de una muestra de 50 (2014-15) o 100 (2015-16) frutos, y su relación con el peso seco total de los frutos. Luego, la misma muestra se usó para determinar la concentración de aceite en base seca (% BS) por resonancia magnética nuclear (RMN; modelo SLK200, Spinlock, Argentina). El rendimiento de aceite por árbol se obtuvo del producto entre el rendimiento de frutos (g frutos árbol⁻¹) y la concentración de aceite del fruto (% BS). Adicionalmente, en 2015-16 se determinó la relación pulpa/carozo de los frutos cosechados, a partir de una muestra de 30 frutos por árbol. En los árboles bajo dos periodos de calentamiento, el número de frutos de las muestras de cv Coratina empleadas en cada análisis fue inferior (i.e, entre 10 y 20 frutos) debido a la baja carga que presentaron la segunda temporada.

4.2.5 Costo energético de la producción de biomasa y la relación biomasa vegetativa/frutos

Para comparar el costo de producción de los distintos órganos vegetativos y frutos con una misma base energética, se calcularon los equivalentes glucosas (EG) de la biomasa producida por los árboles con a una o dos temporadas de calentamiento. Para ello, se utilizaron los datos del incremento de biomasa seca (g) por órgano vegetativo y

el peso seco final de los frutos y un valor de conversión (i.e., cantidad de biomasa seca producida por gramo de glucosa, g g^{-1}) calculado para los distintos órganos. El valor de conversión utilizado para la biomasa vegetativa se determinó a partir de valores fraccionarios para proteínas, carbohidratos, lignina y minerales, obtenidos de la bibliografía existente (Penning de Vries et al., 1974; Mariscal et al., 2000) y diferentes según la composición bioquímica del órgano (Apéndice VI). Debido a que los árboles tenían 2-3 años de edad según la temporada, se consideró que todas las ramas y raíces eran jóvenes y tenían la misma composición. Por esto, sólo se usó un valor de conversión específico para el tronco (i.e., 0,650), otro para las hojas (i.e., 0,672) y un tercer valor para raíces y ramas (i.e., 0,698). Del mismo modo, para estimar los EG de los frutos, la cantidad de glucosa necesaria para construir aceite, proteínas, carbohidratos, lignina y minerales se estimó para el mesocarpo y el endocarpo utilizando valores fraccionarios de la composición bioquímica obtenidos de la bibliografía (Heredia-Moreno et al., 1987; Conde et al., 2008; Rapoport, 2008; Ghanbari et al., 2012; Apéndice VI) y nuestros valores de las relaciones pulpa/carozo y concentraciones de aceite del fruto (%). Debido a que en la temporada 2014-15 no se determinó la relación pulpa/carozo de los frutos, se utilizaron los valores obtenidos en 2015-16, de los árboles sometidos a sólo un periodo de tratamiento.

4.2.6 Crecimiento de brotes vegetativos y reproductivos

La longitud (cm) de brotes vegetativos y reproductivos como medida de crecimiento se determinó en cada temporada a lo largo de todo el periodo de calentamiento. La primera temporada, los dos árboles colocados en cada OTC fueron utilizados como sub-muestras para determinar el crecimiento bajo un periodo de calentamiento, mientras que la segunda temporada uno de los árboles se utilizó para

evaluar el crecimiento vegetativo bajo un periodo de calentamiento y el árbol restante para evaluar el crecimiento luego de dos periodos de calentamiento. Para ello, al inicio de cada periodo de calentamiento, se seleccionaron dos (2014-15) o tres (2015-16) brotes vegetativos (i.e., brotes jóvenes sin frutos que se formaron al final de la temporada de crecimiento anterior o en la primavera de la temporada de crecimiento actual) y dos o tres brotes reproductivos (i.e., crecimiento nuevo a partir de yema apical de ramas de 1 año, con frutos) de los dos árboles colocados en cada OTC. Al momento de la selección, los brotes elegidos no presentaban brotes laterales, se encontraban distribuidos en todo el árbol, estaban bien expuestos al sol y tenían el ápice vegetativo terminal en activo crecimiento. Además, los brotes reproductivos tenían similar carga de frutos. Luego de identificados, se determinó longitud inicial de estos brotes, desde su base (i.e., a la altura de la inserción sobre la rama de orden anterior) hasta la mitad del ápice terminal y se contabilizó el número de nudos con hojas completamente desarrolladas. Una vez iniciado el periodo de calentamiento, cada 35-40 días se midió la longitud de esos brotes y de los brotes anticipados que fueron desarrollándose sobre sus yemas laterales, como así también el número de nudos con hojas completamente desarrolladas, hasta finalizar la fase de acumulación de aceite y la aplicación de los tratamientos térmicos.

4.2.7 Análisis estadístico

Los datos de incremento de biomasa y área foliar por árbol, los de equivalentes glucosas, como así también los datos de rendimiento de aceite y sus componentes, se analizaron para cada temporada usando ANOVA de dos vías. Se utilizó el test de Duncan para discriminar entre medias cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la interacción entre ambos factores. El largo de los brotes vegetativos y reproductivos se analizó siguiendo un modelo lineal mixto (ANOVA para

medidas repetidas en el tiempo). Los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos fueron previamente verificados en todas las variables analizadas usando las pruebas de Levene y Shapiro-Wilks, respectivamente. Se transformaron los datos correspondientes a la biomasa seca de tronco y ramas de plantas calentadas sólo un periodo (en las dos temporadas) y del número de frutos bajo tratamiento una temporada en 2015-16 usando la función $\sqrt[2]{x}$, y los datos de EG de la biomasa vegetativa de las plantas bajo tratamiento dos temporadas usando la función $\ln x$, ya que el supuesto de homogeneidad de varianza no se cumplía en estas variables. Sin embargo, en el cuadro 4.1 y figura 4.2 se presentan los valores promedio sin transformar de estas variables para una mejor interpretación de los mismos. Los ANOVA se realizaron en el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2018) y los gráficos presentados en las diferentes figuras se realizaron utilizando el software Graph-Pad Prism versión 6.01 (GraphPad Prism Software, Inc., LaJolla, CA, EE. UU.).

4.3 Resultados

4.3.1 Producción de biomasa y su partición a los distintos órganos del árbol

Las respuestas de la producción de biomasa total, vegetativa y reproductiva al incremento de la temperatura fue diferente en ambas temporadas y según se tratara de árboles de olivo bajo uno o dos periodos de calentamiento (cuadro 4.1). Bajo una temporada de tratamiento, no se encontraron diferencias significativas en la producción de biomasa total por árbol en ninguna de las dos temporadas analizada. En 2014-15, además, no se encontraron diferencias entre tratamientos en la biomasa de los órganos vegetativos ni de frutos. Asimismo, tampoco se encontraron diferencias entre los cultivares, con excepción de la biomasa de tronco, que fue mayor en cv Coratina, y en la

biomasa de hojas, que tuvo una tendencia ($p = 0,07$) a ser mayor en cv Arbequina. Contrariamente, en la temporada 2015-16 cuando los árboles tenían 3 años de edad, la biomasa de frutos fue cerca de un 30 % menor en T+ que T0 en ambos cultivares. Además, T+ tendió a producir mayor cantidad biomasa de hojas que T0 en ambos cultivares ($p = 0,06$). Paralelamente, en estos árboles tanto la biomasa total y la biomasa por órgano vegetativo (i.e., raíces, tronco, ramas y hojas) fue mayor en cv Coratina que en cv Arbequina y la misma tendencia, aunque no significativa, se observó en los frutos ($p = 0,06$).

Por otro lado, en los árboles con dos temporadas de tratamientos, la biomasa total producida en el segundo periodo de calentamiento (2015-16) tendió a ser inferior en T+ que en T0 (cuadro 4.1; $p = 0,07$). Además, en el caso de las hojas, el calentamiento redujo un 95 % el incremento de la biomasa en cv Coratina con respecto a su control, mientras que en cv Arbequina no hubo diferencias entre tratamientos térmicos. En el caso de los frutos, los árboles cv Arbequina T+ tuvieron 73 % menos biomasa que T0, mientras que en cv Coratina no se observaron diferencias entre tratamientos, aunque la biomasa fue muy inferior a la de sus coetáneos calentados sólo una temporada. Finalmente, en la producción de biomasa de raíces, tronco y ramas sólo se detectaron diferencias estadísticas entre cultivares.

El incremento del área foliar de los árboles calentados tuvo una respuesta diferente según se tratara de árboles sometidos a uno o dos periodos de calentamiento (figura 4.1). Por un lado, los árboles T+ sometidos a un periodo de calentamiento tuvieron mayor incremento de área foliar que los T0, tanto en la primera como en la segunda temporada (figura 4.1a y b). Por otro lado, en los árboles T+ sometidos a dos temporadas de calentamiento, el incremento de área foliar fue similar a T0 en cv Arbequina, mientras

Cuadro 4.1. Incremento de biomasa seca por órgano y total (g) de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo dos tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron durante un periodo, desde cuaje hasta final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), en 2014-15 o 2015-16, o dos periodos consecutivos (evaluando sólo el incremento de biomasa de la segunda temporada, 2015-16). Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) para cada cultivar y tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; ns , no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).

Temporada/ Periodos de calentamiento	Cultivar	Tratamiento	Biomasa por órgano (g)					Biomasa total (g)	
			Raíces	Tronco	Ramas	Hojas	Frutos		
2014-2015 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	74 \pm 20	37 \pm 4	126 \pm 17	153 \pm 11	308 \pm 46	697 \pm 64	
		T+	127 \pm 13	44 \pm 5	167 \pm 33	192 \pm 38	264 \pm 21	794 \pm 73	
	Coratina	T0	133 \pm 25	63 \pm 10	184 \pm 30	115 \pm 22	290 \pm 42	786 \pm 62	
		T+	124 \pm 5	53 \pm 7	174 \pm 31	137 \pm 17	322 \pm 42	809 \pm 83	
			p trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
			p cv	<i>ns</i>	$\leq 0,05$	<i>ns</i>	0,07	<i>ns</i>	<i>ns</i>
			p int.	0,08	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
2015-2016 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	451 \pm 9	62 \pm 6	249 \pm 20	145 \pm 33	688 \pm 25	1596 \pm 39	
		T+	415 \pm 41	70 \pm 4	277 \pm 28	174 \pm 16	497 \pm 58	1432 \pm 81	
	Coratina	T0	853 \pm 71	118 \pm 19	400 \pm 61	201 \pm 16	826 \pm 80	2397 \pm 192	
		T+	867 \pm 243	142 \pm 39	526 \pm 125	297 \pm 65	588 \pm 78	2421 \pm 449	
			p trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,06	$\leq 0,01$	<i>ns</i>
			p cv	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	0,06	$\leq 0,01$
			p int.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
2015-2016 (2 periodos de calentamiento)	Arbequina	T0	434 \pm 35	45 \pm 5	181 \pm 32	167 \pm 40 ab	547 \pm 36 a	1374 \pm 72	
		T+	557 \pm 92	41 \pm 5	197 \pm 42	156 \pm 55 ab	148 \pm 30 b	1098 \pm 181	
	Coratina	T0	786 \pm 135	123 \pm 24	570 \pm 186	303 \pm 125 a	41 \pm 9 c	1823 \pm 461	
		T+	686 \pm 64	81 \pm 6	277 \pm 56	14 \pm 12 b	30 \pm 10 c	1088 \pm 110	
			p trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	0,07
			p cv	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	<i>ns</i>
			p int	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>

que en cv Coratina hubo marcadas diferencias con T0, debido a que en T+ no hubo incremento de área foliar la segunda temporada (figura 4.1c).

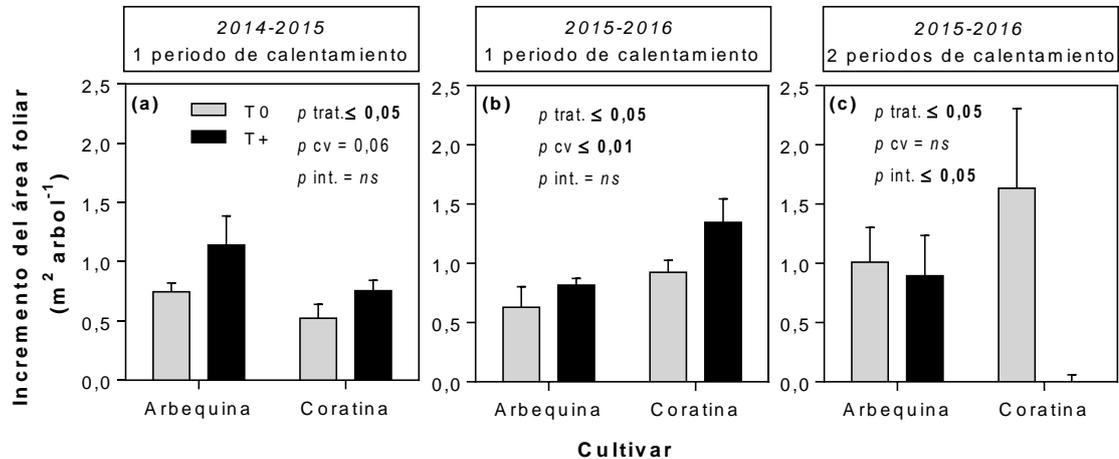


Figura 4.1. Incremento del área foliar ($\text{m}^2 \text{arbol}^{-1}$) en árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo dos tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos se aplicaron desde cuaje hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), durante una temporada, en 2014-15 (a) y 2015-16 (b), o dos temporadas consecutivas (evaluando sólo el incremento de la segunda temporada, c). Los valores corresponden al promedio ($n = 4$) \pm 1 error estándar para cada cultivar y tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$) en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; ns , no significativo.

4.3.2 Rendimiento de aceite y sus componentes

Como era esperado, un periodo de calentamiento durante la fase de acumulación de aceite no afectó el número de frutos por árbol, en ninguna de las dos temporadas evaluadas (figura 4.2a y b). En contraste, en los árboles bajo dos temporadas de tratamientos, el número de frutos en 2015-16 se redujo un 66 % en T+ con respecto a T0 en cv Arbequina, mientras que en cv Coratina la carga fue muy baja (i.e., 94 % inferior al de los árboles sometidos a sólo un periodo de calentamiento en esa misma temporada) y no se observaron diferencias entre los tratamientos (figura 4.2c).

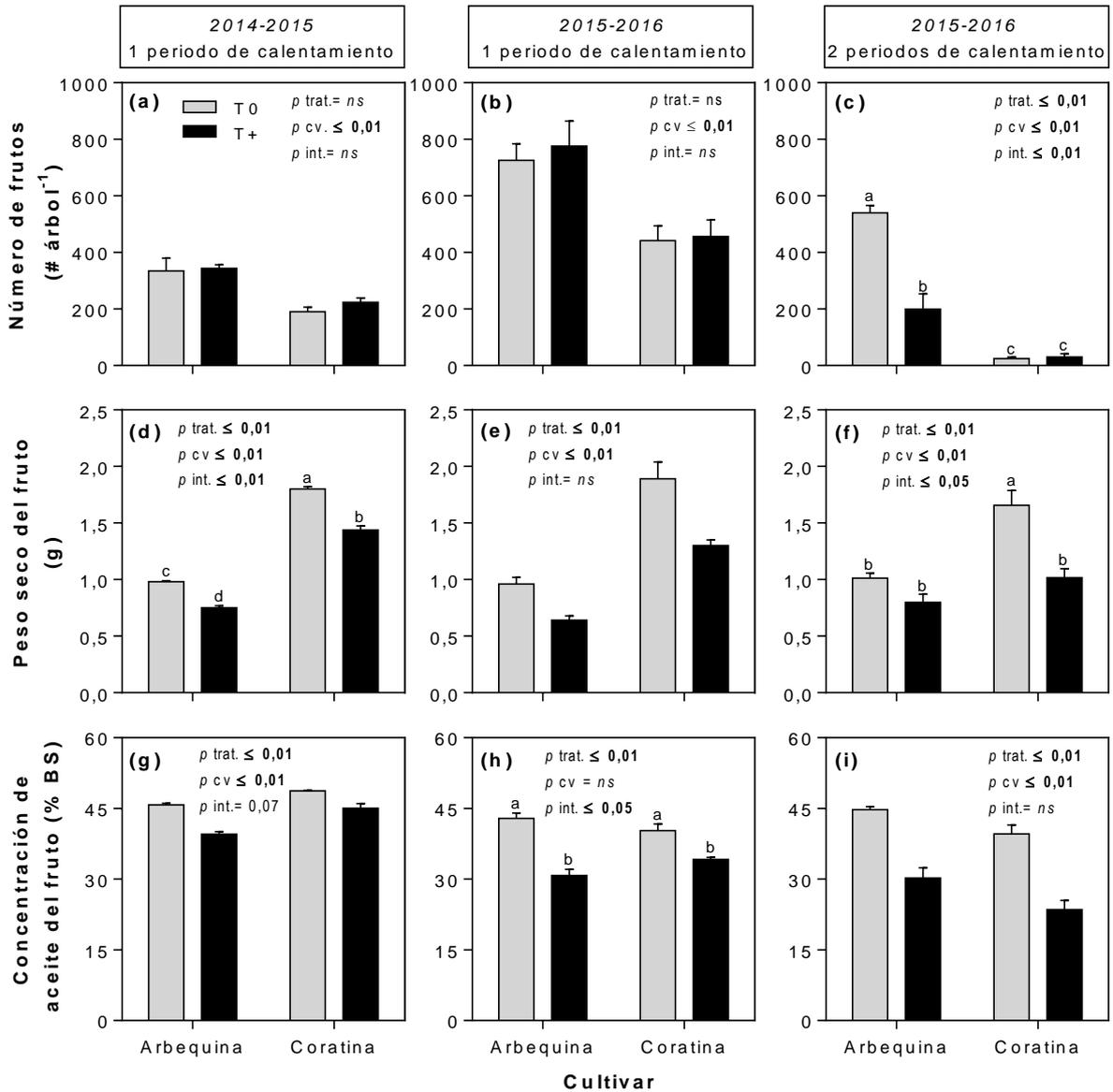


Figura 4.2. Componentes del rendimiento de aceite de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), durante uno (en 2014-15: a, d, g; en 2015-16: b, e, h.) y dos periodos de calentamiento, (2015-16, evaluando sólo los frutos de la segunda temporada; c, f, i). Los tratamientos térmicos fueron aplicados desde cuaje de frutos hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo). Las barras representan el valor promedio del tratamiento térmico para cada cultivar \pm 1 error estándar ($n = 4$). Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$) en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; ns , no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).

El peso individual de los frutos fue menor en T+ que en T0, tanto en árboles con una o dos temporadas de calentamiento y en ambos cultivares, con excepción de cv Arbequina en árboles calentados dos temporadas (figura 4.2d, e, f). Entre cultivares, como era esperado, los frutos de cv Arbequina fueron más livianos que los de cv Coratina.

La concentración de aceite del fruto fue menor en los árboles T+ con respecto al control, tanto en árboles con uno o dos periodos de calentamiento (figura 4.2g, h, i). Por último, los frutos provenientes de árboles T+ con dos periodos de calentamiento fueron los que mayores reducciones en el % de aceite tuvieron con respecto a su control, alrededor de 14 y 16 puntos porcentuales menos en cv Arbequina y cv Coratina, respectivamente (figura 4.2i).

El rendimiento de aceite fue menor en los árboles T+ comparado a T0 en ambas temporadas, tanto en olivos sometidos a uno o dos periodos de calentamiento (figura 4.3). En la primera temporada la diferencia entre tratamientos fue marginalmente significativa y, en general, el rendimiento fue bajo, menor a 154 g árbol⁻¹, en ambos cultivares y tratamientos (figura 4.3a; $p \leq 0,1$), principalmente debido al reducido tamaño de los árboles y el bajo número de frutos. En la segunda temporada, los árboles T+ calentados sólo una temporada, tuvieron una reducción del 47 % y 39 % en el rendimiento de aceite, en cv Arbequina y cv Coratina, respectivamente (figura 4.3b). En ambas temporadas, hubo una tendencia a que cv Coratina tuviera mayor rendimiento que cv Arbequina ($p \leq 0,1$). En los árboles T+ con dos periodos de calentamiento el rendimiento de aceite en 2015-16 se redujo un 82 % en los árboles de cv Arbequina, mientras que en cv Coratina no hubo diferencias significativas entre tratamientos y el rendimiento fue muy bajo en comparación con sus contemporáneos con sólo una temporada de calentamiento (figura 4.3c).

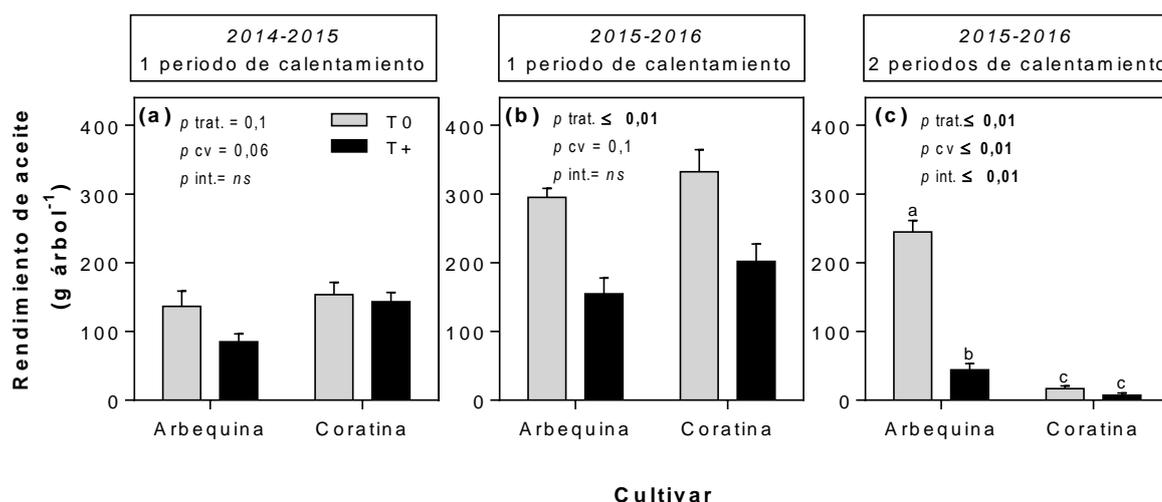


Figura 4.3. Rendimiento de aceite (g árbol^{-1}) de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), durante uno (2014-15: a, d, g; 2015-16: b, e, h,) o dos periodos de calentamiento, evaluando sólo la segunda temporada (2015-16: c, f, i.). Los tratamientos térmicos fueron aplicados desde cuaje de fruto hasta el final de la acumulación de aceite (diciembre a mayo). Las barras representan el valor promedio del tratamiento térmico para cada cultivar ± 1 error estándar ($n = 4$). Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$) en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; ns , no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).

4.3.3 Costo energético de la biomasa producida y relación vegetativa/reproductiva

En los árboles con una temporada de calentamiento durante 2014-15, los EG estimados de las biomásas vegetativa, reproductiva y total producidas fueron similares entre tratamientos térmicos y entre cultivares (cuadro 4.2). En 2015-16, los EG de las biomásas vegetativa y total tampoco se vieron afectados por el tratamiento térmico. Contrariamente, los EG estimados de la biomasa de frutos se redujo en T+ con respecto a T0, en ambos cultivares. Como consecuencia, la relación biomasa vegetativa/reproductiva aumentó significativamente en los árboles T+, en un 62 % en cv Arbequina y un 74 % en cv Coratina. Asimismo, los EG de la biomasa vegetativa y total producida fueron mayores en cv Coratina que en cv Arbequina. En forma similar, el costo en glucosa de los frutos tendió a ser mayor en cv Coratina que en cv Arbequina, siendo la relación vegetativa/ reproductiva también mayor en ese cultivar.

Cuadro 4.2. Equivalentes glucosa (g glucosa) de la biomasa total, vegetativa y de los frutos, y relación equivalentes glucosas de biomasa vegetativa / frutos de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajos los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), que se aplicaron durante un periodo, desde cuaje hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), en 2014-15 o 2015-16, o dos periodos consecutivos, (evaluando sólo el incremento de biomasa de la segunda temporada, 2015-16). La biomasa vegetativa producida antes del período de tratamiento térmico no fue tomada en cuenta para el análisis. Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) para cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$), en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).

Temporada/ periodos de calentamiento	Cultivar	Tratamiento	Glucosa (g)				
			Vegetativa	Frutos	Total	Vegetativa/frutos	
2014-2015 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	570 \pm 67	653 \pm 95	1223 \pm 98	0,93 \pm 0,16	
		T+	774 \pm 128	502 \pm 37	1276 \pm 106	1,61 \pm 0,38	
	Coratina	T0	722 \pm 119	639 \pm 108	1361 \pm 99	1,29 \pm 0,39	
		T+	711 \pm 82	685 \pm 88	1396 \pm 148	1,06 \pm 0,11	
			p trat.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
			p cv	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
		p int.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,07	
2015-2016 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	1315 \pm 81	1437 \pm 54	2752 \pm 42	0,93 \pm 0,09	
		T+	1357 \pm 88	949 \pm 118	2306 \pm 139	1,51 \pm 0,24	
	Coratina	T0	2274 \pm 238	1694 \pm 160	3968 \pm 310	1,38 \pm 0,20	
		T+	2657 \pm 652	1150 \pm 157	2855 \pm 1222	2,40 \pm 0,70	
			p trat.	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	<i>ns</i>	$\leq 0,05$
			p cv	$\leq 0,01$	0,07	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$
		p int.	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
2015-2016 (2 periodos de calentamiento)	Arbequina	T0	1198 \pm 138	1161 \pm 77 a	2359 \pm 101	1,07 \pm 0,19 c	
		T+	1375 \pm 249	280 \pm 56 b	1655 \pm 261	6,03 \pm 2,10 b	
	Coratina	T0	2582 \pm 668	85 \pm 20 c	2668 \pm 671	35,09 \pm 8,65 a	
		T+	1472 \pm 184	55 \pm 22 c	1527 \pm 157	43,70 \pm 21,48 a	
			p trat.	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$
			p cv	0,06	$\leq 0,01$	<i>ns</i>	$\leq 0,01$
		p int.	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	

En el caso de los árboles bajo dos temporadas consecutivas de calentamiento, los EG estimados de la biomasa vegetativa fue similar entre tratamientos térmicos (cuadro 4.2). Por el contrario, la cantidad de glucosa destinada a frutos se vio severamente afectada por el calentamiento en cv Arbequina (i.e., un 75 % menos de glucosa), mientras que no se detectaron diferencias entre tratamientos en cv Coratina, ya que tanto en T+ como en T0 la glucosa destinada a sus frutos fue muy baja en relación a sus coetáneos bajo un periodo de calentamiento. Como consecuencia, la relación vegetativa /reproductiva aumentó en los árboles T+ de cv Arbequina en comparación con sus T0, mientras que en cv Coratina no hubo efecto del tratamiento. Finalmente, los EG de la biomasa total fueron menores en T+ que en T0 para ambos cultivares.

4.3.4 Crecimiento de brotes vegetativos y reproductivos

A pesar de que el crecimiento de los brotes estuvo activo durante la fase de acumulación de aceite, tanto en árboles bajo una o dos temporadas de calentamiento, no se detectaron diferencias significativas debidas al tratamiento térmico en ningún tipo de brote (i.e., vegetativos y reproductivos; figura 4.4). En los árboles bajo un periodo de tratamiento, los brotes vegetativos y reproductivos crecieron durante la mayor parte de la fase de acumulación de aceite en ambas temporadas del experimento (figura 4.4a, b, d, e; $p \leq 0,01$). Paralelamente, sólo se detectaron diferencias significativas entre cultivares en los brotes reproductivos en la temporada 2015-16, debido a que, a partir de la medición de febrero cv Arbequina tuvo mayor longitud de brote que cv Coratina (figura 4.4e; $p_{cv \times fecha} \leq 0,01$). Por último, en estos árboles, la longitud de los brotes reproductivos (figura 4.4d y e) fue menor que la de los vegetativos (figura 4.4a y b).

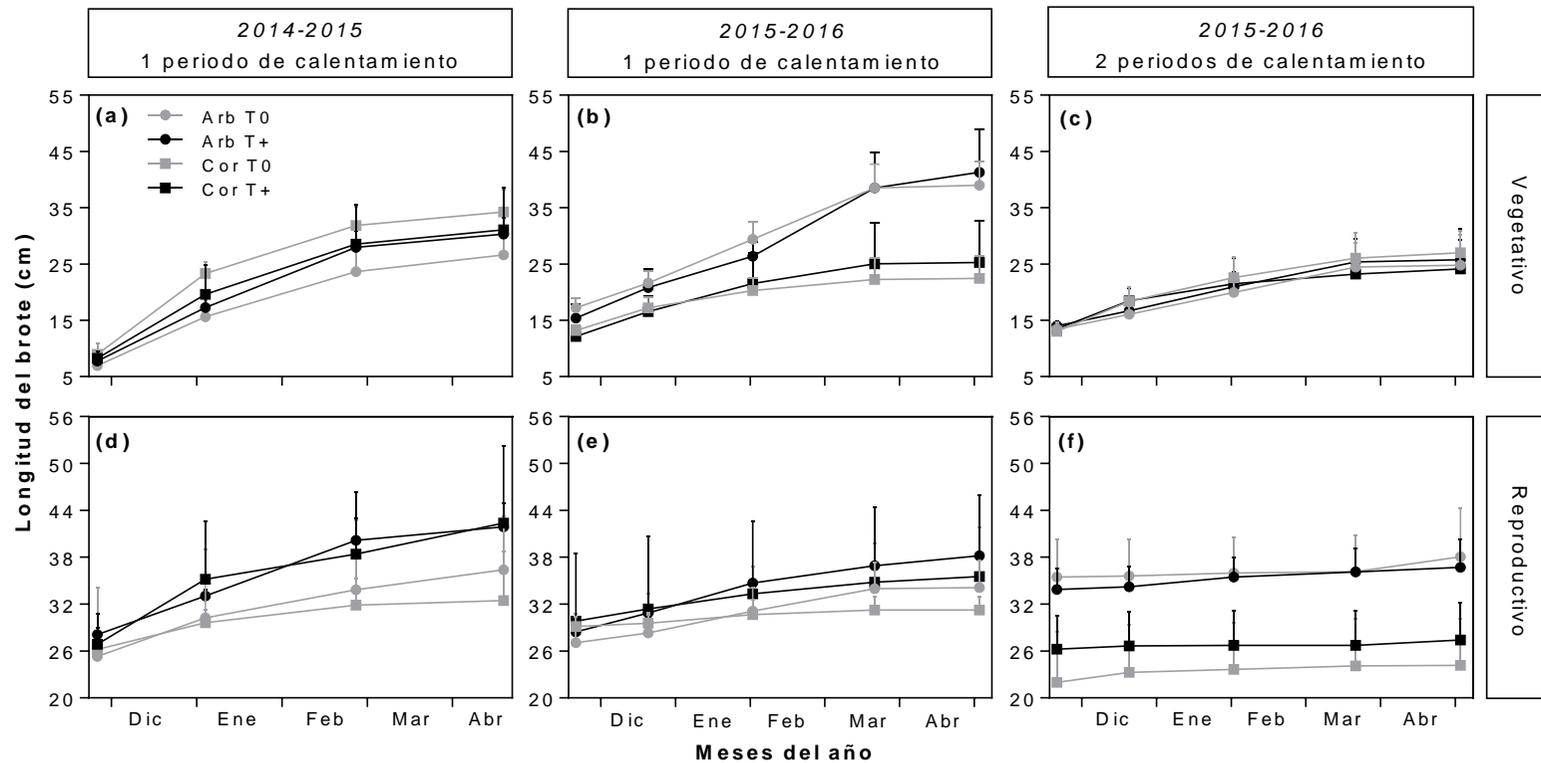


Figura 4.4. Longitud de brotes (principal + laterales, en cm) vegetativos (a, b, c) y reproductivos (d, e, f) de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+), durante uno (en 2014-15: a, d; en 2015-16: b, e) o dos periodos de calentamiento, evaluando sólo el crecimiento del segundo periodo (2015-16: c, e). Cada periodo de calentamiento se estableció desde cuaje final de frutos hasta el final de la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo). Cada punto representa el valor promedio del tratamiento térmico para cada cultivar ± 1 error estándar ($n = 4$) en la fecha evaluada. Se encontraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre fechas de medición (mes del año) en todos los casos (a-f). Además, la interacción cultivar x fecha de medición fue altamente significativa ($p \leq 0,01$) en los brotes vegetativos de los árboles sometidos a un periodo de calentamiento en la temporada 2015-16 (b). El cultivar fue significativo ($p \leq 0,05$) en los brotes reproductivos de árboles calentado durante dos periodos (f).

Por otro lado, en los árboles que estuvieron bajo dos temporadas de tratamiento, el crecimiento de los brotes vegetativos y reproductivos durante la fase de acumulación de aceite fue mucho más moderado, aunque igualmente significativo (figura 4.4c y f). Asimismo, los brotes reproductivos de cv Arbequina tuvieron mayor longitud que los de cv Coratina, pero esta diferencia fue significativa incluso en la fecha inicial de medición (figura 4.4f).

4.4 Discusión

A medida que el calentamiento global se hace más evidente, resulta de mayor interés entender cómo el incremento de la temperatura del aire podría afectar el crecimiento del olivo y su producción en las distintas regiones del mundo donde se cultiva. En la región del NOA, la principal región olivícola de Argentina, este conocimiento es aún más relevante debido a que las temperaturas son más elevadas que en la zona de origen del cultivo (Searles et al., 2011; Torres et al., 2017). A pesar de esto, la bibliografía disponible sobre el tema es muy escasa, sobre todo basada en experimentos manipulativos de la temperatura a campo.

Los estudios a campo sobre crecimiento han estado principalmente relacionados al efecto de la carga de frutos (e.g., Proietti y Tombesi, 1996; Castillo-Llanque y Rapoport, 2011; Fernández et al., 2015; Rosati et al., 2018) y/o el déficit hídrico (e.g., Martín-Vertedor et al., 2011a y b; Hernandez-Santana et al., 2017; Trentacoste et al., 2019). En olivo, es bien sabido que el crecimiento vegetativo y el reproductivo compiten por los recursos disponibles a lo largo de gran parte de la estación de crecimiento y que el balance entre ambos está en gran medida en función de la carga de la temporada (Rallo et al., 1994; Lavee, 2007; Fernández et al., 2015). Por ejemplo, Fernández et al. (2015) observaron que en árboles adultos, la elongación del brote apical ocurre sólo al principio

de la temporada cuando la carga es media o alta, pero puede continuar durante la mayor parte de la temporada cuando la carga es baja. Consecuentemente, la carga es un aspecto que siempre debe ser tenido en cuenta en los estudios de crecimiento y producción de biomasa en olivo, y frutales en general. Adicionalmente, tal vez por la complejidad que implica evaluar árboles enteros, la mayoría de los trabajos de crecimiento han estado restringidos sólo a evaluar partes del árbol, principalmente órganos aéreos (e.g., ramas enteras o brotes previamente seleccionados, diámetro de tronco, etc.). No obstante, debido a la imposibilidad de extrapolar estos resultados a un nivel de árbol, resultan cruciales los estudios integradores a nivel de planta entera para poder entender la complejidad de los procesos involucrados en las respuestas.

Considerando todo lo anterior, en este estudio analizamos el impacto de la temperatura en árboles enteros bajo tratamiento una temporada, donde la carga fue similar entre tratamientos, y árboles bajo tratamiento dos temporadas, donde la primera temporada tuvo un impacto negativo sobre el número de frutos de la segunda temporada (figura 4.2). En árboles bajo tratamiento térmico una temporada, el calentamiento no afectó la biomasa de los órganos vegetativos, o su equivalente en unidades glucosa, ni en el crecimiento total (apical + lateral) de los brotes vegetativos y reproductivos en ninguna de las dos temporadas, es decir, con árboles de 2 y 3 años de edad (cuadros 4.1 y 4.2; figura 4.4). A pesar de que no se observó un efecto del calentamiento sobre la elongación de brotes, el área foliar por árbol fue mayor en las plantas calentadas en ambos cultivares (figura 4.1), debido principalmente a un aumento en el número de hojas desarrolladas (Apéndice III). Sin embargo, estas diferencias en área foliar no se tradujeron en diferencias significativas en la biomasa foliar entre tratamientos (cuadro 4.1), debido a que el mayor número y tamaño individual de las hojas estuvo acompañado por una menor masa foliar específica (Apéndice III). En especies forestales perennifolias, Way y Oren (2010), asociaron un

incremento del área foliar específica (la inversa de la masa foliar específica) con una temperatura del día más cálida. En olivo, la mayor parte del crecimiento vegetativo ocurre en primavera-verano temprano y, en este estudio, los tratamientos térmicos se aplicaron tarde en la temporada. Por lo que son necesarios estudios complementarios manipulando la temperatura en primavera a fin de poder entender mejor la respuesta del crecimiento vegetativo al incremento de la temperatura.

En los árboles que estuvieron bajo tratamiento una temporada y que tenían una carga alta y similar entre tratamientos, el calentamiento tuvo un fuerte impacto negativo sobre el peso individual de los frutos y la concentración de aceite en ambos cultivares (figura 4.2), lo que se tradujo en un menor rendimiento de aceite en ambas temporadas, (figura 4.3). Respuestas similares en el peso y % aceite del fruto al incremento de la temperatura del aire fueron reportados previamente por García-Inza et al. (2014) al calentar ramas fructíferas de olivo cv Arauco durante la fase de acumulación de aceite. En adición, al calentar 4 °C árboles adultos enteros del cv Picual usando OTCs el peso seco de los frutos y su contenido de aceite disminuyeron en comparación con los controles, aun cuando los árboles calentados tenían una carga significativamente menor y un efecto compensatorio hubiera sido esperable en ambas variables (Benllock-González et al., 2018; 2019). En olivo, la carga no sólo afecta el crecimiento vegetativo, sino que además condiciona el tamaño del fruto y su concentración de aceite (Fernández et al., 2018; Miserere et al., 2019).

En este estudio, los cambios hallados en las características del fruto no estuvieron asociados a una diferencia en el número de frutos por árbol ni tampoco a una menor disponibilidad de glucosa/fruto debidas al calentamiento ya que la glucosa total producida por árbol a lo largo del periodo de calentamiento fue similar entre tratamientos (cuadro 4.2). El hecho de que los tratamientos no tuvieron impacto sobre la tasa fotosintética

(Capítulo III) sustenta estos resultados. Se sabe que la temperatura puede actuar sobre el crecimiento indirectamente al afectar la producción de fotoasimilados por árbol (Taiz y Zeiger, 2002) pero en nuestro caso, los resultados indicarían que el impacto del calentamiento estaría asociado a procesos que ocurren directamente en los frutos. En girasol se observó que la temperatura tiene un impacto negativo sobre el peso de los granos que no pudo adjudicarse a diferencias en la respiración sino al efecto de la temperatura sobre la duración del llenado (Ploschuk y Hall, 1997). Por otro lado, existen evidencias de que la síntesis de triglicéridos en olivo es fuertemente reducida cuando la temperatura de los frutos supera los 30 °C (Ramli et al., 2002; Salas et al., 2000), algo que ocurrió con alta frecuencia en las plantas calentadas (i.e., en ambas temporadas evaluadas, alrededor de 140 días en las OTCs T+ y 125 en las OTCs T0 registraron temperaturas mayores a 30 °C en algún momento del día). Es por ello, que son necesarios estudios que evalúen la temperatura experimentada por los frutos al incrementar la temperatura del aire y su relación con la acumulación de aceite. En este sentido las diferencias en tamaño y forma del fruto entre cultivares pueden condicionar el intercambio térmico entre el fruto y el ambiente y, por lo tanto, su temperatura.

Los resultados sugieren, además, que esta disminución en el tamaño y % aceite de los frutos por el calentamiento permitió un crecimiento vegetativo adicional a partir de los fotoasimilados no destinados al crecimiento reproductivo. Así, los árboles calentados destinaron alrededor de 60 % más glucosa a órganos vegetativos que a frutos modificando el balance entre el crecimiento vegetativo y reproductivo, salvo en cv Coratina durante la primera temporada, potencialmente debido a que pequeñas diferencias (no significativas) en el número de frutos (figura 4.2) tuvieron mucho impacto en estos árboles pequeños. Esta respuesta parecería ser similar a lo que ocurre al variar la carga de frutos. Por ejemplo, en olivos jóvenes, Rosati et al. (2018) observaron una fuerte relación lineal

inversa entre la biomasa seca (o sus EG) vegetativa y reproductiva producida durante dos temporadas en árboles con distinto nivel de carga pero igual biomasa seca total producida. Este es un aspecto importante a tener en cuenta ya que modelos predictivos del impacto del cambio global sobre la producción de olivo se sustentan sobre predicciones de aumento o disminución de la producción de fotoasimilados (sea que consideren o no un impacto positivo del aumento del CO₂) sin cambios en la partición de asimilados (e.g., López-Bernal et al., 2018).

Contrariamente, en los árboles calentados durante dos temporadas consecutivas, el crecimiento parecería haber limitado fuertemente la producción de asimilados puesto que los árboles T+ tuvieron una menor biomasa total y EG totales que los T0, sobre todo en cv Coratina. Los resultados de este trabajo arrojaron que el calentamiento provocó una gran disminución en el crecimiento reproductivo y rendimiento de aceite (figura 4.3) pero esto no se tradujo en un mayor crecimiento en ningún órgano vegetativo, como ocurrió en los árboles calentados sólo una temporada (cuadros 4.1 y 4.2). De hecho, el crecimiento de los brotes, vegetativos y reproductivos, tuvo un ritmo mucho menor que el de sus coetáneos bajo una temporada de calentamiento (figura 4.4). En cv Coratina los EG de la biomasa vegetativa fueron un 43 % inferior en T+, aunque no significativos, principalmente por una menor biomasa de hojas. De hecho, en estos árboles calentados no hubo incremento de AF (figura 4.1), porque se cayó la misma proporción de hojas que las que se formaron en la temporada. Sin embargo, hubo un pequeño incremento de la biomasa foliar debido a que las nuevas hojas producidas tenían más masa foliar específica que las hojas caídas (Apéndice IV). Desafortunadamente, a partir de estos resultados no es posible establecer cuáles fueron los motivos que llevaron a una reducción de asimilados disponibles en los árboles calentados. Mecanismos vinculados a la producción y/o

transporte de asimilados, como por ejemplo brotación de yemas limitada por falta de frío, fallas hidráulicas, caída prematura de hojas, entre otros, podrían estar detrás de esto.

Es importante resaltar que el crecimiento reproductivo en los árboles bajo dos temporadas de calentamiento estuvo restringido desde temprano en la temporada 2015-16 por un menor número de frutos cuajados en relación a sus coetáneos calentados sólo un periodo (figura 4.2). Las diferencias en el número de frutos observadas en este trabajo estuvieron asociados a una menor intensidad de floración y cuaje, y no a una caída de frutos durante los tratamientos (Apéndice V). El calentamiento temprano en la temporada anterior (los primeros meses del periodo otoño-invierno, abril-mayo de 2015) podría haber afectado el número de inflorescencias a antesis en la primavera 2015. Llamativamente, a pesar de lo ocurrido en la carga, los árboles calentados dos temporadas también tuvieron una reducción en al menos uno de los otros dos componentes del rendimiento de aceite (figura 4.2). En cv Arbequina no se detectó una reducción significativa en el peso del fruto de T+ en comparación con su control T0 (aunque fueron un 20 % más livianos que T0), probablemente debido a un efecto compensatorio por un menor número de frutos en el tratamiento calentado. Sin embargo, se observó una reducción del % de aceite en similar proporción que la ocurrida en los frutos de árboles bajo sólo un periodo de calentamiento. En cv Coratina, por otro lado, a pesar de la muy baja cantidad de frutos, se produjo una reducción de su peso de proporción similar a la de sus coetáneos con alta carga, mientras que el % de aceite cayó en mayor proporción. De hecho, en cv Coratina el bajísimo número de frutos en ambos tratamientos fue el principal componente determinante del rendimiento en ambos tratamientos, siendo la biomasa reproductiva y sus EG muy bajos en ambos tratamientos (i.e., sólo un 2-3 % de la biomasa total producida), representando sólo el 5 % de la biomasa reproductiva de sus coetáneos con una temporada de calentamiento.

4.5 Conclusión

El calentamiento durante la fase de síntesis y acumulación de aceite, bajo las condiciones ambientales exploradas en este trabajo, reduce el rendimiento de aceite al afectar el peso individual de los frutos y su % de aceite. El menor costo energético de los frutos posibilita una mayor partición de asimilados destinados al crecimiento vegetativo durante ese periodo, como por ejemplo, incremento del área foliar. De esta forma, el balance entre la biomasa vegetativa/reproductiva aumenta al incrementar la temperatura en 3-4 °C durante este periodo. Sin embargo, en árboles calentados durante más de una temporada la carga de frutos es afectada, probablemente debido al calentamiento tardío en la temporada anterior. A pesar de eso, el efecto directo sobre la concentración de aceite del fruto también ocurre en estos árboles. En paralelo, el peso seco del fruto también se ve reducido si no hay un efecto compensatorio por el menor número de frutos, como ocurrió en cv Arbequina. Pero además del efecto directo de la temperatura sobre el fruto, parecería producirse una fuerte limitación por fuente tanto en el crecimiento vegetativo como reproductivo, aunque los mecanismos detrás de esto y su relación con la temperatura son desconocidos. Como consecuencia, el rendimiento de aceite se ve severamente reducido por el efecto acumulado del calentamiento.

**Respuestas de la calidad del aceite y del fruto al incremento
de temperatura durante la fase de síntesis y acumulación de
aceite en olivo**

5.1 Introducción

El olivo (*Olea europaea*) es un cultivo bien adaptado a las condiciones ambientales prevalecientes en la Cuenca del Mediterráneo en donde fue domesticado (Besnard et al., 2011; 2018) y su principal destino productivo es la obtención de aceite de oliva de calidad para consumo humano. En las últimas tres décadas su producción se expandió hacia países extra mediterráneos en el hemisferio sur, principalmente Argentina, Chile, Perú y Australia (Torres et al., 2017), donde las condiciones climáticas son diferentes de aquellas en su zona de origen. En estas nuevas zonas productoras predomina el uso de cultivares españoles e italianos y se ha observado que el rendimiento de aceite es menor y su calidad química (e.g., el perfil de ácidos grasos) diferente del aceite obtenido en sus áreas de origen. Es bien sabido que los factores ambientales como la temperatura y las interacciones genotipo x ambiente se vuelven relevantes cuando los genotipos son producidos fuera de su ambiente de origen. A razón de esto, se efectuaron estudios correlativos (espaciales y/o temporales) que relacionaron caídas en el ácido oleico y otros cambios en el perfil de ácidos grasos con una mayor temperatura media durante el desarrollo del fruto (en Argentina: Ceci y Carelli, 2010; Rondanini et al., 2011; 2014).

El entendimiento de cómo el desarrollo del fruto, la dinámica de sus componentes relacionados con la calidad química y sus características a cosecha (e.g., tamaño, composición) responden al incremento de la temperatura es particularmente importante en este contexto regional extra mediterráneo. Esto permite entender las variaciones observadas en la producción y la calidad del aceite, y también puede aportar información valiosa que ayude a predecir el comportamiento agronómico y el rendimiento (cantidad y calidad) del cultivo en un escenario de calentamiento global, tanto en zonas tradicionales como no tradicionales de producción.

Entre los parámetros de calidad química, los más importantes en el aceite de oliva son la composición de ácidos grasos (en especial la concentración de ácido oleico) y los compuestos insaponificables menores, entre ellos esteroides, tocoferoles y escualeno. Estos compuestos hacen que el aceite de oliva sea valorado a nivel mundial por sus beneficios a la salud humana (Conde et al., 2008). Además, su extracción del fruto de manera física (e.g., prensado) evita procesos agresivos y permite mantener la integridad de sus constituyentes menores (Sánchez y Harwood, 2002). A diferencia de cultivos oleaginosos anuales donde el aceite es extraído de la semilla mediante el uso de solventes, el aceite de oliva proviene principalmente del mesocarpo (pulpa; ~95 %) con una muy pequeña contribución de la semilla y el endocarpo leñoso (carozo) (Conde et al., 2008). En general, el 50 % del peso seco del fruto a cosecha es aceite, aunque esta proporción (y su composición) es variable entre genotipos y ambientes y está relacionado, en parte, con la relación pulpa/carozo del fruto.

El crecimiento y la maduración del fruto se producen como consecuencia de la combinación de procesos bioquímicos y físicos, bajo estricto control genético y ambiental, que desencadenan cambios en su tamaño, composición, color, textura y sabor (Connor y Fereres, 2005). El desarrollo del fruto sigue un patrón similar a una curva doble-sigmoidea con 5 fases y dura entre 4-6 meses (Conde et al., 2008). Ocurrido el cuaje, se produce un rápido crecimiento del embrión y la semilla debido a la activa división y expansión celular, con acumulación de aceite en sus tejidos (fases 1 y 2). Luego, la esclerificación de las células del endocarpo con un lento crecimiento del fruto (i.e., endurecimiento de carozo; fase 3) precede el comienzo del periodo de mayor expansión celular y acumulación de aceite del mesocarpo (fase 4). Por último ocurre la madurez (fase 5), con un pequeño aumento del contenido de aceite en el mesocarpo a una tasa de acumulación mucho menor.

El tamaño del fruto a cosecha es una característica importante relacionada indirectamente con la producción y calidad del aceite, ya que junto con la concentración de aceite (%) determinan el contenido de aceite y de otros componentes menores del fruto (g componente fruto⁻¹). El tamaño final del fruto (y su peso) es consecuencia de la acumulación de biomasa a una determinada tasa y durante un periodo de tiempo, ambos parámetros controlados genéticamente y modulados ambientalmente. En olivo, algunos estudios correlativos demostraron que las variaciones en el peso del fruto se relacionan más fuertemente con su tasa de crecimiento que con la duración del periodo de crecimiento (Trentacoste et al., 2012; Rondanini et al., 2014), similar que en cultivos anuales (e.g., en maíz: Wang et al., 1999; en girasol: Echarte et al., 2006). Sin embargo, el papel de control de los factores ambientales, como la temperatura, sobre estos parámetros es incierto y las respuestas observadas del peso del fruto al aumento de la temperatura son contradictorias. Por un lado, Rondanini et al. (2014) relacionaron un menor tamaño de fruto en algunos cultivares (como Arauco y Arbequina) creciendo en zonas cálidas en comparación a los mismos cultivares creciendo en zonas más frescas (en un gradiente de temperaturas medias entre 23-27 °C), con menores tasas de crecimiento en los primeros. En la misma dirección, García-Inza et al. (2014) calentando ramas reproductivas encontraron que el peso seco del fruto de cv Arauco cae linealmente al superar la temperatura media los 25 °C, sin efecto por debajo de ese umbral térmico. Contrariamente, Trentacoste et al. (2012), no hallaron relación entre el peso fresco y la tasa de crecimiento del fruto con la temperatura en diez cultivares, en un rango de temperatura más bajo y acotado (18,9-19,7 °C). Recientemente, en olivos cv Picual calentados 4 °C por encima de la temperatura ambiental de Córdoba (España), Benlloch-González et al. (2019) observaron una disminución del peso seco del fruto en dos de los tres años evaluados junto a una reducción en la relación pulpa/carozo. Sin embargo, el

tratamiento calentado tuvo menos frutos cuajados (Benlloch-González et al., 2018) y la diferencia de carga entre tratamientos térmicos imposibilita resultados concluyentes, porque el número de frutos también influye en el tamaño y la composición del fruto.

En relación a la concentración de aceite, en olivo algunos estudios correlativos y posteriormente manipulativos asociaron negativamente el % de aceite del fruto con incrementos de temperatura (e.g., Trentacoste et al., 2012; Rondanini et al., 2014; García-Inza et al., 2014; Miserere et al., 2018; Benlloch-González et al., 2019), al igual que en algunos cultivos anuales donde el tema está extensamente estudiado (e.g., en girasol: Ploschuk y Hall, 1995; Rondanini et al., 2003). Sin embargo, el papel regulatorio de la temperatura sobre la tasa y duración de la acumulación de aceite no es claro. Evaluando diferentes cultivares en un mismo ambiente pero entre diferentes años Trentacoste et al. (2012) encontraron que el % de aceite disminuía con el aumento en la temperatura máxima diaria y que serían los cambios en la duración de la fase (en tiempo térmico) y no la tasa el factor que lo explicaría. Por otro lado, Rondanini et al. (2014) encontraron que la tasa de acumulación de aceite se asociaba negativamente con la temperatura media al evaluar 5 cultivares en un gradiente de altura y señalaron que sería la tasa y no la duración el factor que explicaría los cambios en la concentración de aceite. Sin embargo, en ambos estudios no todos los cultivares respondieron en forma similar a la temperatura. Por ejemplo, algunos como cv Coratina mostraron un % de aceite similar entre localidades con diferencias térmicas y altitudinales marcadas (Rondanini et al., 2014).

El perfil de ácidos grasos del aceite de oliva es un importante atributo de calidad usado para verificar su genuinidad y, aunque el genotipo es su principal determinante, parecería ser uno de los aspectos de la calidad más afectados por la temperatura. El ácido oleico es el principal ácido graso (55-83 % del total) y esto se asocia positivamente con el valor nutricional y la longevidad de almacenamiento del aceite. En general, en regiones

o años cálidos, los frutos de olivo presentan menor contenido de ácido oleico y mayor contenido de otros ácidos como el palmítico y el linoleico (Tous et al., 1997; Ceci y Carelli, 2010; Mailer et al., 2010; Orlandi et al., 2012; Rondanini et al., 2014). De hecho, algunos cultivares como Arbequina ni siquiera alcanzan el valor mínimo de ácido oleico (i.e., 55 %) establecido por el Consejo Oleícola Internacional para aceite virgen (COI, IOOC 2013). Esto es contrario a lo que ocurre en oleaginosas anuales como el girasol, donde el aceite se extrae principalmente del embrión de la semilla y aumentos de temperatura se relacionan positivamente con el % de ácido oleico (Izquierdo et al., 2006). Por otro lado, hay indicios de que la respuesta del perfil de ácidos grasos a la temperatura en olivo es genotipo dependiente. Así, mientras que cultivares como Arbequina y Arauco muestran una gran respuesta frente a variaciones en la temperatura, otros como cvs Coratina y Frantoio presentan mayor estabilidad fenotípica (Rondanini et al., 2011; 2014; García-Inza et al., 2014; 2016) señalando la relevancia de la interacción genotipo x ambiente en este aspecto, aunque estudios más profundos son necesarios.

Otro atributo importante del aceite de oliva es la presencia de compuestos menores como tocoferoles, polifenoles y clorifenoles considerados antioxidantes naturales e implicados en la preservación del aceite durante el almacenamiento, al igual que el ácido oleico. El α -tocoferol es el principal antioxidante del aceite de oliva (Sherwin, 1976; Pérez et al., 2019) representando más del 90 % del total de tocoferoles de este aceite, seguido por el γ -tocoferol. La concentración de tocoferoles en el aceite de oliva es altamente variable y depende fuertemente del cultivar (Pérez et al., 2019). Sin embargo, posibles interacciones entre genotipo x ambiente (temperatura) pueden modificar su concentración y composición (Bodoira et al., 2015). La literatura en relación a la dinámica de la acumulación de los principales tocoferoles y su contenido final en el fruto de olivo en respuesta al aumento de la temperatura es inexistente.

En resumen, en olivo a la fecha hay poca información sobre la dinámica de crecimiento del fruto y de algunos de sus principales componentes de calidad en relación a la temperatura del aire. Esta información surge principalmente de correlaciones espaciales y/o temporales que vinculan a la temperatura con las variaciones observadas, pero otros factores ambientales no considerados pueden estar detrás de estas respuestas. Sumado a esto, la interacción genotipo x ambiente no ha sido muy explorada. Es por ello que experimentos manipulando la temperatura que ayuden a un mejor entendimiento de su papel regulatorio sobre estos aspectos son necesarios. Por consiguiente, en este capítulo se realizó un experimento con el objetivo de determinar la respuesta de los principales componentes de la calidad del aceite y de algunas características del fruto a cosecha al incremento de 4 °C de la temperatura del aire durante el desarrollo del fruto. Además, se utilizaron olivos de dos cultivares con aparente respuestas contrastantes al incremento de la temperatura, cvs Arbequina y Coratina, para evaluar las posibles interacciones genotipo x ambiente. Para ello, en un grupo de árboles de similar tamaño y carga se evaluó la dinámica de crecimiento del fruto, de la acumulación de aceite, y de α - y γ - tocoferoles en el periodo comprendido entre cuaje de frutos y fin del periodo de acumulación de aceite en dos temporadas. Paralelamente, una vez determinado el fin de la acumulación de aceite se evaluaron algunas características del fruto como así también de la calidad final del aceite en otro grupo de árboles bajo tratamiento térmico durante una o dos temporadas. Adicionalmente, la información surgida a partir de los resultados de este capítulo ayuda a un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en las respuestas productivas al incremento de la temperatura, presentadas en el capítulo anterior (IV).

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Sitio experimental y material vegetal

Para cumplir con los objetivos de este estudio el experimento realizado fue el mismo detallado en el Capítulo III, el cual se repitió durante dos temporadas (2014-15 y 2015-16) y en el que se utilizaron árboles de olivo de los cvs Arbequina y Coratina, como fuera mencionado previamente. En la temporada 2014-15, la floración (i.e., plena floración, $\geq 50\%$ de flores en antesis) de estos árboles fue el 01/10/14, en cv Arbequina, y el 06/10/14, en cv Coratina; mientras que el endurecimiento de carozo (EC; momento en que el endocarpo ya no pudo ser cortado por cuchillo) ocurrió 73 y 78 días después de plena floración (DDPF), en el primer y segundo cultivar, respectivamente. En 2015-16, la floración ocurrió 17-16 días más tarde que en la primera temporada (i.e., 18/10/15 y 22/10/15), y el EC se detectó a los 70 y 71 DDPF.

5.2.2 Tratamientos térmicos y diseño experimental

Como se explicó en detalle en el Capítulo III, se usaron cámaras sin techo (OTCs) para establecer los tratamientos térmicos: control (T0), similar a la temperatura ambiente, y calentado (T+), programado para mantenerse a 4 °C por encima de T0. Los tratamientos se aplicaron luego de ocurrido el cuaje, durante la fase de síntesis y acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo) en 2014-15 y 2015-16. Para este estudio, la primera temporada se usaron cuatro árboles por OTC de similares características (i.e., tamaño y carga). La segunda temporada, uno de esos árboles fue usado nuevamente (i.e., árbol sometido a dos temporadas de calentamiento) junto a dos árboles nuevos, que la primera temporada permanecieron en el vivero a temperatura ambiente. El diseño experimental fue descrito previamente en el Capítulo III.

5.2.3 Dinámica de crecimiento del fruto, de la acumulación de aceite y de la concentración de tocoferoles

La dinámica del crecimiento del fruto (i.e., peso seco), de la acumulación de aceite (i.e., concentración en base seca) y de la concentración de tocoferoles (α y γ) en función de los DDPF se determinó a partir de muestreos sucesivos de frutos (i.e., cosechas parciales) a lo largo del período de calentamiento, en árboles bajo tratamiento térmico sólo una temporada, en 2014-15 o 2015-16. En cada fecha se muestreó sólo un árbol por OTC (cultivar x tratamiento). Para tal fin, en 2014-15, dos árboles por parcela (OTC) fueron necesarios en toda la temporada, debido a que por su corta edad (dos años) presentaban bajo número de frutos, siendo usado un árbol en las dos primeras fechas de muestreos y el restante para las fechas posteriores. Asimismo, en 2015-16, un árbol (3 años de edad) por parcela fue suficiente para los muestreos en las distintas fechas a lo largo del periodo de calentamiento. Además de los muestreos en los árboles dentro de las OTCs (bajo tratamiento), a principios de noviembre de 2014 se realizó un muestreo inicial de frutos a un grupo de cuatro árboles por cultivar ($n = 4$) de similares características (i.e., tamaño y carga) que los seleccionados para las cámaras. A partir de estas muestras se obtuvo un valor inicial en 2014-15, para cada cultivar.

Para determinar el peso seco del fruto y su concentración de aceite, en cada fecha y parcela, se cosechó una muestra de aproximadamente 20 frutos árbol⁻¹, en cv Arbequina, y 10 frutos árbol⁻¹, en cv Coratina. Luego, en el laboratorio la muestra fue secada en estufa a 75 °C hasta obtener un peso constante y se obtuvo el peso seco promedio por fruto (g fruto⁻¹) para cada cultivar x tratamiento. Posteriormente, los frutos de la muestra fueron molidos y por resonancia magnética nuclear (RMN, modelo SLK-200, Spinlock, Argentina) se obtuvo la concentración de aceite en base seca (% BS).

Para la determinación de la concentración de α - y γ -tocoferol (mg kg aceite^{-1}), en cada fecha se cosechó una muestra por parcela de similar número de frutos que para peso seco y % de aceite. Estos frutos se colocaron inmediatamente en un freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su envío al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET/ Universidad Nacional de Córdoba) donde se realizaron las determinaciones. Brevemente, se liofilizaron las muestras de frutos y se extrajo el aceite con n-hexano a temperatura ambiente en la oscuridad. Se determinó la composición de tocoferol a partir de alícuotas de 1 g de aceite. Luego, los tocoferoles se identificaron y cuantificaron mediante HPLC (Perkin-Elmer, Shelton, CT, EE.UU.) de acuerdo con el procedimiento de Lazzez et al. (2008) con algunas modificaciones reportadas por Bodoira et al. (2015). Así, se identificaron los tocoferoles individuales al comparar sus tiempos de retención con los de los estándares auténticos (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA). Los tocoferoles individuales se cuantificaron mediante el método estándar externo.

5.2.4 Valores finales de los parámetros de la calidad de aceite

Una vez finalizada la fase de síntesis y acumulación de aceite (principios de mayo) se determinaron algunas características del fruto en árboles bajo una (2014-15 o 2015-16) o dos (2014-16) temporadas de tratamiento. Para tal fin, se utilizaron dos árboles por parcela y por temporada. En 2014-15 estos árboles tenían similar tamaño e igual carga entre tratamientos respectivos al iniciar el periodo de calentamiento y no se les realizaron cosechas parciales de frutos durante el crecimiento de los mismos. La segunda temporada, uno de esos árboles se usó nuevamente en el experimento (árbol con dos temporadas de calentamiento) junto con un árbol nuevo, sin previo tratamiento aunque coetáneo. Los árboles con una temporada previa de calentamiento presentaron diferencias de carga entre tratamientos, en el caso del cv Arbequina, o similar carga en cv Coratina, aunque con

muy bajo número de frutos. Mientras que, los árboles sin tratamiento previo, al igual que en 2014-15, fueron seleccionados por tamaño y carga similar. En cada temporada, se cosecharon todos los frutos de cada árbol. En 2014-15 la fecha de cosecha fue el 13/04/15, mientras que en 2015-16 fue el 28/04/16 tanto en los árboles bajo una y dos temporadas de tratamiento.

En el laboratorio, a partir de una muestra de 100 frutos por árbol se determinó de manera visual el Índice de Madurez (IM), clasificando cada fruto de la muestra dentro de ocho clases (0 a 7) según el color de su piel y pulpa (Uceda y Hermoso, 2001). De esta forma el IM se calculó como la sumatoria de los productos del número de frutos de cada clase por el valor numérico de cada clase, dividido por el número total de frutos de la muestra (i.e., 100). Luego, se determinaron el contenido de aceite por fruto (g fruto^{-1}) y la composición de ácidos grasos del aceite. Para ello, primero los frutos de la muestra fueron secados en estufa a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se determinó su peso seco; seguidamente los frutos fueron molidos, se determinó la concentración de aceite en base seca (% BS) por RMN (modelo SLK-200, Spinlock, Argentina) y se estimó el contenido de aceite por fruto a partir del producto del peso seco individual del fruto (cociente entre el peso seco y el número de frutos de la muestra) y su % aceite. Por otro lado, a la muestra seca y molida se le extrajo el aceite con n-hexano a temperatura ambiente y una alícuota de aceite se metiló en frío en un medio básico (IOOC, 2013) para luego determinar la composición de ácidos grasos del aceite por separación mediante cromatografía de gases (PerkinElmer Pregisely Claurus 500, USA) equipado con una columna (ZB-WAX, Zebron USA) de 30 m longitud, 0,25 mm ID y 0,25 micrones de Film Thickness. Se usó el inyector split y el detector FID, hidrógeno como gas portador y las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 240 y $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. La temperatura del horno se programó a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, incrementando de $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ a razón de $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y

se mantuvo a 240 °C por 10 min. Los principales ácidos grasos individuales se determinaron por comparación con los tiempos de retención de estándares conocidos (AOCS-1, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) y expresados como porcentaje del total.

A partir de otra muestra de 30 frutos por árbol se determinó el peso seco del mesocarpo (pulpa) y endocarpo (carozo; incluida la semilla) y la relación entre ambos. Para ello, primero los frutos se secaron en estufa a 75 °C y se obtuvo su peso seco (g) usando una balanza de precisión. Luego los frutos fueron hervidos hasta que fue posible separar el carozo de la pulpa. Los carozos fueron limpiados, colocados en estufa a 75 °C hasta peso constante y luego pesados con una balanza de precisión. De la diferencia entre el peso seco de la muestra y el de los carozos se obtuvo el peso seco del mesocarpo. Finalmente, a partir de la relación entre el peso seco de mesocarpo y el del endocarpo, se determinó la relación entre ambos. Además, se estimó la concentración de aceite del mesocarpo a partir de la relación mesocarpo/endocarpo, la concentración de aceite del fruto (% BS) y considerando que el 4,5 % del aceite total del fruto proviene del endocarpo + semilla (Conde et al., 2008).

La concentración final de α - y γ -tocoferol se obtuvo a partir de la última muestra de frutos cosechada para determinar la dinámica de acumulación de estos tocoferoles (ver sección anterior). A partir de otra muestra de las mismas plantas y fecha se estimó el contenido de aceite del fruto a partir de la concentración de aceite y el peso seco del fruto, de la misma manera anteriormente descrita para otras muestras. Finalmente, de la relación entre la concentración de tocoferoles y el contenido de aceite del fruto y el peso seco del fruto se obtuvo la concentración de tocoferoles (en mg kg PS fruto⁻¹) y el contenido de tocoferoles (en mg fruto⁻¹), respectivamente.

5.2.5 Análisis estadístico

Se ajustó un modelo lineal o bilineal entre los valores medios de cada variable analizada a lo largo de cada periodo de calentamiento en función de los DDPF. Las funciones significativas presentadas en las figuras 5.2-5.4 y cuadro 5.1 corresponden al valor r^2 más alto para cada combinación de cultivar x tratamiento en cada variable analizada. Paralelamente, se realizó un ANOVA de dos vías a los valores de los parámetros de los modelos (pendiente y plateau) obtenidos de cada repetición de la combinación cultivar x tratamiento ($n = 4$). Por otro lado, los valores obtenidos a cosecha final de las características del fruto y de la composición de ácidos grasos, se analizaron en cada temporada usando ANOVA de dos vías. Los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad de los datos fueron previamente verificados en todas las variables analizadas usando las pruebas de Levene y Shapiro-Wilks, respectivamente. Los datos de la concentración de α -tocoferol en PS del fruto y de la proporción de algunos ácidos grasos (i.e., ácido palmítico, ácido linoleico y ácido linolénico) de los frutos de los árboles bajo tratamiento sólo en 2015-16 fueron transformados cuando la función $\sqrt[2]{x}$ ya que el supuesto de homogeneidad de varianza no se cumplía en estas variables. Sin embargo, en los cuadros 5.3 y 5.4 se presentan los valores promedios sin transformar de estas variables para una mejor interpretación de los mismos. En todos los casos, se utilizó el test de Duncan para discriminar entre medias cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) en la interacción entre factores. Los ANOVA se realizaron en el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2018), mientras que los gráficos y funciones en las diferentes figuras se realizaron utilizando el software Graph-Pad Prism versión 6.01 (GraphPad Prism Software, Inc., LaJolla, CA, EE. UU.).

5.3 Resultados

5.3.1 Temperatura del aire durante los periodos bajo tratamiento térmico

Los tratamientos térmicos, T0 y T+ tuvieron la misma dinámica diaria de temperatura que el ambiente exterior, pero las OTCs T+ estuvieron siempre a una mayor temperatura que las T0, por lo que la temperatura media diaria fue superior en T+ a lo largo de todo el periodo de calentamiento, en ambas temporadas (figura 5.1). La primera temporada, la temperatura media diaria dentro de las OTCs varió entre 11 y 34 °C. En promedio, la temperatura media diaria fue 22 °C en T0 y 25 °C en T+, 2,7 °C más elevada que T0 (figura 5.1a). En la segunda temporada, la temperatura media diaria registrada dentro de las OTCs varió entre 6 y 35 °C y en promedio fue de 22 °C en T0 y 26 °C en T+, 3,6 °C más elevada que el control (figura 5.1b). Además, en ambas temporadas, la temperatura de T0 fue sólo ligeramente superior a la temperatura del ambiente exterior (i.e., menos de 1 °C de diferencia).

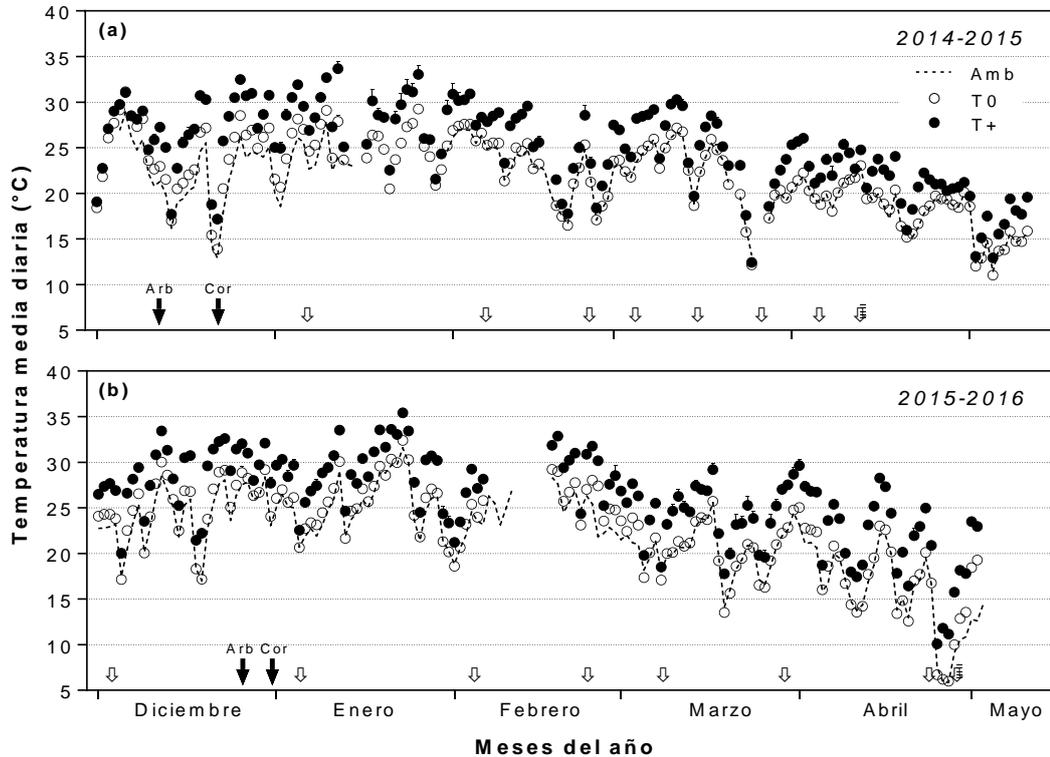


Figura 5.1. Temperatura media del aire en el interior de las OTCs control (T0) y calentada (T+), durante la primera (2014-15, a) y segunda (2015-16, b) temporada de experimento. Las OTCs fueron utilizadas en la temporada durante la fase de acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo). Cada símbolo representa el promedio ± 1 error estándar ($n = 8$) del valor medio diario del tratamiento térmico. La segunda temporada, no se registró la temperatura de las OTCs los días entre 7-17 de febrero y 1-3 de mayo, debido a un problema en el almacenador de datos, pero los sistemas de calentamiento y ventilación estuvieron funcionando. También, se indican los valores de la temperatura del aire fuera de las cámaras (Amb) con una línea de puntos y las fechas de endurecimiento de carozo para cada cultivar (flechas negras) y de muestreos de frutos dentro de las OTCs (cosechas parciales, flechas vacías; y cosecha final, flechas rayadas).

5.3.2 Dinámicas de crecimiento y acumulación de aceite del fruto

En las dos temporadas evaluadas, modelos bilineales y separados para cada cultivar x tratamiento térmico fueron los que mejor caracterizaron la dinámica del peso seco del fruto en función de los DDPF ($r^2 = 0,94-1,00$; figura 5.2). En todos los caso hubo una primera etapa de incremento lineal de peso seco seguida de una etapa de meseta, luego de alcanzado el valor máximo. Al analizar los parámetros de las regresiones obtenidas para cada repetición (cuadro 5.2), se detectó que en 2014-15 la tasa de

incremento de peso seco de los frutos de T+ se redujo un 22 % en cv Arbequina y 18 % en cv Coratina con respecto a T0. En 2015-16 las tasas no fueron estadísticamente diferentes aunque en cv Arbequina el comportamiento fue similar al año anterior. Contrariamente a la tasa, en ningún caso se detectaron diferencias significativas entre tratamientos térmicos en la duración del periodo de incremento lineal. En promedio, en cv Arbequina el peso seco máximo del fruto se alcanzó 172 DDPF en 2014-15 y seis días más tarde en 2015-16, mientras que en cv Coratina, se alcanzó a los 155 y 131 DDPF en la primera y segunda temporada, respectivamente. Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre cultivares para la tasa (en mg día^{-1}) y duración (en días) del periodo de incremento lineal. Así, mientras que cv Coratina creció a mayor tasa, el cv Arbequina lo hizo durante más tiempo.

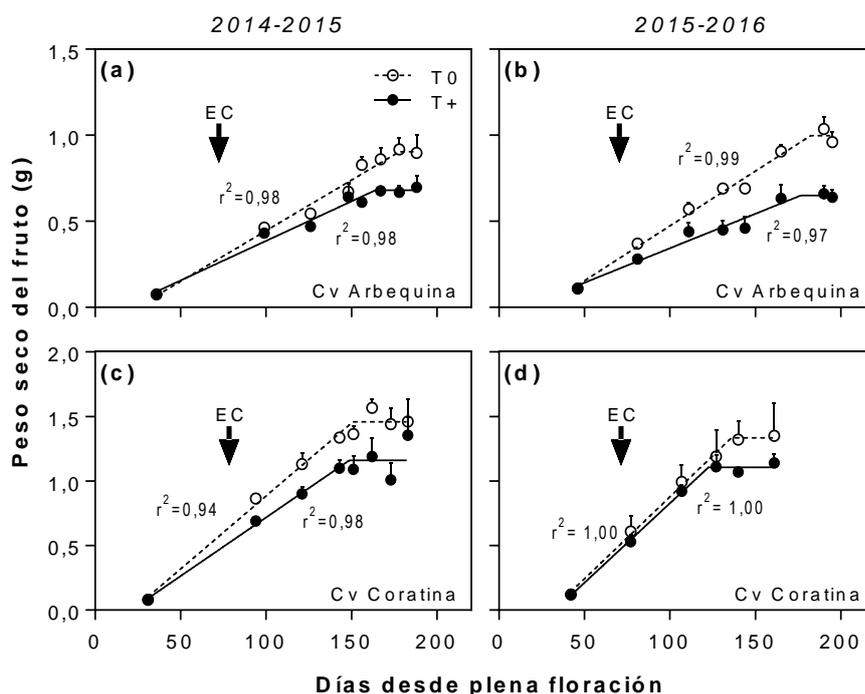


Figura 5.2. Dinámica de la evolución del peso seco del fruto (g) en función de los días desde plena floración en olivos cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+, 3-4 °C por encima de T0). Los tratamientos se aplicaron luego del cuaje final, durante toda la fase de acumulación de aceite (diciembre a mayo), en 2014-15 (a y c) o 2015-16 (b y d). El momento de endurecimiento de carozo (EC) en cada temporada y para cada cultivar se indica con una flecha. Cada punto representa el promedio \pm 1 error estándar ($n=4$) de cada cultivar x tratamiento. Se muestra la regresión bilineal con el mejor ajuste para cada caso.

Cuadro 5.1. Parámetros de las regresiones bilineales con mejor ajuste obtenidas para el crecimiento de fruto (g) y acumulación de aceite (%) en función de los días desde plena floración en árboles de olivos cvs Arbequina y Coratina control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron durante un periodo, desde cuaje hasta final de la fase de acumulación de aceite, en 2014-15 o 2015-16. Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; ns , no significativo.

Temporada	Cultivar	Tratamiento	Crecimiento del fruto		Acumulación de aceite	
			Tasa ¹ (mg día ⁻¹)	Duración ² (DDPF)	Tasa ¹ (% día ⁻¹)	Duración ² (DDPF)
2014-2015	Arbequina	T0	5,9 \pm 0,5	178 \pm 10	0,41 \pm 0,02	170 \pm 3
		T+	4,6 \pm 0,4	165 \pm 8	0,33 \pm 0,03	167 \pm 8
	Coratina	T0	10,8 \pm 0,6	158 \pm 5	0,49 \pm 0,04	151 \pm 5
		T+	8,9 \pm 1,3	151 \pm 12	0,39 \pm 0,02	156 \pm 3
		p trat.	$\leq 0,01$	ns	$\leq 0,01$	ns
		p cv	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$
	p int.	ns	ns	ns	ns	
2015-2016	Arbequina	T0	6,4 \pm 0,4	182 \pm 7	0,49 \pm 0,02	156 \pm 3
		T+	4,0 \pm 0,4	177 \pm 11	0,31 \pm 0,03	180 \pm 8
	Coratina	T0	12,7 \pm 0,5	136 \pm 3	0,37 \pm 0,01	172 \pm 3
		T+	12,3 \pm 0,7	126 \pm 3	0,29 \pm 0,01	170 \pm 3
		p trat.	ns	ns	$\leq 0,01$	ns
		p cv	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	ns
	p int.	ns	ns	ns	ns	

¹ Pendiente de la regresión bilineal con meseta luego de alcanzado valor máximo (ver figuras 5.2 y 5.3)

² Momento en que se alcanza el valor máximo (ver figuras 5.2 y 5.3)

La dinámica de acumulación de aceite se determinó a partir del endurecimiento de carozo en 2014-15 y aproximadamente un mes antes en 2015-16. Como resultado, en la primera temporada, modelos bilineales con un periodo de acumulación lineal hasta un máximo % aceite seguido de una meseta fueron los que mejor se ajustaron a los datos de cada combinación cultivar x tratamiento ($r^2 = 0,96-0,99$; figura 5.3a y c), mientras que en 2015-16 curvas sigmoideas fueron las que mejor caracterizaron las dinámicas ($r^2=1,00$; Apéndice VII). Para hacer comparables las temporadas, los datos de 2015-16 se ajustaron a regresiones bilineales omitiendo la primera fecha de datos y forzando a las funciones a ser igual a cero alrededor de EC, momento en que empieza la acumulación lineal de aceite ($r^2 = 0,99-1,00$; figura 5.3b y d). Diferencias significativas entre cultivares y tratamientos

térmicos fueron encontrados en ambas temporadas para la tasa de acumulación de aceite (cuadro 5.1). Así, en 2014-15, la tasa de acumulación de los frutos T+ fue un 20 % menor que en T0 en ambos cultivares, mientras que en 2015-16 esta reducción fue del 37 % y 22 % para cv Arbequina y cv Coratina, respectivamente. Por otro lado, en ninguna de las temporadas se detectaron diferencias significativas entre tratamientos térmicos en el momento en que se alcanza el máximo valor de % de aceite, indicando que la duración del periodo de acumulación fue similar entre los frutos T+ y T0, pero sí se encontraron diferencias entre cultivares en 2014-15 (cuadro 5.1).

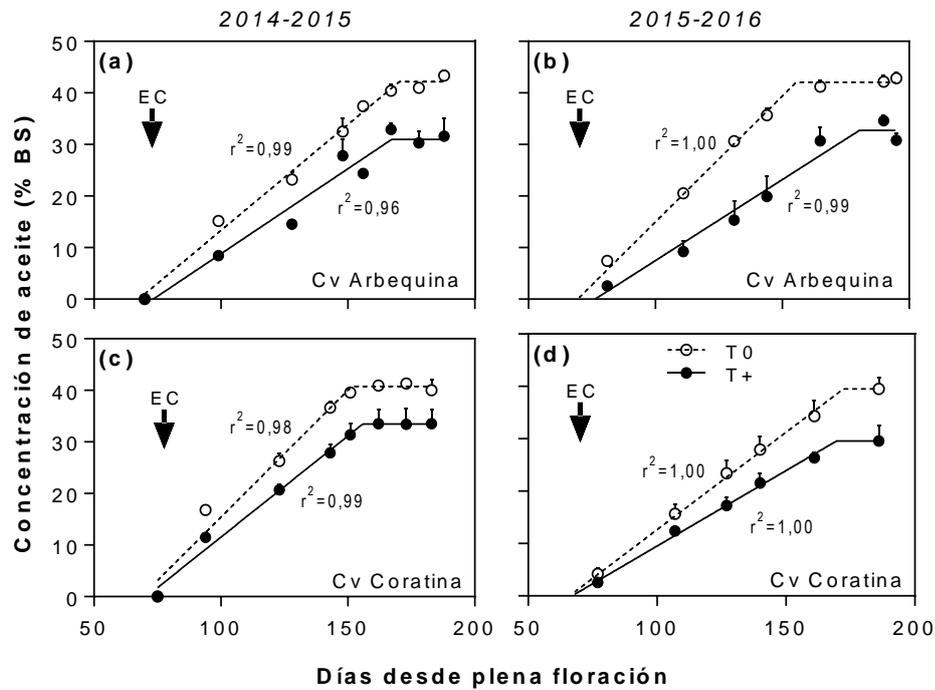


Figura 5.3. Dinámica de la acumulación de aceite (% BS) en frutos de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos se aplicaron en árboles enteros en la fase de acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo) durante una temporada (2014-15, a y c; 2015-16, b y d). Cada símbolo representa el promedio \pm 1 error estándar ($n=4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. El momento de endurecimiento de carozo (EC) se indica con una flecha negra. Para cada cultivar x tratamiento térmico se indica el mejor ajuste bilineal.

5.3.3 Características del fruto a cosecha en árboles bajo una o dos temporadas de calentamiento

Luego de determinado el final del periodo de acumulación de aceite, se evaluaron algunas características de frutos cosechados provenientes de árboles bajo una (2014-15 o 2015-16) o dos temporadas consecutivas de tratamiento térmico (cuadro 5.2). En estos árboles la carga de frutos no fue alterada durante el período de tratamiento a través de cosechas parciales. En los árboles bajo tratamiento sólo una temporada, el peso seco del mesocarpo de los frutos T+ de la temporada 2015-16 se redujo un 48 % en cv Arbequina y 33 % en cv Coratina, con respecto a T0. El endocarpo de estos frutos tuvo un comportamiento distinto según el cultivar: mientras que en cv Arbequina no hubo efecto del tratamiento, en cv Coratina T+ hubo una reducción del 20 % del peso con respecto a T0. Como consecuencia, la relación mesocarpo/endocarpo en cv Arbequina T+ se redujo 43 % mientras que en cv Coratina T+ la reducción fue del 17 % (aunque no estadísticamente diferente que T0) en comparación con sus respectivos T0. Por otro lado, la concentración de aceite del fruto fue menor en T+ que en T0. En 2014-15, la reducción en T+ fue 33 % en cv Arbequina y 26 % en cv Coratina, mientras que en 2015-16 fue 51 % en ambos cultivares. La concentración de aceite del mesocarpo de los frutos de la temporada 2015-16 fue 7-8 puntos porcentuales menor en T+ que en T0 en ambos cultivares. Tanto en 2014-15 como en 2015-16, el IM fue similar entre tratamientos térmicos pero no entre cultivares, siendo el estado de madurez de cv Arbequina más avanzado que el de cv Coratina en ambas temporadas.

Cuadro 5.2. Características del fruto a cosecha (en abril) en árboles control (T0) y calentados (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron durante una temporada, desde cuaje hasta final de la fase de acumulación de aceite, en 2014-15 o 2015-16, o dos temporadas consecutivas (evaluando sólo los frutos de la segunda temporada, 2015-16). Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el p -valor para los factores cultivar (cv) y tratamiento térmico (trat.) y la interacción (int.) entre ambos. P -valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p \leq 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; ns , no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).

Temporada/ periodo de calentamiento	Cultivar	Tratamiento	Peso Seco (g)			Contenido de aceite (g fruto ⁻¹)	Concentración de aceite mesocarpo (%) ¹	IM
			Mesocarpo	Endocarpo	Relación mesoc./encoc.			
2014-2015 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	<i>sd</i>	<i>sd</i>	<i>sd</i>	0,45 \pm 0,01 c	<i>sd</i>	4,9 \pm 0,4
		T+	<i>sd</i>	<i>sd</i>	<i>sd</i>	0,30 \pm 0,01 d	<i>sd</i>	4,4 \pm 0,2
	Coratina	T0	<i>sd</i>	<i>sd</i>	<i>sd</i>	0,88 \pm 0,01 a	<i>sd</i>	2,3 \pm 0,4
		T+	<i>sd</i>	<i>sd</i>	<i>sd</i>	0,65 \pm 0,03 b	<i>sd</i>	1,6 \pm 0,1
	p trat.	-	-	-	$\leq 0,01$	-	0,08	
	p cv	-	-	-	$\leq 0,01$	-	$\leq 0,01$	
	p int.	-	-	-	$\leq 0,05$	-	<i>ns</i>	
2015-2016 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	0,71 \pm 0,06	0,28 \pm 0,01 c	2,48 \pm 0,15 a	0,41 \pm 0,03	58 \pm 1	3,8 \pm 0,6
		T+	0,37 \pm 0,03	0,26 \pm 0,01 c	1,41 \pm 0,10 c	0,20 \pm 0,02	50 \pm 1	3,3 \pm 0,3
	Coratina	T0	1,20 \pm 0,12	0,57 \pm 0,03 a	2,09 \pm 0,12 b	0,77 \pm 0,08	58 \pm 1	0,5 \pm 0,1
		T+	0,81 \pm 0,04	0,47 \pm 0,03 b	1,73 \pm 0,03 bc	0,38 \pm 0,05	51 \pm 0	1,0 \pm 0,3
	p trat.	$\leq 0,01$	<i>ns</i>					
	p cv	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	
	p int.	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	
2015-2016 (2 periodos de calentamiento)	Arbequina	T0	0,76 \pm 0,04 b	0,30 \pm 0,01 c	2,57 \pm 0,05	0,45 \pm 0,02 b	60 \pm 1	4,1 \pm 0,4
		T+	0,45 \pm 0,05 c	0,32 \pm 0,02 c	1,38 \pm 0,13	0,24 \pm 0,03 c	49 \pm 2	4,7 \pm 0,1
	Coratina	T0	1,05 \pm 0,19 a	0,52 \pm 0,07 a	1,98 \pm 0,15	0,66 \pm 0,08 a	57 \pm 3	3,5 \pm 0,2
		T+	0,54 \pm 0,10 bc	0,46 \pm 0,04 b	1,14 \pm 0,11	0,24 \pm 0,03 c	41 \pm 4	3,0 \pm 0,3
	p trat.	$\leq 0,01$	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>	
	p cv	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	
	p int.	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	0,09	$\leq 0,05$	<i>ns</i>	0,09	

¹ La concentración de aceite del mesocarpo (% BS) se estimó a partir del peso seco del fruto, de la relación mesocarpo/endocarpo, de la concentración de aceite del fruto y asumiendo que el aceite del endocarpo + semilla representa el 4,5 % del aceite total del fruto

En los frutos provenientes de árboles bajos dos temporadas de tratamiento térmico, la respuesta del peso seco del mesocarpo y endocarpo, del contenido de aceite del fruto, de la concentración de aceite del mesocarpo y del IM al calentamiento fue similar a la de los frutos bajo sólo una temporada de calentamiento (cuadro 5.2). La reducción del peso del mesocarpo de los frutos T+ fue de 41 % y 49 % en cv Arbequina y cv Coratina, respectivamente, en comparación con sus T0. El peso seco del endocarpo de cv Arbequina fue similar entre tratamientos, mientras que en cv Coratina T+ hubo una reducción del 12 % con respecto a su control. Consecuentemente, la relación mesocarpo/endocarpo de los frutos T+ cayó 46 % en cv Arbequina y 42 % en cv Coratina con respecto a T0. Por otro lado, la reducción de la concentración de aceite del fruto fue del 47 % en cv Arbequina T+ y 64 % en cv Coratina en relación a su T0. El % de aceite del mesocarpo fue 11 puntos porcentuales menor en cv Arbequina T+ y 16 puntos porcentuales menor en cv Coratina T+ que sus T0. Finalmente, el IM fue similar entre tratamientos térmicos pero no entre cultivares.

5.3.4 Composición final de ácidos grasos en frutos de árboles bajo una o dos temporadas de calentamiento

La composición (en % del total de ácidos grasos) de los principales ácidos grasos (AG) del aceite varió entre los cultivares y tratamientos térmicos evaluados, observándose en algunos casos interacción entre ambos factores (cultivar x tratamiento térmico) (cuadro 5.3). El ácido oleico fue el AG más abundante y su proporción varió entre 45-75 %, con los valores más bajos obtenidos en cv Arbequina. En 2014-15, el calentamiento redujo un poco más de 5 puntos porcentuales el nivel de oleico en cv Arbequina T+ con respecto a su control T0, mientras que en cv Coratina no se observaron diferencias entre

tratamientos. Por el contrario, en 2015-16, los T+ de ambos cultivares tuvieron una reducción del nivel de ácido oleico con respecto a sus T0, aunque en el caso de los árboles cv Coratina bajo dos periodos de tratamiento la diferencia entre T+ y T0 fue más pequeña por lo que la interacción cultivar x tratamiento térmico fue marginalmente significativa.

El segundo y tercer AG más abundante fueron el ácido linoleico, con valores entre 8 y 26 %, y el palmítico, variando entre 14-21 %. En general, el cv Arbequina tuvo niveles más elevados que cv Coratina. En relación al primero, en 2014-15 el T+ de cv Arbequina tuvo un incremento de 3 puntos porcentuales de linoleico con respecto a su control, pero esto no ocurrió en cv Coratina, donde el % fue similar entre T+ y T0. En 2015-16 algo similar se observó en los árboles bajo dos temporadas de calentamiento. Lo contrario ocurrió en sus coetáneos sólo calentados esa temporada (2015-16), ya que el % de linoleico aumentó 3 puntos porcentuales en cv Coratina T+ pero no en cv Arbequina T+, que se mantuvo similar a su T0. Por otro lado, el ácido palmítico aumentó en T+ con respecto a sus respectivos T0. En 2014-15 este aumento fue cercano a 1 punto porcentual, mientras que en 2015-16 fue alrededor de 3 puntos. Por último, la proporción de esteárico tendió a aumentar en T+ respecto de T0 mientras que el linolénico se mantuvo constante entre tratamientos térmicos.

Cuadro 5.3. Composición final de los principales ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) en frutos de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+, 3-4 °C por encima de T0). Los tratamientos térmicos se establecieron durante el periodo de síntesis y acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo) durante una (2014-15 o 2015-16) o dos temporadas consecutivas, evaluando sólo los frutos de la segunda. Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar (n = 4) para cada cultivar y tratamiento térmico. Se indica el *p*-valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. *P*-valor significativo ($p \leq 0,05$) y altamente significativo ($p < 0,01$), en negrita; marginalmente significativo ($p \leq 0,1$) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores determinadas mediante la prueba Duncan ($p \leq 0,05$).

Temporada/ periodo de calentamiento	Cultivar	Tratamiento	Composición final de ácidos grasos en el aceite del fruto (%)				
			Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico
2014-2015 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	19,76 \pm 0,12	1,59 \pm 0,02	50,0 \pm 0,8 b	23,2 \pm 0,5 b	0,55 \pm 0,10
		T+	20,81 \pm 0,23	1,64 \pm 0,04	45,5 \pm 0,9 c	26,4 \pm 0,5 a	0,65 \pm 0,16
	Coratina	T0	12,95 \pm 0,43	2,08 \pm 0,03	67,0 \pm 1,1 a	15,4 \pm 0,9 c	0,74 \pm 0,12
		T+	13,74 \pm 0,19	2,10 \pm 0,04	67,8 \pm 0,6 a	13,7 \pm 0,4 c	0,74 \pm 0,11
	<i>p</i> trat.		$\leq 0,01$	<i>ns</i>	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>
	<i>p</i> cv		$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>
	<i>p</i> int.		<i>ns</i>	<i>ns</i>	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>
2015-2016 (1 periodo de calentamiento)	Arbequina	T0	19,5 \pm 0,7	1,58 \pm 0,03	54,7 \pm 1,6	18,7 \pm 0,9 a	0,65 \pm 0,03
		T+	22,3 \pm 0,9	1,78 \pm 0,15	51,6 \pm 2,4	18,2 \pm 2,6 a	0,48 \pm 0,20
	Coratina	T0	12,7 \pm 0,3	2,03 \pm 0,05	74,7 \pm 0,8	7,8 \pm 0,6 c	0,65 \pm 0,05
		T+	15,5 \pm 0,5	2,20 \pm 0,10	68,5 \pm 0,4	10,8 \pm 0,7 b	0,67 \pm 0,03
	<i>p</i> trat.		$\leq 0,01$	0,07	$\leq 0,05$	$\leq 0,05$	<i>ns</i>
	<i>p</i> cv		$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	<i>ns</i>
	<i>p</i> int.		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	$\leq 0,05$	<i>ns</i>
2015-2016 (2 periodos de calentamiento)	Arbequina	T0	18,6 \pm 0,2	1,68 \pm 0,08	57,4 \pm 1,3	16,6 \pm 0,7 b	0,53 \pm 0,03
		T+	21,1 \pm 0,4	1,85 \pm 0,05	50,0 \pm 0,5	21,0 \pm 0,7 a	0,63 \pm 0,22
	Coratina	T0	14,1 \pm 0,4	2,08 \pm 0,09	66,3 \pm 1,0	13,9 \pm 1,0 c	0,85 \pm 0,05
		T+	18,5 \pm 0,6	2,43 \pm 0,13	63,0 \pm 1,1	12,5 \pm 0,5 c	0,85 \pm 0,12
	<i>p</i> trat.		$\leq 0,01$	$\leq 0,05$	$\leq 0,01$	0,07	<i>ns</i>
	<i>p</i> cv		$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,01$	$\leq 0,05$
	<i>p</i> int.		0,06	<i>ns</i>	0,08	$\leq 0,01$	<i>ns</i>

5.3.5 Dinámica de la concentración de α - y γ -tocoferoles

La dinámica de la concentración de los principales tocoferoles (en mg kg aceite¹) fue evaluada luego del endurecimiento de carozo hasta el final de la síntesis de aceite del fruto en árboles bajo una temporada de tratamiento térmico en 2014-15 o 2015-16. Modelos lineales o bilineales para cada cultivar x tratamiento térmico fueron fijados para describir la dinámica de α - y γ -tocoferol en función de los DDPF con un alto grado de ajuste en la mayoría de los casos ($r^2 = 0,97-1,00$; figura 5.4), con excepción del γ -tocoferol de cv Coratina T+ en 2015-16 donde ningún ajuste de este tipo fue posible (figura 5.4h). En todos los casos los valores máximos se obtuvieron temprano y luego se produjo una fuerte disminución lineal (pendiente negativa) a medida que aumentaron los DDPF hasta alcanzar un valor final mínimo, en algunos casos seguidos de una meseta.

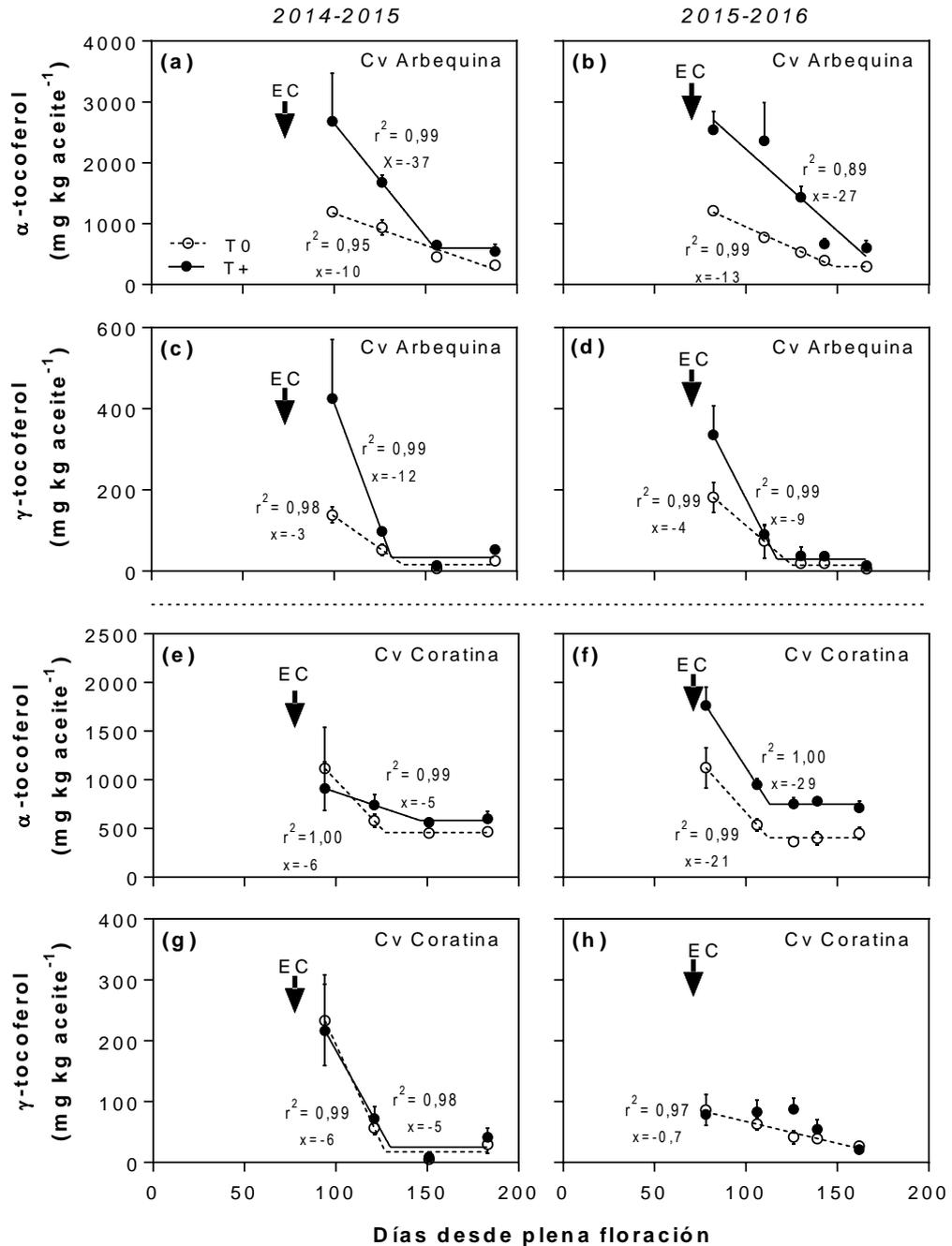


Figura 5.4. Dinámica de la concentración en aceite de los principales tocoferoles (α y γ) en función de los DDPF en frutos de olivo cvs Arbequina (a-e) y Coratina (f-h). Los árboles de olivo estuvieron bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+) una vez ocurrido el cuaje y durante toda la fase de acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo) en 2014-15 (a, c, e, g) o 2015-16 (b, d, f, h). Cada punto representa el promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) de cada cultivar \times tratamiento térmico. El momento de endurecimiento de carozo (EC) se indica con una flecha. Se indica además la regresión lineal o bilineal con mejor ajuste (r^2) y el valor de la pendiente (x , en $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$).

3.3.6 Concentración y contenido final de α - y γ -tocoferoles

La concentración (en mg kg aceite⁻¹ y mg kg fruto⁻¹) y el contenido ($\mu\text{g fruto}^{-1}$) final de α - y γ -tocoferol en frutos de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos durante la fase de síntesis y acumulación de aceite de 2014-15 o 2015-16 se muestran en el cuadro 5.4. La concentración de α -tocoferol expresada en relación al aceite del fruto varió entre 298-605 mg kg aceite⁻¹ y fue entre 28-103 % mayor en el tratamiento T+ que en T0 en ambas temporadas y cultivares, aunque las diferencias fueron proporcionalmente mayores en cv Arbequina y en la segunda temporada. Sin embargo, al expresar la concentración en mg por kg PS fruto, esta diferencia a favor de T+ fue significativa sólo en 2015-16, donde T+ tuvo 45 % y 30 % más α -tocoferol que T0 en los cvs Arbequina y Coratina, respectivamente. El contenido de α -tocoferol por fruto fue similar entre tratamientos térmicos y varió entre 109-266 $\mu\text{g fruto}^{-1}$, siendo los valores en cv Coratina mayores que en cv Arbequina, como era esperable debido al mayor tamaño y peso seco del fruto.

Por otro lado, la concentración de γ -tocoferol expresada tanto en aceite como en fruto fue similar entre tratamientos térmicos en 2014-15, mientras que en 2015-16 el tratamiento tuvo un efecto opuesto entre los cultivares (i.e., interacción cultivar x tratamiento térmico altamente significativa, $p \leq 0,01$). Así, mientras que en cv Coratina T+ la concentración de γ -tocoferol fue un 58 % y 30 % menor con respecto a su T0, expresada en relación al aceite y al fruto, respectivamente, en cv Arbequina T+ la concentración aumentó un 100 % en relación a su T0, en ambas formas de expresión. En cuanto al contenido de γ -tocoferol por fruto, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguna de las temporadas analizadas.

Cuadro 5.4. Concentración (mg kg aceite⁻¹; mg kg fruto⁻¹) y contenido (µg fruto⁻¹) final de α- y γ-tocoferol en frutos de olivo cvs Arbequina y Coratina bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos térmicos se aplicaron una vez ocurrido el cuaje y durante la fase de acumulación de aceite de 2014-15 o 2015-16. Los valores corresponden al promedio ± 1 error estándar (n = 4) de cada cultivar x tratamiento térmico. Se indica el *p*-valor para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción (int.) entre ambos. *P*-valor significativo (*p* ≤ 0,05) y altamente significativo (*p* ≤ 0,01), en negrita; marginalmente significativo (*p* ≤ 0,1) en normal; *ns*, no significativo. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre las combinaciones de factores según lo determinado mediante la prueba Duncan (*p* ≤ 0,05).

Temporada	Cultivar	Tratamiento	Concentración (mg kg aceite ⁻¹)		Concentración por PS fruto (mg kg fruto ⁻¹)		Contenido por fruto (µg fruto ⁻¹)	
			α	γ	α	γ	α	γ
2014-2015	Arbequina	T0	319 ± 24	26 ± 2	138 ± 7	11 ± 1	124 ± 16	10 ± 2
		T+	545 ± 118	53 ± 11	161 ± 20	16 ± 3	111 ± 14	12 ± 2
	Coratina	T0	468 ± 46	29 ± 14	185 ± 10	11 ± 5	265 ± 19	14 ± 6
		T+	599 ± 78	41 ± 14	195 ± 15	14 ± 5	266 ± 37	18 ± 6
	<i>p</i> trat.		≤ 0,01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	<i>p</i> cv		≤ 0,1	<i>ns</i>	≤ 0,01	<i>ns</i>	≤ 0,01	<i>ns</i>
	<i>p</i> int.		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
2015-2016	Arbequina	T0	298 ± 27	5 ± 1 d	122 ± 7	2 ± 1 c	110 ± 4	2 ± 0
		T+	605 ± 117	14 ± 3 c	177 ± 17	4 ± 1 bc	109 ± 8	3 ± 1
	Coratina	T0	452 ± 69	27 ± 7 a	145 ± 7	9 ± 2 a	171 ± 40	10 ± 2
		T+	713 ± 70	21 ± 2 b	187 ± 16	6 ± 0 b	212 ± 12	6 ± 1
	<i>p</i> trat.		≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
	<i>p</i> cv		≤ 0,1	≤ 0,01	<i>ns</i>	≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,01
	<i>p</i> int.		<i>ns</i>	≤ 0,01	<i>ns</i>	≤ 0,01	<i>ns</i>	<i>ns</i>

5.4 Discusión

En el Capítulo IV de esta tesis se mostró como el peso seco del fruto y la concentración de aceite final se redujeron en T+ por el incremento de 3-4 °C de la temperatura durante la mayor parte del crecimiento del fruto (figura 4.2d-i). En el presente capítulo, a partir del análisis de las dinámicas bilineales de incremento de peso seco y % de aceite en el fruto, se determinó que, en el rango de temperaturas explorado, el incremento de 3-4 °C entre la fase 3-5 de desarrollo del fruto provocó una disminución en la tasa de llenado (mg día^{-1} o $\% \text{ día}^{-1}$) pero no en la duración (en días), que se mantuvo similar (figura 5.2 y 5.3; cuadro 5.1). En 2015-16 en cv Coratina las pendientes del crecimiento del peso seco del fruto no fueron estadísticamente distintas entre T0 y T+ (figura 5.2d), existiendo entonces interacción genotipo x ambiente (i.e., cv x tratamiento térmico). Esto probablemente este asociado a que los árboles T+ tuvieron la mitad de carga que los T0 (i.e., 250 vs 400 frutos) pero similar desarrollo de copa, generando menor competencia por recursos disponibles y un crecimiento a mayor tasa, contrarrestando el efecto del incremento de la temperatura. En olivo diferencias en cargas provocan diferencias en las tasas de crecimiento tanto de brotes como frutos, sugiriendo una limitación por fuentes de fotoasimilados desde temprano en la estación (Trentacoste et al., 2010; Fernández et al., 2015). Por otro lado, aunque el incremento de temperatura no afectó la duración en días de las dinámicas, la duración expresada en tiempo térmico ($\sum [\text{temperatura media diaria} - T_b]$; $T_b = 15^\circ\text{C}$, Pérez-López et al., 2008) fue 300-450 °C día^{-1} mayor, en cv Arbequina T+ y 270-300 °C día^{-1} mayor en cv Coratina T+, en comparación con sus controles T0.

El trabajo aquí presentado es el primer experimento manipulativo de la temperatura sobre árboles enteros y a campo diseñado para evaluar la respuesta de la dinámica de crecimiento del fruto y de su acumulación de aceite ante incrementos en la

temperatura. Los resultados indican que además del fuerte componente genético en la determinación del peso final del fruto (Rosati et al., 2009) la temperatura juega un gran papel regulatorio sobre la dinámica de esta variable al modificar la tasa de llenado. Conocer el impacto de la temperatura sobre la tasa y la duración de la acumulación de peso seco y de aceite tiene implicancias para el modelado de la respuesta a la temperatura y también para el entendimiento de cuáles podrían ser las potenciales vías metabólicas involucradas en esta respuesta. En este sentido, la evaluación del impacto del aumento de la temperatura sobre la fotosíntesis de la hoja (figura 3.1a y b) y sobre la producción total de carbohidratos (cuadros 4.1 y 4.2) indican que la producción de asimilados por árbol no se vio alterada por el calentamiento durante una temporada y sugieren que el rol de la temperatura sobre la tasa de llenado del fruto está asociado a procesos que ocurren en el mismo fruto.

El peso final del mesocarpo se redujo severamente por el calentamiento en ambos cultivares mientras que el peso del endocarpo sólo lo hizo en cv Coratina y en menor proporción (cuadro 5.2). Como consecuencia, la relación mesocarpo/endocarpo (pulpa/carozo) de los frutos calentados se redujo a casi la mitad en cv Arbequina y un poco menos en cv Coratina. Estos resultados contradicen lo observado por García-Inza et al. (2016), que al calentar ramas reproductivas durante el periodo de crecimiento de la semilla o durante la segunda mitad del crecimiento de la pulpa del fruto no encontraron un efecto significativo de la temperatura sobre el peso del mesocarpo ni del endocarpo, en un rango de temperatura media de 20-30 °C, para el primer periodo, y 16-27 °C, en el segundo. La diferencia en la respuesta entre estudios podría estar ligada a la diferente duración de los períodos de tratamiento (90 y 74 días en el primer y segundo periodo, respectivamente, en García-Inza vs 134 y 150 días, en la primera y segunda temporada, respectivamente, en este capítulo) que potencialmente dificultaron la observación de

diferencias en el primer estudio. La disminución del peso seco del mesocarpo pero no (o en menor proporción) del endocarpo ante el incremento de la temperatura en el presente trabajo puede estar asociada al momento en que se aplicaron los tratamientos térmicos y al crecimiento asincrónico de estos tejidos. El endocarpo se desarrolla en los primeros momentos del desarrollo del fruto y una vez que el diámetro longitudinal y transversal alcanzan su tamaño máximo alrededor de 60 DDPF se produce una gran y rápida esclerificación de sus células (fase 2 y 3) (Rapoport et al., 2013) con aumentos mínimos en el peso posteriormente (García-Inza et al., 2016). Por otro lado, el mesocarpo se desarrolla principalmente en la fase 4, luego del EC. En 2015-16 el calentamiento inició 25 y 30 días antes de detectarse el endurecimiento de carozo en cv Arbequina y cv Coratina respectivamente, por lo que gran parte del crecimiento del embrión, la semilla y el endocarpo habían ocurrido, sobre todo en cv Arbequina, mientras que el crecimiento activo del mesocarpo todavía no había ocurrido. Paralelamente, el incremento de la temperatura provocó una disminución de la concentración de aceite del mesocarpo (cuadro 5.2). De manera similar García-Inza et al. (2016), observaron una disminución de 1,6 y 1,8 puntos porcentuales del % de aceite del mesocarpo por cada 1 °C de incremento de la temperatura al calentar ramas y frutos de cv Arauco temprano y más tardíamente, respectivamente, durante su desarrollo.

El contenido de aceite por fruto (en g fruto) se redujo fuertemente en los frutos a mayor temperatura, debido a un efecto directo de la temperatura sobre el % aceite del mesocarpo, a un efecto dilución al modificar la proporción de mesocarpo en relación al endocarpo y al menor peso total del fruto (cuadro 5.2). La reducción del contenido de aceite fue mayor en 2015-16 que en la temporada anterior (50 % vs 30 % en 2014-15), probablemente asociado a una mayor diferencia de temperatura (i.e., 1 °C más). Es importante resaltar que ninguna de las respuestas en los frutos provenientes de árboles

calentados sólo una temporada y bajo las condiciones experimentales descritas estuvo asociadas a posibles efectos de la temperatura sobre la producción de asimilados, como se mencionó más arriba. Sin embargo, en los árboles cv Coratina calentados durante dos temporadas, el contenido de aceite se redujo proporcionalmente más que en el resto de los casos, ya que tanto la concentración del aceite del mesocarpo como el peso final del mesocarpo y endocarpo (y por ende del fruto entero, como se mostró en el capítulo anterior, figura 4.2f) se redujeron severamente por el calentamiento (cuadro 5.2). Esto ocurrió porque además del efecto directo de la temperatura sobre estas dos variables, los resultados del capítulo anterior indicarían que en estos árboles hubo una fuerte limitación por recursos, consecuencia del efecto acumulado de la temperatura (ver discusión de Capítulo IV).

La composición de ácidos grasos saturados e insaturados del aceite de oliva se vio alterada por el incremento de la temperatura bajo nuestras condiciones, pero esta respuesta estuvo condicionada por el cultivar (cuadro 5.3). Así, el primer año (2014-15), mientras que en el cv Arbequina el calentamiento provocó una fuerte disminución del % de ácido oleico y aumento del ácido linoleico, el cv Coratina mantuvo estables los niveles de ambos ácidos grasos. La siguiente temporada, con una mayor diferencia de temperatura lograda entre tratamientos, esta respuesta fue similar (aunque sólo marginalmente significativa) en los frutos provenientes de árboles bajo dos temporadas, mientras que en los frutos de árboles con un solo periodo de tratamiento el ácido oleico se redujo por el calentamiento en ambos cultivares. El % de ácido palmítico (16:0) consistentemente aumentó al incrementar la temperatura 3-4 °C. El ácido esteárico (18:0) y el linolénico (18:3) fueron menos sensibles al incremento de la temperatura con cambios menores en sus niveles (18:0) o sin cambios (18:3). Además, en cv Arbequina, tanto en T+ como en T0, algunos valores de ácido palmítico, oleico y linoleico estuvieron por

fuera de los límites establecidos por el COI para aceite virgen extra (i.e., entre 7,5 y 20 % para el palmítico, entre 55 y 83 % para el oleico y entre 3,5 y 21% para el linoleico), como ocurre normalmente en esta región, señalando la variabilidad de estos compuestos entre zonas térmicamente distintas a España, de donde es originario este cultivar y de donde son representativos los umbrales COI. Estos resultados están en sintonía con lo reportado por Rondanini et al. (2014) a partir de correlaciones con varios cultivares creciendo en distintas localidades en La Rioja y por García-Inza et al. (2014), a partir de un experimento manipulativo calentando ramas reproductivas de cv Arauco, y señalan que en cv Arbequina el perfil de ácidos grasos, sobre todo la concentración de ácido oleico, está muy regulado por la temperatura, mientras que en cv Coratina los valores parecerían ser más estables y siempre dentro de los límites COI.

Mirando en conjunto las respuestas de los principales ácidos grasos, parecería que el incremento de la temperatura afecta su biosíntesis a través de la regulación enzimática, tal como fuera sugerido por García-Inza et al. (2014). Sin embargo, hay muy poco conocimiento acerca de la actividad enzimática o la expresión de genes ligados a la biosíntesis de lípidos en el fruto de olivo fundamentalmente en el mesocarpo, principal tejido de acumulación del aceite. Sumado a esto los mecanismos por los cuales la temperatura modula la composición de ácidos grasos son desconocidos en olivo y parecerían ser distintos a los de oleaginosas anuales donde altas temperaturas se asocian con mayores % de oleico en la semilla. Los ácidos grasos son sintetizados a partir de acetato con la adición de dos carbonos por ciclo por acción de las enzimas ácido graso sintasa (FAS) mientras que la insaturación (introducción de doble enlaces a partir de sustratos saturados) es realizada de manera secuencial por enzimas desaturadas (e.g., SAD y FAD). La estearoil-acil desaturasa (SAD) cataliza la primera desaturación que conduce al ácido oleico, por lo que tiene un papel fundamental sobre el contenido total de ácidos

grasos insaturados. Estudios recientes en olivo, indican que los genes SAD están regulados transcripcionalmente por factores ambientales como bajas temperaturas y oscuridad (Hernández et al., 2019). Además, se encontraron diferencias en los niveles de expresión de genes que codifican para FAD (i.e., desaturasas que catalizan la doble ligadura extra entre ácido oleico y linoleico) en respuesta a factores ambientales, como alta y baja temperatura, en distintos cultivares; sin embargo, no se encontró una asociación entre el nivel de expresión de los genes y el % de ácido linoleico (Hernández et al., 2011). Por otro lado, la aparente mayor estabilidad a la temperatura de cv Coratina en comparación con cv Arbequina podría estar fundamentada por diferencias en los niveles de las enzimas desaturasas, su actividad, los niveles de expresión de los genes que codifican para estas enzimas, o incluso de los sustratos disponibles. Por ejemplo, en un trabajo previo se reportaron diferencias en los niveles de expresión de genes que codifican para FAD entre cultivares, como cvs Arbequina y Picual, y esto se relacionó fuertemente con las diferencias de contenido de ácido linoleico encontradas en esos cultivares (Hernández et al., 2009). Es por ello que resulta fundamental avanzar en los estudios moleculares para poder entender las respuestas observadas en este y otros trabajos previos.

Entre los componentes menores del aceite de oliva, los tocoferoles se destacan por su actividad antioxidante y su importante actividad nutricional (vitamina E). En olivo hay una escasez de conocimientos sobre la evolución de las concentraciones de tocoferoles individuales durante el desarrollo del fruto y un desconocimiento total sobre el rol regulatorio que tiene la temperatura en este aspecto. A partir de algunas correlaciones previas se han asociado condiciones agroecológicas, como lluvia y temperatura, con cambios en su concentración en aceite (mg kg aceite^{-1}) (Aguilera et al., 2005). Además, la respuesta al ambiente parecería ser cultivar dependiente (Beltrán et al., 2010). El

experimento realizado en este capítulo es el primero de tipo manipulativo que indaga sobre estos temas y puede servir como puntapié inicial para futuros trabajos más profundos. La dinámica de concentración de α - y γ -tocoferol en aceite siguió un patrón lineal o bilineal observándose los valores máximos temprano, seguido de fuertes caídas a medida que el aceite se acumula en el fruto hasta alcanzar valores mínimos finales (figura 5.4). La alta concentración encontrada al comienzo de la acumulación puede estar relacionada con una alta división celular previa a la acumulación de aceite en el mesocarpo, ya que estos compuestos son componentes estructurales de las membranas (ver revisiones de Atkinson et al., 2010 y Lopez et al., 2014). A medida que la acumulación activa de aceite en el mesocarpo avanza luego del EC, se van formando pequeños cuerpos lipídicos que confluyen en una sola gota lipídica en una región citoplasmática con notable ausencia de componentes citoplásmicos como membranas y ribosomas (Rangel et al., 1997); esto provoca que los niveles de tocoferoles se diluyan a medida que se acumula el aceite. Patrones similares a los nuestros fueron reportados previamente en los cvs Arauco, Manzanilla y Arbequina (Bodoira et al., 2015; 2016) pero inverso a lo reportado en algunos cultivares tunecinos (Sakouhi et al., 2008) y en el fruto (semilla) de anuales como el girasol (González Belo et al., 2017) y la cebada (Falk et al., 2004).

La concentración final de α -tocoferol en aceite varió entre 298-713 mg kg aceite⁻¹ (cuadro 5.4). Estos valores son similares a los reportados en cv Arbequina creciendo en Córdoba, España (e.g., Pérez et al., 2019) y superiores a los reportados en cv Coratina en la región de Molise, Italia (Manzi et al., 1998) o Córdoba, España (Pérez et al., 2019). Además, la mayor temperatura bajo las condiciones experimentales de este trabajo provocó una respuesta positiva y consistente en la concentración de α -tocoferol en ambas variedades. Esto es una respuesta novedosa y contraria a lo observado en anuales

oleaginosas como el girasol, donde la concentración de tocoferoles disminuyó cuando se incrementó la temperatura temprano durante el llenado de las semillas (Izquierdo et al., 2007). La concentración de γ -tocoferol varió entre 5-53 mg kg aceite⁻¹ y la variabilidad de las repeticiones en 2014-15 impidió ver diferencias claras entre tratamientos en 2014-15. En 2015-16 el calentamiento provocó un incremento en la concentración en cv Arbequina mientras que la respuesta de cv Coratina fue la inversa, indicando una clara interacción genotipo x ambiente (cuadro 5.4). Al expresar la concentración de estos tocoferoles en relación al fruto se evidencia que la temperatura afectó la concentración de tocoferoles principalmente al modificar el peso de aceite por fruto. Sin embargo, en 2015-16 parecería además haber un efecto directo de la temperatura sobre la síntesis de estos compuestos. Esto podría asociarse a una mayor diferencia de temperatura lograda aunque los mecanismos detrás de esta respuesta son poco claros. Este es el primer estudio en olivo donde se reportan este tipo de resultados en relación a los tocoferoles y su respuesta a la temperatura. En oleaginosas anuales como girasol, soja y colza la mayor parte de las variaciones observadas en la concentración en aceite de tocoferoles ante variación en la temperatura o la radicación fueron explicadas por el peso del aceite del grano (Izquierdo et al., 2007; Izquierdo et al, 2011).

5.5 Conclusión

En este capítulo se mostró cómo el incremento de la temperatura entre la fase 3-5 de desarrollo del fruto tiene un efecto directo sobre su tamaño y concentración de aceite al afectar las tasas de incremento de peso seco del mesocarpo y de acumulación de aceite de este tejido. Principalmente por su efecto sobre el contenido de aceite del fruto, los tocoferoles aumentan su concentración en aceite al aumentar la temperatura. En adición, la temperatura afecta el perfil de ácidos grasos aunque el cv Coratina parecería tener un

fenotipo más estable que cv Arbequina. Así, a modo de conclusión este capítulo permitió el estudio del efecto de la temperatura excluyendo otros factores que podrían estar influyendo en la respuesta de los análisis correlativos, permitiendo sugerir que la temperatura es un factor crucial para la determinación del rendimiento y la calidad de aceite. Además, sentó las bases para estudios más profundos en relación a algunos componentes como los ácidos grasos y compuestos menores, como tocoferoles, poco estudiados en olivo, sobre todo en relación a la temperatura.

Discusión general

6.1 Aspectos destacados de los resultados obtenidos y aportes originales de la tesis al conocimiento científico

La temperatura es uno de los principales factores ambientales regulatorios del crecimiento y desarrollo de los cultivos y afecta la mayoría de los procesos involucrados en la determinación del rendimiento. El calentamiento global observado con respecto a la era preindustrial ha despertado el interés por entender las implicancias del incremento de la temperatura media del aire sobre la fisiología y producción de los cultivos. A nivel local el interés por entender cómo la temperatura elevada afecta la producción del olivo radica, además, en la gran variabilidad térmica (± 5 °C) entre regiones productivas del país, consecuencias del gradiente latitudinal y altitudinal en el que se produce el cultivo (Gómez del Campo et al., 2010; Torres et al., 2017). La bibliografía existente a partir de estudios manipulativos de la temperatura es mucho más abundante en cultivos herbáceos que en leñosas perennes, probablemente debido a la complejidad que implica calentar árboles enteros por periodos largos de tiempo (e.g., el periodo de acumulación de aceite del fruto en olivo, evaluado en esta tesis, abarca 4-6 meses).

Al momento de iniciar la tesis, los estudios en olivo manipulando la temperatura en el campo eran muy escasos. Inicialmente calentando porciones de ramas reproductivas García-Inza et al. (2014; 2016) determinaron algunas respuestas productivas del fruto de cv Arauco (peso seco y % de aceite) y de la calidad de su aceite (perfil de ácidos grasos). Luego a nivel de árbol entero, usando cámaras completamente cerradas, se evaluó el desempeño del polen y la duración del periodo efectivo de polinización bajo condiciones de temperatura elevada (Vuletin Selak et al., 2013; 2014). Muy recientemente usando cámaras sin techo (OTCs) (Benlloch-González et al., 2018; 2019) observaron el efecto del aumento de 4 °C en la temperatura del aire sobre la fenología floral, el cuajado, y el crecimiento y desarrollo del fruto. En estos últimos trabajos con cámaras, árboles bajo

condiciones de ambiente exterior (i.e., al aire libre) fueron usados como control. Aunque estos estudios constituyen un valioso aporte al conocimiento sobre algunas respuestas productivas al incremento de la temperatura y convalidan trabajos correlativos previos (e.g., Trentacoste et al., 2012; Rondanini et al., 2014), estudios más integradores son necesarios para un mejor entendimiento de los mecanismos detrás de las respuestas. Así, los resultados presentados en esta tesis, al analizar las respuestas a diferentes niveles de escala (desde hoja a planta entera) de la economía de carbono y de algunos aspectos del uso del agua al incremento de la temperatura, constituye un importante aporte para un entendimiento más integrador de las respuestas productivas del olivo al incremento de la temperatura al mismo tiempo que generan nuevos interrogantes para investigaciones futuras.

A pesar del impacto potencial del calentamiento en la fisiología y producción de los árboles frutales se ha prestado poca atención al diseño y prueba de sistemas de manipulación de temperatura a campo. Es por ello que el punto de partida inicial de esta tesis consistió en diseñar y probar un sistema que permitiera la manipulación térmica en el campo en árboles frutales jóvenes (Objetivo específico 1). Las pruebas no sólo incluyeron mediciones de temperatura, sino también otras variables microclimáticas de importancia fisiológica (e.g., humedad), muchas veces no consideradas en el diseño ni evaluadas en estudios con estructuras que modifican el ambiente. El sistema propuesto (Capítulo II) utiliza cámaras sin techo (OTCs), empleadas comúnmente y con éxito para estudiar plantas por más de dos décadas. Sin embargo, un aspecto novedoso en frutales leñosos es la incorporación de una OTC como tratamiento control, sólo con calentamiento pasivo por el material de polietileno, lo que permite mantener la temperatura cercana (+1 °C) a la del ambiente exterior. El uso de una estructura (i.e., OTC) similar a la del tratamiento calentado evita usar el ambiente exterior como referencia y permite garantizar

que las condiciones microclimáticas a las que están expuestos los árboles sean semejantes entre tratamientos y, de esta forma, tener la seguridad de que sólo la temperatura (y las variables asociadas a ella, como el DPV) está detrás de las respuestas evaluadas en la planta. Por otra parte, la OTC calentada utiliza un método con resistencia eléctrica (caloventor eléctrico) y un diseño de túnel de plástico transparente bastante novedoso con piedras ennegrecidas en el interior, a través de las cuales se fuerza el aire usando ventiladores para calentar la OTC. Si bien previamente se han utilizado métodos de calentamiento similares con resistencia eléctrica (en olivo, Benlloch-González et al., 2018) o túnel plástico (sin piedras) con energía solar como fuente de calor (en arroz, Chiba y Terao, 2014), un aspecto novedoso de este trabajo es el uso de manera complementaria de ambos métodos de calentamiento garantizando un considerable incremento de la temperatura (i.e., ~ 3,5 °C), sostenido a lo largo del día y a un costo (económico y ambiental) y complejidad operativa mucho menores que lo que significaría el uso de sistemas de calentamiento más complejos (e.g., en especies forestales: Barton et al., 2010; en vid: Sadras et al., 2012a) por periodos prolongados de tiempo.

El intercambio gaseoso de la hoja de olivo bajo condiciones de temperatura elevada sostenida y en el campo no ha sido evaluado previamente a esta tesis, a pesar de que el intercambio de carbono (y agua) es la base de los actuales modelos de simulación basados en componentes de economía de carbono (o de uso del agua) para predecir la producción olivícola bajo diferentes escenarios ambientales (e.g., López-Bernal et al., 2018; Lorite et al., 2018). El trabajo presentado en esta tesis constituye así el primero de su tipo donde olivos son calentados durante prolongado tiempo (el verano y parte del otoño, ~ 5 meses) y sus parámetros fotosintéticos como así también la transpiración, evaluados en relación a un control (Objetivo Específico 2). Trabajos previos modificando la temperatura instantánea de medición indican que la fotosíntesis máxima en olivo se

alcanza entre los 32-35 °C y que por encima de ese umbral cae marcadamente (Bongi y Long, 1987; Díaz-Espejo et al., 2006). Algo similar se observó en la fotosíntesis en estudios de olas de calor de corto plazo, acompañado de una disminución de la conductancia estomática (Haworth et al., 2018). Sin embargo, los resultados aquí presentados (Capítulo III) contradicen esto y ponen de manifiesto que la hoja de olivo tiene capacidad de ajuste a la temperatura a la que se encuentra sometida durante su crecimiento, lo que le permite mantener la eficiencia fotosintética y la conductancia estomática a temperaturas de incluso 40 °C (las máximas exploradas durante las mediciones realizadas y acompañadas de condiciones de DPV moderadas, \leq a 4 kPa). En este sentido, esta tesis constituye un estudio pionero en la evaluación de respuestas de aclimatación térmica de la fotosíntesis en olivo y sienta las bases para estudios más profundos sobre los mecanismos detrás de las respuestas, como así también para incluir los procesos de aclimatación térmica dentro de los modelos de simulación actuales usados para predecir la producción del olivar.

La aclimatación térmica de la hoja ya sea por ajustes de tipo fisiológicos, estructurales, bioquímicos o incluso anatómicos (en hojas nuevas) afecta a todos los aspectos del intercambio de la atmósfera foliar. De diversos estudios se desprende que este es un rasgo bastante común en las plantas de distintos grupos funcionales, que les permite hacer frente a su nueva temperatura de crecimiento sin pérdida de eficiencia fisiológica (Berry y Björkman, 1980; Yamori et al., 2013; Vico et al., 2019). Los resultados presentados (Capítulo III) además indican que estos ajustes no sólo afectan la fotosíntesis sino que incrementan el consumo de agua del olivo al aumentar la transpiración, un aspecto de suma relevancia económica y ambiental en la producción olivícola actual y futura.

Por otro lado, en el NOA, con temperaturas más elevadas que en zonas tradicionales de producción olivícola fundamentalmente durante el periodo de acumulación de aceite, se ha observado que los olivos producen más biomasa vegetativa y menor rendimiento de aceite en comparación con zonas mediterráneas de donde provienen la mayoría de los cultivares usados en Argentina. Incluso dentro del país, el comportamiento productivo de los cultivares difiere entre regiones más cálidas en comparación con aquellas más frías. A partir de esto surgió el interrogante de: ¿Cómo la producción y partición de biomasa hacia todos los órganos vegetativos y frutos se ve afectada por el incremento de la temperatura? Es por ello que otro aporte original de la tesis al conocimiento científico fueron los resultados de las evaluaciones de la producción y partición de biomasa hacia los distintos órganos de la planta (i.e., raíces, tronco, ramas, hojas y frutos) en árboles jóvenes expuestos a un incremento de la temperatura de 3-4 °C durante la fase de acumulación de aceite del fruto de una o dos temporadas consecutivas (Objetivo Específico 3), presentados en el Capítulo IV. En dicho capítulo se demostró que el incremento de la temperatura bajo nuestras condiciones meteorológicas, reduce severamente el peso y % de aceite de los frutos (reduciéndose el rendimiento de aceite a pesar de no modificarse la carga por árbol) pero la producción y costo energético de la biomasa total de los árboles se mantiene. Esto último refuerza los resultados de producción de asimilados observados a nivel foliar. Como consecuencia, se produce una mayor partición (i.e., el excedente de fotoasimilados no destinados a los frutos) hacia órganos vegetativos como hojas, de manera similar al conocido efecto de la carga sobre la partición en olivos adultos y jóvenes (Fernández et al., 2015; Rosati et al., 2018). Esto ocurre aún a pesar de que la mayor parte del crecimiento vegetativo acontece previamente a iniciarse el periodo de acumulación de aceite. Sin embargo, en árboles calentados durante dos temporadas, además de los cambios en partición se observa una limitación

por fuente de fotoasimilados y un menor número de frutos inicial, despertando nuevos interrogantes para investigaciones futuras.

Finalmente, esta tesis mostró cuáles son los principales mecanismos afectados tanto a nivel productivo como a nivel de la calidad del aceite de oliva por el incremento de la temperatura en un contexto de calentamiento global. Si bien en olivo se cuenta con abundante información que correlaciona el incremento de la temperatura con disminuciones en el % de aceite y proporción de ácido oleico, la información proveniente de ensayos manipulativos es más escasa, fragmentada y limitada sólo a dos cultivares (i.e., cvs Arauco y Picual). Es por ello que los resultados presentados en el Capítulo V de esta tesis constituyen un importante aporte en este sentido. Por un lado, los resultados arrojaron que el calentamiento durante la fase de acumulación de aceite afecta negativamente las tasas (en días) de incremento de peso seco y de acumulación de aceite (%). Este es el primer trabajo manipulativo en olivo donde se estudia el papel regulatorio de la temperatura sobre la dinámica de crecimiento y de acumulación de aceite del fruto. Además de este efecto directo de la temperatura sobre la síntesis de aceite, se comprobó que el calentamiento en ese momento del desarrollo del fruto afecta más fuertemente el crecimiento de la pulpa, donde se sintetiza la mayor parte de aceite, que del endocarpo + semilla (i.e., menor relación pulpa/carozo) acentuando el efecto negativo del calentamiento sobre el contenido de aceite por fruto.

Desde el lado de la calidad del aceite, esta tesis refuerza los trabajos correlativos y manipulativos calentando ramas reproductivas previos que mostraban cómo el perfil de ácidos grasos está regulado por la temperatura (e.g. Rondanini et al., 2014; García- Inza et al., 2014; 2016), de manera tal que la proporción de ácido oleico disminuye al incrementar la temperatura durante el periodo de acumulación de aceite, y que esto podría estar regulado a nivel enzimático. Sin embargo, un aspecto novedoso de esta tesis, fue el

estudio de manera manipulativa de la interacción genotipo (cultivares) x ambiente en esta respuesta. Así, se demostró como en cv Arbequina el perfil de ácidos grasos está muy regulado por la temperatura, mientras que en cv Coratina sólo el año que se logró mayor diferencia entre tratamientos térmicos el ácido oleico cayó por el calentamiento. De hecho, los valores reportados en cv Arbequina en esta tesis, tanto en T0 como en T+, quedaron por debajo del límite inferior COI (i.e., 55 %), establecido en función de los valores esperados para un aceite extra virgen en la Cuenca del Mediterráneo. A su vez, los valores reportados fueron similares a aquellos provenientes de trabajos correlativos previos en esta zonas del NOA con mayor temperatura que en el Mediterráneo (e.g., Rondanini et al., 2014) poniendo en evidencia los desajustes de esta normativa para los aceites provenientes de zonas olivícolas más cálidas que el Mediterráneo, como el NOA, y la necesidad de replantear estos límites, sobre todo en este contexto de calentamiento global y expansión olivícola. A diferencia del ácido oleico, la concentración en aceite de α -tocoferol, el principal tocoferol en el aceite de oliva, aumentó al incrementar la temperatura principalmente por un efecto “concentración” al disminuir el aceite sintetizado en el fruto. En este sentido, esta tesis fue la primera en explorar este tipo de respuesta en este componente menor del aceite de oliva, con importantes propiedades biológicas como antioxidante (vitamina E).

6.2 Implicancias de los resultados obtenidos para el sector productivo en la región en el contexto del calentamiento global

El olivo en Argentina es la segunda especie frutal más implantada después de la vid. Con alrededor de 90 mil ha en producción es clave en la economía regional de las provincias de La Rioja, San Juan, Catamarca y Mendoza (Instituto de Desarrollo Rural, 2012), donde además se encuentra fuertemente ligado a la cultura e historia de la zona.

En la actualidad los objetivos productivos del sector se enfocan principalmente en lograr aceites de calidad para la exportación y, en menor medida, en la producción de aceitunas de mesa de calidad. Como consecuencia, uno de los principales cultivos implantados en la región es el cultivar aceitero Arbequina, originario de España.

A pesar de que la expansión olivícola en el país ha sido exitosa en muchos casos, hay también indicios de que las altas temperaturas en el NOA actualmente afectan negativamente la producción. Sumado a esto, bajo el escenario del calentamiento global, los actuales sistemas productivos olivícolas del noroeste del país podrían verse severamente afectados. En este sentido, esta tesis demostró de manera manipulativa cómo el calentamiento global afectará negativamente la producción y calidad del aceite de oliva y sugiere, al mismo tiempo, que la mayor temperatura provocará un aumento de la demanda de agua del cultivo por una mayor demanda atmosférica (DPV) y mayor desarrollo de área foliar, debido a una mayor partición de asimilados hacia órganos vegetativos. En términos económicos esto se traducirá probablemente en menores ingresos, por el menor rendimiento y calidad del aceite, y mayores gastos en, por lo menos, riego (el agua se bombea desde grandes profundidades del suelo), labor de poda, que en muchos casos todavía se realiza manualmente, y acarreo de estos restos de poda. Como consecuencia los márgenes económicos del sector productivo se verán reducidos, afectando principalmente al mediano y pequeño productor aceitero, que normalmente tienen un margen económico acotado.

6.3 Validación de las hipótesis de la tesis

A partir de los resultados presentados en los diferentes capítulos que componen el cuerpo de la tesis, resumidos en la figura 6.1, se pudieron poner a prueba las hipótesis enunciadas en el capítulo introductorio (Capítulo I).

En relación al **Objetivo Específico 1**, se presumió que: *El uso de energía solar y/o resistencia eléctrica permite aumentar la temperatura del aire dentro de OTCs lo suficiente como para simular escenarios de calentamiento global futuros (H1OE1); y, por otro lado, que: El aumento de la temperatura usando aire calentado con energía solar y/o resistencia eléctrica dentro de cámaras suficientemente ventiladas no modifica el contenido de humedad del aire, la concentración de CO₂ ni la radiación incidente, pero provoca un incremento de la demanda atmosférica de vapor de agua (H2OE1)*. Los resultados presentados en el Capítulo II, indican que el uso de los dos métodos de calentamiento complementarios sugeridos (i.e., túnel de plástico transparente con piedras ennegrecidas en su interior + calientador eléctrico) permite un sostenido incremento de la temperatura a lo largo del día, con respecto a una OTC control sin calentamiento activo (figura 2.3) y esta diferencia de temperatura diaria es, en promedio, cercana a 4 °C, tanto en verano como otoño (cuadro 2.1; figura 2.4). Por otro lado, la humedad absoluta fue similar entre ellas y con el ambiente exterior (valores sobre la línea 1:1; figura 2.5). Además, la [CO₂] en el horario que más activa está la fotosíntesis (de 9:00 a 15:00 h, hora solar) también fue similar entre configuraciones de OTCs (figura 2.7). Finalmente, la radiación incidente dentro de cada cámara fue similar entre configuraciones y en promedio solo un 12 % inferior a la PAR incidente en el exterior el primer año, mientras que hubo una pequeña pérdida el segundo año, debido al desgaste del polietileno usado en los laterales. **Estos resultados estuvieron en concordancia con las predicciones realizadas y por consiguiente las dos hipótesis planteadas en relación al OE1 se aceptan en su totalidad.**

Para el **Objetivo específico 2** se postuló que: *El intercambio neto de carbono del olivo durante el verano se ve limitado al superar los 35 °C de temperatura del aire como consecuencia de una menor conductancia estomática en respuesta al incremento del DPV*

y/o la temperatura. Por el contrario, olivos a mayor temperatura y bien regados tienen mayor transpiración, mediado por un mayor DPV (**H1OE2**). Además, La temperatura a la cual se alcanza la mayor tasa fotosintética máxima a saturación lumínica en hojas de olivo depende de las temperaturas experimentadas durante su desarrollo (aclimatación térmica de la hoja). Esto se sustenta en la bibliografía existente donde se señala que numerosas especies leñosas evidencian algún tipo de capacidad de aclimatación térmica de la fotosíntesis que les permite mantener su eficiencia fotosintética a temperatura elevada (Berry y Björkman, 1980; Yamori et al., 2013; Vico et al., 2019) (**H2OE2**). Los resultados presentados en el Capítulo III mostraron que a diferencia de lo que se predecía, A_{max} y g_s no evidenciaron una reducción significativa al superar los 35 °C durante las mediciones (figura 3.1a; cuadro 3.2). Además, fortaleciendo los resultados de A_{max} , F_v/F_m tanto en hojas de olivos T+ como T0 fue ~0,8 en verano, valor esperable en condiciones no estresantes, mientras que Φ_{PSII} y la ETR de las hojas adaptadas a la luz tampoco cambiaron al aumentar la temperatura (cuadro 3.3). Sin embargo, la E durante tales mediciones fue mayor en T+ que en T0 (figura 3.1b). Una tendencia similar a la transpiración foliar entre tratamientos (aunque no significativa) se observó en el flujo de savia diario de cv Arbequina durante periodos de 3 días consecutivos en verano (cuadro 3.4). Por otro lado, al medir el intercambio gaseoso de la hoja a la temperatura actual (i.e., real del momento) de T0 y T+ en verano (i.e., 35 y 39 °C respectivamente) y luego cruzando las temperaturas de medición (i.e., midiendo T+ a la temperatura de T0 y viceversa) se produjo una caída de A_{max} cuando cada tratamiento no fue evaluado a su temperatura (cuadro 3.5), indicando una clara aclimatación de A_{max} a la temperatura experimentada por la hoja. **Estos resultados están parcialmente en acuerdo con las predicciones realizadas a partir de la H1OE2, por lo que se la acepta parcialmente,**

mientras que están completamente en concordancia con lo predicho para la H2OE2, por lo que esta última se acepta en su totalidad.

La tercera hipótesis plateaba que: *A una misma temperatura del aire, cv Coratina presenta una mayor resistencia física de la hoja al intercambio gaseoso que cv Arbequina por una mayor presencia de tricomas en su cara abaxial; y que, por otro lado: Las hojas desarrolladas a mayor temperatura y bajo condiciones de buena disponibilidad hídrica presentan menor número de tricomas que las desarrolladas a menor temperatura independientemente del cultivar, lo que facilita la pérdida de agua por transpiración (H3OE2).* Los resultados del experimento realizado arrojaron que, tal como se esperaba y de manera consistente, la densidad de tricomas ($\# \text{ mm}^{-2}$) fue mayor en cv Coratina que en cv Arbequina, pero entre tratamientos térmicos sólo las hojas en una (la primera) de las dos temporadas evaluadas mostraron menor densidad de tricomas en T+ (a mayor temperatura) en comparación con T0 (figura 3.4c y d). Por otro lado, E fue mayor en cv Coratina que en cv Arbequina sólo en las mediciones de segunda temporada (figura 3.1c y d) y esto estuvo acompañado, además, por una mayor densidad de estomas; entre tratamientos, E fue mayor en T+ con respecto a T0 (figura 3.4 a y b). Como los resultados presentados no son concluyentes por las diferencias encontradas entre temporadas, la mayor E en cv Coratina con respecto a cv Arbequina o en T+ con respecto a T0 no puede atribuirse (solamente) a una diferencia en la cantidad de tricomas. Posiblemente otras modificaciones morfo-anatómicas que facilitan la pérdida de agua a nivel foliar, ocurriendo en la superficie de hoja (e.g., mayor tamaño de estomas, cuadro 3.6) u otras partes del árbol involucradas en el transporte de agua hacia ellas, como en el xilema, podrían estar involucradas también. Estas modificaciones son irreversibles una vez desarrollado el tejido, lo que se deduce a partir de que E es mayor en T+ que en T0 independientemente de las condiciones de temperatura a la que se evalúen las hojas (i.e.,

a 35 o 39 °C; cuadro 3.5). Sin embargo, son necesarios estudios más profundos y concluyentes para poder afirmar esto. **Por no poder atribuir los cambios en el intercambio gaseoso foliar (i.e., transpiración) sólo a una diferencia en la densidad de tricomas como se esperaba, la evidencia lleva a rechazar la H3OE2 y señala la importancia de estudios anato-morfológicos a nivel hoja y otros órganos más profundos.**

En cuanto al **Objetivo Específico 3** la primera hipótesis puesta a prueba infería que: *El incremento de la temperatura durante la fase de acumulación de aceite (verano-principios de otoño) disminuye el peso seco y la concentración de aceite en el fruto, siendo destinados menos recursos a los frutos y más a los órganos vegetativos incluidos los brotes en desarrollo (H1OE3)*. Los resultados presentados en el Capítulo IV mostraron que, tal como se esperaba, en los árboles bajo tratamiento una temporada el incremento de 3-4 °C durante la acumulación de aceite redujo el peso seco del fruto en un 20 (en 2014-15) – 30 % (en 2015-16) en ambos cultivares, a pesar de que la carga de frutos fue similar al control T0 (figura 4.2a, b, d y e). Paralelamente, el % de aceite final del fruto cayó entre 6 (2014-15) – 12 (2015-16) puntos porcentuales en cv Arbequina y la mitad en cv Coratina (figura 4.2g y h). Las mayores caídas en la segunda temporada evaluada probablemente estén asociadas a la mayor diferencia de temperatura lograda entre tratamientos con respecto a la temporada anterior (i.e., +1 °C) y al mayor número de frutos por árbol en comparación con la primera temporada, por tratarse de árboles de mayor edad. Como consecuencia, el rendimiento de aceite se redujo severamente en T+, aunque esto fue estadísticamente significativo sólo en una de las dos temporadas evaluadas (i.e., la segunda, con 50 y 40 % menos aceite en cv Arbequina T+ y cv Coratina T+, respectivamente) (figura 4.3a y b). En la primera temporada donde los pequeños árboles tenían un bajo número de frutos, si bien cv Arbequina T+ produjo 40 % menos

aceite que T0, en cv Coratina T+ la producción fue sólo 7 % menor ya que la carga de frutos levemente superior que en T0 (aunque no significativa; figura 4.2a) compensó la caída en el peso y % de aceite de los frutos de T+ (i.e., los tres componentes del rendimiento de aceite). La producción de biomasa total (expresada como g de PS o en sus EG) fue similar entre tratamientos de manera consistente en ambas temporadas, acompañado de una reducción del 30 % de la biomasa de frutos en la segunda temporada (cuadros 4.1 y 4.2). Como consecuencia, la relación EG vegetativos/reproductivos aumentó en relación a T0, señalando una mayor partición relativa de glucosa (i.e., 60 % más, con excepción de cv Coratina la primera temporada) hacia órganos vegetativos (cuadro 4.2). Asociado a esto, el calentamiento produjo un consistente incremento entre 30-50 % del área foliar en T+ en comparación con T0 (figura 4.1a y b), lo que no se tradujo en un incremento significativo de la biomasa porque las hojas producidas tenían menor masa foliar específica que las de T0. **A partir de estos resultados en concordancia con las predicciones realizadas en relación a esta temática, se acepta la H1OE3** ya que los cambios hallados en las características del fruto no estuvieron asociados a una diferencia en su número (carga) por árbol ni tampoco a una menor disponibilidad de glucosa/fruto debidas al calentamiento, sino a un efecto directo de la temperatura sobre procesos que ocurren en el fruto, permitiendo un crecimiento vegetativo adicional a partir de los fotoasimilados no destinados al crecimiento reproductivo, modificando el balance entre el crecimiento vegetativo y reproductivo.

La segunda hipótesis planteada del OE2 sostenía que: *El incremento de temperatura en más de una temporada tiene un efecto acumulado sobre los árboles de olivo, acentuado por el crecimiento exponencial entre temporadas típico en árboles jóvenes (H2OE3)*. A partir de los resultados presentados en el capítulo (IV) se puede concluir que el efecto calentamiento fue más acentuado en 2015-16 debido al mayor

crecimiento (i.e., árboles de 3 años) en comparación con los árboles de la temporada anterior (i.e., árboles de 2 años) sólo en los árboles calentados una temporada (cuadros 4.1 y 4.2). En los árboles calentados durante dos temporadas, inesperadamente se produjo una marcada reducción del número de frutos a cuaje, que en el caso de cv Coratina ocurrió también en T0 en comparación con sus coetáneos con sólo un periodo de calentamiento (figura 4.2b y c). Sumado a esto, el peso seco y el % de aceite del fruto se redujeron por el calentamiento (figura 4.2f e i) en comparación con T0, lo que en conjunto provocó una severa reducción de la biomasa de frutos (en EG) y del rendimiento de aceite (cuadro 4.2; figura 4.3c). En el caso de la caída del % aceite del fruto, esta fue proporcionalmente mayor que en sus coetáneos calentados sólo una temporada, señalando otras causas adicionales al efecto directo de la temperatura sobre la síntesis de aceite, como por ejemplo una limitación por fuente de asimilados en estos árboles en T+. A diferencia de lo observado en los árboles bajo un periodo de calentamiento, el incremento de biomasa total se redujo en T+ en comparación con T0 (cuadros 4.1 y 4.3). Mientras que en cv Arbequina esto se debió a una marcada caída en la biomasa de frutos sin diferencias en la producción de biomasa vegetativa, en cv Coratina se debió a una reducción conjunta de los EG de la biomasa vegetativa y reproductiva (aunque en ninguno de los casos significativa), evidenciando una clara limitación por fuente en estos árboles. En cv Coratina T+, además, el incremento de biomasa seca de hojas representó sólo el 5 % de T0, y no se observó incremento del área foliar (cuadro 4.1; figura 4.1). Como consecuencia de todo lo anterior, la proporción de EG biomasa vegetativa/reproductiva aumentó significativamente, pero esto estuvo mayormente explicado por el efecto del calentamiento sobre la carga de frutos. **La evidencia presentada con estos resultados es contraria a las predicciones realizadas a partir de la H2OE3, por lo que se la rechaza.**

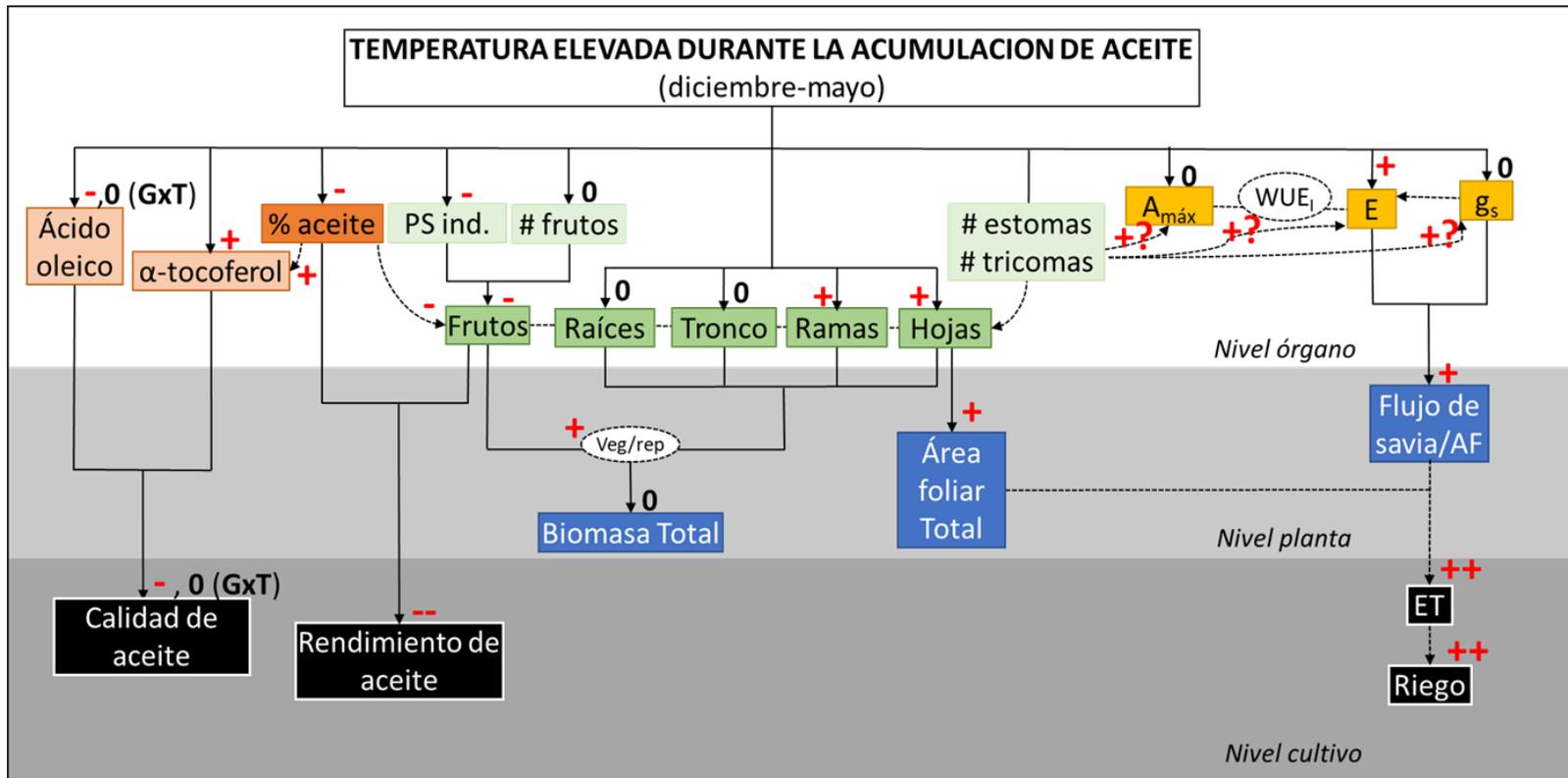


Figura 6.1 Diagrama conceptual describiendo las principales variables de interés evaluadas en la tesis a diferente nivel de organización (órgano, planta y cultivo) y su respuesta al incremento de la temperatura desde ocurrido el cuaje y hasta el final de la síntesis de acumulación de aceite. En rojo se indican las respuestas directas e indirectas. Con signo negativo (-) se indica una respuesta de disminución (o efecto negativo) mientras que + indica incremento. El cero indica que no hay respuesta. GxT señala interacción genotipo (cultivar) x temperatura. El signo ? acompañado de signo + o - señala posibles efectos (de incremento o disminución, respectivamente) no concluyentes a partir de los resultados de esta tesis.

Finalmente, para el **Objetivo Específico 4** se puso a prueba que: *El calentamiento disminuye la tasa de crecimiento del fruto y esto genera frutos de menor tamaño. Además, debido al crecimiento asincrónico entre la pulpa (mesocarpo) y el carozo (endocarpo + semilla), el incremento de la temperatura alrededor de acumulación de aceite disminuye más el crecimiento de la pulpa que del carozo, lo que ocurre más tempranamente (H1OE4)*. En relación a esto, los resultados presentados en el Capítulo V indican que bajo nuestras condiciones ambientales, con una temperatura media durante la fase de acumulación de aceite (~5 meses) de 22 °C en T0 (figura 5.1), el incremento de 3-4 °C provocó una reducción de la tasa de incremento de peso seco del fruto (mg día^{-1}) manteniéndose invariable la duración del periodo de crecimiento (i.e., día en que se alcanza el máximo peso seco del fruto) (figura 5.2; cuadro 5.1). Además, como era esperado, con los tratamiento térmicos aplicados avanzado el endurecimiento de carozo, el peso seco del mesocarpo se redujo proporcionalmente más que el del endocarpo en respuesta al incremento de la temperatura, reflejado en una menor relación pulpa/carozo, tanto en árboles calentados una como dos temporadas (cuadro 5.2). **Al estar estos resultados en plena concordancia con las predicciones se acepta H1OE4 en su totalidad.**

La segunda hipótesis del OE4 puesta a prueba fue que: *La respuesta del perfil de ácidos grasos al incremento de la temperatura en olivo es cultivar dependiente, siendo en cv Arbequina la proporción de los principales ácidos grasos, como el ácido oleico, muy dependiente de la temperatura mientras que en cv Coratina el perfil es más estable. Esto se sustenta en estudios correlativos previos que sugieren que algunos cultivares como cv Arbequina varían su perfil de ácidos grasos más sensiblemente que otros como cv Coratina al aumentar la temperatura media durante la síntesis y acumulación de aceite (Rondanini et al., 2014) (H2OE4)*. Los resultados en relación a la respuesta del

perfil de ácidos grasos al incremento de la temperatura, presentados en el Capítulo V, indican que el incremento de 3 °C durante toda la fase de acumulación de aceite (en la primera temporada evaluada) provocó una reducción de más de 5 puntos porcentuales en el nivel de oleico en cv Arbequina T+ con respecto a su control T0, mientras que en cv Coratina no se observaron diferencias entre tratamientos (cuadro 5.3). Sin embargo, al incrementar 4 °C (en la segunda temporada) la caída de ácido oleico se observó en ambos cultivares (cuadro 5.3). La evidencia presentada indica que el % de ácido oleico en cv Arbequina está muy regulado por la temperatura experimentada por el fruto durante su síntesis, mientras que el cv Coratina es algo más estable térmicamente. De hecho, en nuestro experimento cv Arbequina, tanto en árboles calentados (T+) como aquellos creciendo en condiciones similares al ambiente (T0), los % de ácido oleico quedaron por fuera del límite COI en ambas temporadas, enfatizando la sensibilidad del perfil de ácidos grasos a la temperatura en este cultivar. Que los niveles de ácidos grasos de algunos cultivares como cv Arbequina queden por fuera de los límites del COI es una situación bastante común en algunas zonas de NOA (Rondanini et al., 2014). Por el contrario, el porcentaje de ácido oleico en cv Coratina, en ambos tratamientos y temporadas, se mantuvo dentro de los límites del COI, similar a lo reportado en otros trabajos para esta zona (Rondanini et al., 2014). **Por estar estos resultados en concordancia con las predicciones enunciadas se acepta la H2OE4 en su totalidad.**

Por último se postuló que: *Los tocoferoles tienen su concentración máxima en los primeros estadios de desarrollo del fruto cuando se produce una activa división celular, ya que se encuentran asociados a las membranas celulares y a medida que el aceite se acumula en el fruto la concentración disminuye por un efecto de dilución. Así, al reducirse la concentración de aceite del fruto por el calentamiento durante el periodo de acumulación de aceite, la concentración de tocoferoles en aceite aumenta por un efecto*

de “concentración” (efecto indirecto) (H3OE4). Al evaluar la dinámica del % en aceite de α -tocoferol (~90 % del total de tocoferoles del aceite de oliva), los resultados (Capítulo V) exponen que a medida que avanza el desarrollo del fruto durante la fase de acumulación de aceite (i.e., aumenta el % de aceite en el fruto), el % de tocoferoles en aceite cae por “efecto dilución”, tanto en frutos de árboles T0 como de T+ (figura 5.4). Al evaluar la concentración de α -tocoferol en aceite (mg kg aceite^{-1}), se observa una diferencia significativa en favor de T+ ya que el contenido final de aceite del fruto es menor que en T0 como consecuencia de la mayor temperatura (i.e., “efecto concentración”) (cuadros 5.2 y 5.4). Sin embargo al expresarlo en concentración en el fruto (i.e., $\text{mg kg PS fruto}^{-1}$) se observa que si bien las diferencias entre tratamientos disminuyen, siguen siendo significativas, revelando un efecto directo de la temperatura sobre la síntesis de tocoferol, al menos cuando el incremento fue de 4 °C y el tratamiento inició un poco más temprano, pudiendo afectar parte de la división celular (i.e., segunda temporada; cuadro 5.4). **Esto pone en evidencia que, tal como se predijo, el incremento de la temperatura provoca indirectamente un incremento de la concentración de tocoferoles al afectar la síntesis de aceite en el mesocarpo del fruto, pero también puede ocurrir un efecto directo de la temperatura sobre la síntesis de α -tocoferol, lo que lleva a aceptar sólo parcialmente la H3OE4.**

6.4 Implicancias para investigaciones futuras

A pesar de que esta tesis exploró algunas de las incertidumbres y vacíos de conocimiento en relación a las respuestas del olivo al incremento de la temperatura del aire en diferentes escalas (e.g., hoja, árbol entero), numerosos aspectos de interés no han sido totalmente dilucidados y al mismo tiempo surgen nuevos interrogantes a resolver en investigaciones futuras. Algunos de estos aspectos se plantean a continuación.

• **¿A qué se debe la aclimatación térmica de la hoja de olivo? ¿El consumo de agua de la temporada aumenta en olivos aclimatados a mayor temperatura?** En esta tesis se mostró evidencia experimental de que la hoja de olivo bien regada presenta aclimatación térmica, lo que le permite mantener la eficiencia fotosintética a temperatura elevada (e.g., 39 °C). Sin embargo, no se exploraron los posibles mecanismos detrás de esta respuesta ni el tiempo en el que ocurren, particularmente cuando se considera la fluctuación natural de la temperatura en escalas de tiempo múltiples (segundos a días, estaciones y años). Por otro lado, se mostró evidencia de que hojas desarrolladas a mayor temperatura presentan mayor tasa de transpiración independientemente de la temperatura. Sin embargo, esta tesis nos deja los interrogantes sobre cuál/es es/son el/los mecanismo/s que generan esta respuesta, (i.e., mayor conductividad hidráulica, menor potencial agua, mayor apertura estomática a lo largo del día, etc.) y qué implicancias en el consumo de agua tienen a nivel de árbol entero y cultivo. En un escenario de calentamiento global el mayor consumo de agua del olivar por un mayor DPV (debido a la mayor temperatura) se vería exacerbado por estas modificaciones a nivel foliar para favorecer la pérdida de agua, implicando un elevado costo ambiental y económico. En adición, la temperatura foliar es un aspecto que no se evaluó en esta tesis, por lo que no puede descartarse que las modificaciones anatómicas observadas en las hojas desarrolladas a mayor temperatura (e.g., mayor densidad de tricomas, menor densidad de tricomas, estomas más grandes) favorezcan la pérdida de agua y la refrigeración de la hoja, permitiéndole mantenerse a una temperatura más baja que la del ambiente. Estudios futuros que aborden estas temáticas serán cruciales para poder predecir el comportamiento del olivo en un escenario de calentamiento global.

- **¿El incremento de la temperatura durante el verano y principio de otoño previos afecta la intensidad de la floración de retorno y/o el cuaje de frutos?** Los resultados de esta tesis señalaron que el calentamiento durante el verano y principios de otoño de una temporada parecería afectar el número de frutos de la siguiente temporada, reduciendo la carga de los árboles a mayor temperatura, uno de los determinantes del rendimiento. Esto no puede atribuirse a un fenómeno de alternancia de producción (i.e., vecería), comúnmente observado en olivos adultos en esta zona, ya que los olivos usados para las evaluaciones desarrolladas en esta tesis eran jóvenes y todavía no se encontraban en plena producción. Esta reducción en el número de frutos podría atribuirse a una menor intensidad de la floración o un menor número de frutos cuajados como consecuencia de una incompleta acumulación de horas de frío provocadas por el calentamiento tardío (i.e., verano tardío-principios de otoño). Adicionalmente, la intensidad de la respuesta varió entre los dos cultivares analizados posiblemente debido a diferentes requerimientos de frío invernal entre los cultivares, pero esto es sólo una hipótesis. Entender cómo el calentamiento a finales de verano- principios de otoño puede afectar el número de frutos puede contribuir a un mayor entendimiento de la floración del olivo en general, para entender por qué algunos cultivares europeos no florecen o lo hacen en menor intensidad en nuestra zona y para la toma de decisiones productivas a la hora de elegir nuevas zonas productivas (no tradicionales) y/o cultivares a implantar en un contexto actual o futuro de calentamiento global.

- **¿Por qué las respuestas observadas en los árboles bajo dos temporadas de calentamiento difieren de las observadas en árboles bajo sólo una temporada?** En los árboles calentados durante dos temporadas parecería que otros mecanismos fueron afectados por la temperatura, provocando una reducción de la biomasa total producida.

Estos mecanismos estuvieron posiblemente vinculados a la producción y/o transporte de asimilados y podrían ser, por ejemplo: brotación de yemas limitada por falta de frío, fallas hidráulicas, caída prematura de hojas, etc. Su estudio en relación al incremento de la temperatura podría ayudar a entender los resultados observados en esta tesis y al mismo tiempo ayudar a comprender los efectos del calentamiento sobre el olivo en una escala de tiempo más a largo plazo (i.e., varias temporadas) brindando información sobre sus posibles efectos negativos sobre la vida productiva del cultivo (i.e., vida útil).

- **¿Cómo afecta el incremento de la temperatura la síntesis de ácidos grasos a escala molecular?** Los resultados presentados en esta tesis como aquellos provenientes de estudios correlativos o manipulativos previos señalan de manera consistente la relación entre las variaciones del perfil de ácidos grasos y la temperatura. Además, estas respuestas en el perfil de ácidos grasos parecerían ser cultivar dependientes, como se deduce de las diferencias entre cvs Arbequina y Coratina presentadas en esta tesis. Como se ha señalado previamente en todos estos estudios, los cambios producidos por la temperatura podrían estar relacionados a cambios a nivel de las enzimas que participan en la ruta metabólica de síntesis de estos ácidos grasos, como la oleato desaturasa. Sin embargo la información molecular al respecto es muy limitada en olivo (y oleaginosas que acumulan aceite en el mesocarpo en general), e incluso no se corresponde con lo observado en estudios a escala ecofisiológica, como lo presentado en esta tesis (e.g., Hernández et al., 2011). Por tal motivo, estudios sobre las enzimas involucradas en la síntesis o los genes que codifican para ellas en relación al incremento de la temperatura durante el crecimiento del fruto que combinen las dos escalas permitirán integrar y entender los mecanismos que generaron las respuestas informadas en esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, W. W., Demmig-Adams, B., 2004. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. Pp. 583–604 en Papageorgiou GC, Govindjee (eds), Chlorophyll a fluorescence. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Aguilera, M. P., Beltrán, G., Ortega, D., Fernández, A., Jiménez, A., Uceda, M., 2005. Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chem.*, 89: 387–391.
- Albarracín, V., Hall, A. J., Searles, P. S., Rousseaux, M. C., 2017. Responses of vegetative growth and fruit yield to winter and summer mechanical pruning in olive trees. *Sci. Hortic.*, 225: 185–194.
- Allen, L. H., Vu, J. C. V., 2009. Carbon dioxide and high temperature effects on growth of young orange trees in a humid, subtropical environment. *Agric. For. Meteorol.*, 149: 820–830
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop evapotranspiration-Guidelines for computing crop water requirements. FAO Irrigation and drainage paper 56. FAO- Rome.
- Angelopoulos, K., Dichio, B., Xiloyannis, C., 1996. Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *J. Exp. Bot.*, 47: 1093–1100.
- Aphalo, P. J., Jarvis, P. G., 1991. Do stomata respond to relative humidity?. *Plant. Cell Environ.*, 14: 127-132.
- Asseng, S., Cao, W., Zhang, W., Ludwig, F., 2009. Crop physiology, modelling and climate change: impact and adaptation strategies. Pp. 511–545, en Asseng S., Cao W., Sadras V. O., Calderini D. F. (Eds.), *Crop Physiology*, Academic Press, Amsterdam.
- Atkinson, J., Harroun, T., Wassall, S.R., Stillwell, W., Katsaras, J., 2010. The location and behavior of α -tocopherol in membranes. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54: 641–651.
- Aybar, V. E., De Melo-Abreu, J. P., Searles, P. S., Matias, A. C., Del Río, C., Caballero, J.M., Rousseaux, M.C., 2015. Evaluation of olive flowering at low latitude sites in Argentina using a chilling requirement model. *Span. J. Agric. Res.*, 13: 1-10.
- Bacelar, E. A., Correia, C. M., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Lopes, J.I., Torres-Pereira, J. M. G., 2004. Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree Physiol.*, 24: 233–239.
- Bacelar, E. A., Santos, D. L., Moutinho-Pereira, J. M., Gonçalves, B. C., Ferreira, H.F., Correia, C. M., 2006. Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Sci.* 170:596–605.
- Barton, C. V. M., Ellsworth, D. S., Medlyn, B. E., Duursma, R. A., Tissue, D. T., Adams, M. A.,... Linder, S., 2010. Whole-tree chambers for elevated atmospheric CO₂ experimentation and tree scale flux measurements in south-eastern Australia : The Hawkesbury Forest Experiment. *Agric. For. Meteorol.*, 150: 941–951.

- Beltrán, G., Jiménez, A., del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L., Uceda, M., Aguilera, M.P., 2010. Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *J. Food Compos. Anal.*, 23: 33–639.
- Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Boukhris, M., 2007. Effects of water deficit on olive trees cv. Chemlali under field conditions in arid region in Tunisia. *Sci. Hortic.*, 113: 267–277.
- Benlloch-González, M., Quintero, J. M., Suárez, M. P., Sánchez-Lucas, R., Fernández-Escobar, R., Benlloch, M., 2016. Effect of moderate high temperature on the vegetative growth and potassium allocation in olive plants. *J. Plant Physiol.*, 207: 22–29.
- Benlloch-González, M., Sánchez-Lucas, R., Aymen, M., Benlloch, M., Fernández-Escobar, R., 2019. Global warming effects on yield and fruit maturation of olive trees growing under field conditions. *Sci. Hortic.*, 249: 162–167.
- Benlloch-González, M., Sánchez-Lucas, R., Benlloch, M., Fernández-Escobar, R., 2018. An approach to global warming effects on flowering and fruit set of olive trees growing under field conditions. *Sci. Hortic.*, 240: 405–410.
- Berry, J., Björkman, O., 1980. Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 31:491–543.
- Besnard, G., Baradat, P., Chevalier, D., Tagmount, A., Bervillé, A., 2001. Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 48: 165–182.
- Besnard, G., Terral, J.-F., Cornille, A., 2018. On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Ann. Bot.*, 121: 385–403.
- Bitá, C. E., Gerats, T., 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Front. Plant Sci.*, 4: 1–18.
- Bodoira, R., Torres, M., Pierantozzi, P., Aguate, F., Taticchi, A., Servili, M., Maestri, D., 2016. Dynamics of fatty acids, tocopherols and phenolic compounds biogenesis during olive (*Olea europaea* L.) fruit ontogeny. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 93: 1289–1299.
- Bodoira, R., Torres, M., Pierantozzi, P., Taticchi, A., Servili, M., Maestri, D., 2015. Oil biogenesis and antioxidant compounds from “Arauco” olive (*Olea europaea* L.) cultivar during fruit development and ripening. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 117: 377–388.
- Bonada, M., Buesa, I., Moran, M. A., and Sadras, V. O., 2018. Interactive effects of warming and water deficit on Shiraz vine transpiration. *OENO One*, 52: 189–202.
- Bonada, M., Sadras, V. O., 2015. Review: Critical appraisal of methods to investigate the effect of temperature on grapevine berry composition. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 21: 1-7.
- Bongi, G., Long S. P., 1987. Light- dependent damage to photosynthesis in olive leaves during chilling and high temperature stress. *Plant. Cell Environ.*, 10: 241-249.
- Bongi, G., Mencuccini, M., Fontanazza, G., 1987. Photosynthesis of olive leaves: effect of light flux density, leaf age, temperature, peltates, and H₂O vapor pressure deficit on gas exchange. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 112: 143–148.

- Borges, T. H., Pereira, J. A., Cabrera-Vique, C., Lara, L., Oliveira, A. F., Seiquer, I., 2017. Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chem.*, 215: 454–462.
- Bosabalidis, A. M., Kofidis, G., 2002. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Sci.*, 163: 375–379.
- Brown, M. E., Funk, C. C., 2008. Climate: Food security under climate change. *Science*, 319: 508-514.
- Castillo-Llanque, F., Rapoport, H. F., 2011. Relationship between reproductive behavior and new shoot development in 5-year-old branches of olive trees (*Olea europaea* L.). *Trees*, 25: 823–832.
- Ceci, L. N., Carelli, A. A., 2010. Compositional data review of monovarietal Argentinean olive oils. Pp. 71–97 en Tomas, M.B. (Ed.), *Advances in Fats and Oil Research*. Transworld Research Network, Kerala, India.
- Challinor, A. J., Ewert, F., Arnold, S., Simelton, E., Fraser, E., 2009. Crops and climate change: progress, trends, and challenges in simulating impacts and informing adaptation. *J. Exp. Bot.*, 60, 2775–2789.
- Chalmers, D. Mitchel, P. L. van Heek., 1981. Control of Peach Tree Growth and Productivity by Regulated Water Supply, Tree density, and Summer Pruning. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 106: 307-312.
- Cherbiy-Hoffmann, S. U., Searles, P. S., Hall, A. J., Rousseaux, M. C., 2012. Influence of light environment on yield determinants and components in large olive hedgerows following mechanical pruning in the subtropics of the Southern Hemisphere. *Sci. Hortic.*, 137: 36–42.
- Chiba, M., Terao, T., 2014. Open-top chambers with solar-heated air introduction tunnels for the high-temperature treatment of paddy fields. *Plant Prod. Sci.*, 17: 152–165.
- Cicchino, M., Rattalino Edreira, J. I., Otegui, M. E., 2010. Heat stress during late vegetative growth of maize: Effects on phenology and assessment of optimum temperature. *Crop Sci.*, 50: 1432–1436.
- Clark D. B., Clark D. A., Oberbauer S. F., 2010. Annual wood production in a tropical rain forest in NE Costa Rica linked to climatic variation but not to increasing CO₂. *Glob. Chang. Biol.*, 16: 747–759.
- Conde, C., Delrot, S., Gerós, H., 2008. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J. Plant Physiol.*, 165: 1545–1562.
- Connor D. J., 2005. Adaptation of olive (*Olea europaea* L.) to water-limited environments. *Aust. J. Agric. Res.*, 56: 1181.
- Connor, D. J., Fereres, E., 2005. The physiology of adaptation and yield expression in olive. *Hortic. Rev.*, 31:155–229.
- Corelli-Grappadelli, L., Magnanini, E., 1993. A whole-tree system for gas-exchange studies. *HortScience*, 28: 41–45.
- Correa-Tedesco, G., Rousseaux, M.C., Searles, P.S., 2010. Plant growth and yield responses in olive (*Olea Europaea*) to different irrigation levels in an arid region of Argentina. *Agric. Water Manag.*, 97: 1829–37.

- Crous, K. Y., Zaragoza-Castells, J., Löw, M., Ellsworth, D. S., Tissue, D. T., Tjoelker, M. G., ... Atkin, O. K., 2011. Seasonal acclimation of leaf respiration in *Eucalyptus saligna* trees: impacts of elevated atmospheric CO₂ and summer drought. *Glob. Chang. Biol.*, 17: 1560–1576.
- Crous, K. Y., Quentin, A. G., Lin, Y.-S., Medlyn, B. E., Williams, D. G., Barton, C. V. M., Ellsworth, D. S., 2013. Photosynthesis of temperate *Eucalyptus globulus* trees outside their native range has limited adjustment to elevated CO₂ and climate warming. *Glob. Chang. Biol.*, 19: 3790–3807.
- Cunningham S.C., Read J., 2002. Comparison of temperate and tropical rainforest tree species: photosynthetic responses to growth temperature. *Oecologia*, 133:112–119.
- DaMatta, F. M., Grandis, A., Arenque, B. C., Buckeridge, M. S., 2010. Impacts of climate change on crop physiology and food quality. *Food Res. Int.*, 43: 1814–1823.
- Damour, G., Simonneau, T., Cochard, H., Urban, L., 2010. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant. Cell Environ.*, 33: 1419–1438.
- Danby R. K., Hik D. S., 2007. Responses of white spruce (*Picea glauca*) to experimental warming at a subarctic alpine treeline. *Glob. Chang. Biol.*, 13:437–451.
- De Frenne, P., de Schrijver, A., Graae, B. J., Gruwez, R., Tack, W., Vandeloock, F., ... Verheyen, K., 2010. The use of open-top chambers in forests for evaluating warming effects on herbaceous understorey plants. *Ecol. Res.*, 25: 163–171.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar/>.
- Di Rienzo J. A., Casanoves F., Balzarini M. G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C. W. InfoStat versión 2018. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz-Espejo, A., Walcroft, A. S., Fernández, J. E., Hafidi, B., Palomo, M. J., Girón, I. F., 2006. Modeling photosynthesis in olive leaves under drought conditions. *Tree Physiol.*, 26: 1445–1456.
- Drake, B.G., Leadley, P. W., Arp, W. J., Nassiry, D., Curtis, P. S., 1989. An open top chamber for field studies of elevated atmospheric CO₂ concentration on saltmarsh vegetation. *Funct. Ecol.*, 3: 363–371.
- Döll, P., 2002. Impact of climate change and variability on irrigation requirements: a global perspective. *Clim. Change*, 54:269–293.
- Doughty C. E., Goulden M. L., 2008. Are tropical forests near a high temperature threshold? *J. Geophys. Res.*, 113: 1–12.
- Echarte, L., Andrade, F. H., Sadras, V. O., Abbate, P., 2006. Kernel weight and its response to source–sink manipulations during grain filling in Argentinean maize hybrids released in different decades. *Field Crops Res.*, 96: 307–312.
- El Yaacoubi, A., Malagi, G., Oukabli, A., Hafidi, M., Legave, J. M., 2014. Global warming impact on floral phenology of fruit trees species in Mediterranean region. *Sci. Hortic.*, 180: 243–253.
- Elmendorf, S. C., Henry, G. H. R., Hollister, R. D., Fosaa, A. M., Gould, W. A., Hermanutz, L., ...Walker, M. D., 2015. Experiment, monitoring, and gradient

- methods used to infer climate change effects on plant communities yield consistent patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112, 448–452.
- Ennajeh, M., Vadel, A. M., Cochard, H., Khemira, H., 2010. Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 85: 289-294.
- Falk, J., Krahnstöver, A., van der Kooij, T.A.W., Schlensog, M., Krupinska, K., 2004. Tocopherol and tocotrienol accumulation during development of caryopses from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytochemistry*, 65: 2977–2985.
- Fernández, F. J., Ladux, J. L., Hammami, S. B. M., Rapoport, H. F., Searles, P.S., 2018. Fruit, mesocarp, and endocarp responses to crop load and to different estimates of source: sink ratio in olive (cv. Arauco) at final harvest. *Sci. Hortic.*, 234: 49–57.
- Fernández, F. J., Ladux, J. L., Searles, P. S., 2015. Dynamics of shoot and fruit growth following fruit thinning in olive trees: same season and subsequent season responses. *Sc. Horti.*, 192: 320–330.
- Fernández J. E., 2014. Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. *Environ .Exp. Bot.*, 103:158–179.
- Fernández, J. E., Duran, P. J., Palomo, M. J., Díaz-Espejo, A., Chamorro, V., Girón, I.F., 2006. Calibration of sap flow estimated by the compensation heat pulse method in olive, plum and orange trees: relationships with xylem anatomy. *Tree Physiol.*, 26: 719–728.
- Fernández, J. E., Moreno, F., Girón, I. F., Blázquez, O. M., 1997. Stomatal control of water use in olive tree leaves. *Plant Soil*, 190: 179–192.
- Ferreya, R., Sellés, G., Sellés, I., 2001. Riego Deficitario Controlado en Olivos: Efectos del déficit hídrico en distintas etapas fisiológicas. *Boletín INIA* 59:15-20.
- García-Inza, G. P., Castro, D. N., Hall, A. J., Rousseaux, M. C., 2016. Opposite oleic acid responses to temperature in oils from the seed and mesocarp of the olive fruit. *Eur. J. Agron.*, 76:138–147.
- García-Inza, G. P., Castro, D. N., Hall, A. J., Rousseaux M.C., 2014. Responses to temperature of fruit dry weight, oil concentration, and oil fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L. var. ‘Arauco’). *Eur. J. Agron.*, 54:107– 115.
- Gerhart, L.M., Ward, J. K., 2010. Plant responses to low [CO₂] of the past. *New Phytol.*, 188: 674–695.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A.-H., Saari, N., 2012. Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)—A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 3291–3340.
- Giorgi, F., Lionello, P., 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob. Planet. Change*, 63:90–104.
- Gómez del Campo, M., Morales-Sillero, A., Vita Serman, F., Rousseaux, M. C., Searles, P. S., 2010. Olive growing in the arid valleys of Northwest Argentina (provinces of Catamarca, La Rioja and San Juan). *Olivae*, 114: 43-65.
- González Belo, R., Nolasco, S., Mateo, C., Izquierdo, N., 2017. Dynamics of oil and tocopherol accumulation in sunflower grains and its impact on final oil quality. *Eur. J. Agron.*, 89: 124–130.

- Grace, J., 1987. Climatic tolerance and the distribution of plants. *New Phytol.*, 106: 113-130.
- Gray, S. B., Brady, S. M., 2016. Plant developmental responses to climate change. *Dev. Biol.*, 419: 64-77.
- Green, A. G., 1986. Effect of temperature during seed maturation on the oil composition of low-linolenic genotypes of flax. *Crop sci.*, 26: 961-965.
- Greer, D.H., 2018. Photosynthetic light responses of apple (*Malus domestica*) leaves in relation to leaf temperature, CO₂ and leaf nitrogen on trees grown in orchard conditions. *Funct. Plant Biol.*, 45: 1149-1161
- Greer, D. H., Weedon, M. M., 2012. Modelling photosynthetic responses to temperature of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Semillon) leaves on vines grown in a hot climate. *Plant, Cell Environ.*, 35: 1050-1064.
- Greer, D. H., Weston, C., 2010. Heat stress affects flowering, berry growth, sugar accumulation and photosynthesis of *Vitis vinifera* cv. Semillon grapevines grown in a controlled environment. *Funct. Plant Biol.*, 37: 206-214.
- Grossman, Y. L., DeJong, T. M., 1995. Maximum fruit growth potential and seasonal patterns of resource dynamics during peach growth. *Ann. of Bot.*, 75: 553-560.
- Guédon, Y., Legave, J. M., 2008. Analyzing the time-course variation of apple and pear tree dates of flowering stages in the global warming context. *Ecol. Modell.*, 219:189–199.
- Gunderson, C. A., Norby, R. J., Wullschleger, S. D., 2000. Acclimation of photosynthesis and respiration to simulated climatic warming in northern and southern populations of *Acer saccharum*: laboratory and field evidence. *Tree physiol.*, 20: 87-96.
- Gunderson, C. A., O' Hara, K. H., Campion, C. M., Walker, A. V., Edwards, N. T., 2010. Thermal plasticity of photosynthesis: the role of acclimation in forest responses to a warming climate. *Glob. Chang. Biol.*, 16: 2272-2286.
- Gutierrez, A. P., Ponti, L., Cossu, Q. A., 2009. Effects of climate warming on olive and olive fly (*Bactrocera oleae* (Gmelin)) in California and Italy. *Clim. Change*, 95: 195–217.
- Haworth, M., Marino, G., Brunetti, C., Killi, D., De Carlo, A., Centritto, M., 2018. The impact of heat stress and water deficit on the photosynthetic and stomatal physiology of olive (*Olea europaea* L.)—A case study of the 2017 heat wave. *Plants*, 7:76.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., Herrero, M., 2005. The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in Peach. *Plant Biol.*, 7:476–483.
- Heredia-Moreno, A., Guillén-Bejarano, R., Fernández-Bolaños, J., Rivas-Moreno, M., 1987. Olive stones as a source of fermentable sugars. *Biomass*, 14: 143–148.
- Hernandez-Santana, V., Fernandes, R. D. M., Perez-Arcoiza, A., Fernández, J. E., Garcia, J. M., Diaz-Espejo, A., 2018. Relationships between fruit growth and oil accumulation with simulated seasonal dynamics of leaf gas exchange in the olive tree. *Agric. For. Meteorol.*, 256–257:458–469.

- Hernandez-Santana, V., Fernández, J. E., Cuevas, M. V., Perez-Martin, A., Díaz-Espejo, A., 2017. Photosynthetic limitations by water deficit: effect on fruit and olive oil yield, leaf area and trunk diameter and its potential use to control vegetative growth of super-high density olive orchards. *Agric. Water Manag.*, 184:9–18
- Hernandez-Santana, V., Fernández, J. E., Rodriguez-Dominguez, C. M., Romero, R., Díaz-Espejo, A., 2016. The dynamics of radial sap flux density reflects changes in stomatal conductance in response to soil and air water deficit. *Agric. For. Meteorol.*, 218–219: 92–101.
- Hernández, M. L., Padilla, M. N., Mancha, M., Martínez-Rivas, J. M., 2009. Expression analysis identifies FAD2-2 as the olive oleate desaturase gene mainly responsible for the linoleic acid content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 6199–
- Hernández, M.L., Padilla, M. N., Sicardo, M. D., Mancha, M., Martínez-Rivas, J. M., 2011. Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. *Phytochemistry*, 72: 178–187.
- Hernández, M. L., Sicardo, M. D., Alfonso, M., Martínez-Rivas, J. M., 2019. Transcriptional regulation of stearoyl-acyl carrier protein desaturase genes in response to abiotic stresses leads to changes in the unsaturated fatty acids composition of olive mesocarp. *Front. Plant Sci.*, 10: 1–12.
- Instituto de Desarrollo Rural (2012). Censo frutícola nacional 2010. <http://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2012/02/olivo1.pdf>
- IOOC (International Olive Oil Council), 2013. Revising the trade Standard applying to olive oil and olive-pomace oil. Decision No DEC-20/100-V/2013. COIT.15. 3,7. Madrid, España.
- IPCC, 2018. Summary for Policymakers. In: Global warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty [Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H. O., et al., (eds.)]. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland.
- IPCC, 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R. K., Meyer, L. A., (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.
- IPCC, 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, Pachauri, R. K., Reisinger, A. y Equipo principal de redacción ed. IPCC, Ginebra, Suiza.
- Izquierdo, N., Aguirrezábal, L.A.N., Andrade, F., Cantero, M., 2006. Modeling the response of fatty acid composition to temperature in a traditional sunflower hybrid. *Agron. J.*, 98: 451–461.
- Izquierdo, N., Aguirrezábal, L., Andrade, F., Pereyra, V., 2002. Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. *Field Crops Res.*, 77:115-126.

- Izquierdo, N. G., Mascioli, S., Aguirrezábal, L. A. N., Nolasco, S. M., 2007. Temperature influence during seed filling on tocopherol concentration in a traditional sunflower hybrid. *Grasas y Aceites*, 58: 170-178.
- Izquierdo, N.G., Nolasco, S., Mateo, C., Santos, D., Aguirrezbal, L. A. N., 2011. Relationship between oil tocopherol concentration and oil weight per grain in several crop species. *Crop Pasture Sci.*, 62: 1088–1097.
- Jarvis, A., Ramirez, J., Anderson, B., Leibling, C., Aggarwal, P., 2010. Scenarios of climate change within the context of agriculture. Pp. 9-37 en Reynolds, M.P. (Ed.), *Climate change and crop production*. CABI, London, UK.
- Kattge, J., Knorr, W., 2007. Temperature acclimation in a biochemical model of photosynthesis: a reanalysis of data from 36 species. *Plant. Cell Environ.*, 30: 1176-1190.
- Kellomäki, S., Wang, K.-Y., Lemettinen, M., 2000. Controlled environment chambers for investigating tree response to elevated CO₂ and temperature under boreal conditions. *Photosynthetica*, 38: 69–81.
- Kimball, B.A., Alonso-Rodríguez, A. M., Cavaleri, M. A., Reed, S. C., González, G., Wood, T. E., 2018. Infrared heater system for warming tropical forest understory plants and soils. *Ecol. Evol.*, 8: 1932–1944.
- Koubouris G. C., Kavroulakis N., Metzidakis I. T., Vasilakakis M. D., Sofo A., 2015. Ultraviolet-B radiation or heat cause changes in photosynthesis, antioxidant enzyme activities and pollen performance in olive tree. *Photosynthetica*, 53:279–287.
- Kozłowski, T. T., Pallardy, S. G., 2002. Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *Bot. Rev.*, 68: 270-334.
- Lavee, S., 2007. Biennial bearing in olive (*Olea europaea*). *Ann. Ser. Hist. Nat.*, 17: 101–112.
- Lazzez, A., Perri, E., Caravita, M. A., Khlif, M., Cossentini, M., 2008. Influence of olive maturity stage and geographical origin on some minor components in virgin olive oil of the Chemlali variety. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 982–988.
- Legave, J.-M., Guédon, Y., Malagi, G., El Yaacoubi, A., Bonhomme, M., 2015. Differentiated responses of apple tree floral phenology to global warming in contrasting climatic regions. *Front. Plant Sci.*, 6: 1054
- Levin, S.A., 1992. The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology*, 73: 1943–1967.
- Lin, Y. S., Medlyn, B. E., Ellsworth, D. S., 2012. Temperature responses of leaf net photosynthesis: the role of component processes. *Tree Physiol.*, 32: 219-231.
- Lobell, D. B., Burke, M. B., Tebaldi, C., Mastrandrea, M. D., Falcon, W. P., Naylor, R. L., 2008. Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science*, 319: 607-610.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Leakey, A. D. B., Morgan, P. B., 2005. Global food insecurity. Treatment of major food crops with elevated carbon dioxide or ozone under large-scale fully open-air conditions suggests recent models may have overestimated future yields. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 360: 2011–2020.

- Loomis, R.S., Connor, D. J., 2002. Respiración y reparto de asimilados. Pp: 319-348 en *Ecología de cultivos, productividad y manejo en sistemas agrarios*. Mundi prensa-Barcelona.
- Lopez, S., Bermudez, B., Montserrat-de la Paz, S., Jaramillo, S., Varela, L. M., Ortega-Gomez, A., ... Muriana, F. J. G., 2014. Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1838: 1638–1656.
- López-Bernal, A., García-Tejera, O., Testi, L., Orgaz, F., Villalobos, F. J., 2017b. Stomatal oscillations in olive trees: analysis and methodological implications. *Tree Physiol.*, 38:531–542.
- López-Bernal, Á., García-Tejera, O., Vega, V. A., Hidalgo, J. C., Testi, L., Orgaz, F., Villalobos, F. J., 2015. Using sap flow measurements to estimate net assimilation in olive trees under different irrigation regimes. *Irrig. Sci.*, 33: 357–366.
- López-Bernal, Á., Morales, A., García-Tejera, O., Testi, L., Orgaz, F., De Melo-Abreu, J. P., Villalobos, F. J., 2018. OliveCan: a process-based model of development, growth and yield of olive orchards. *Front. Plant Sci.*, 9: 1–11.
- López-Bernal, A., Testi, L., Villalobos, F. J., 2017a. A single-probe heat pulse method for estimating sap velocity in trees. *New Phytol.*, 216:321-329.
- Lorite, I. J., Gabaldón-Leal, C., Ruiz-Ramos, M., Belaj, A., de la Rosa, R., León, L., Santos, C., 2018. Evaluation of olive response and adaptation strategies to climate change under semi-arid conditions. *Agric. Water Manag.*, 204, 247–261.
- Lucena, B., Manrique, T., Méndez, M. A., 2017. La olivicultura en el mundo y en España. Pp. 3-33, en Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (Eds.). *El cultivo del olivo*. Mundi-Prensa, Madrid,
- Luedeling, E., Girvetz, E. H., Semenov, M. A., Brown, P. H., 2011. Climate change affects winter chill for temperate fruit and nut trees. *PLoS One*, 6: e20155
- Maestri D., Labuckas D., Mireles J., Lamarque A., Zygaldo J., Guzmán C., 1998. Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *J. Sci. Food Agric.*, 77: 494-498.
- Mailer, R. J., Ayton, J., Graham, K., 2010. The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 87: 877-884.
- Manzi, P., Panfili, G., Esti, M., Pizzoferrato, L., 1998. Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 77: 115–120.
- Marchin, R. M., Broadhead, A. A., Bostic, L. E., Dunn, R. R., Hoffmann, W. A., 2016. Stomatal acclimation to vapour pressure deficit doubles transpiration of small tree seedlings with warming. *Plant Cell Environ.*, 39: 2221-2234.
- Marino, G., Caruso, T., Ferguson, L., Marra, F., 2018. Gas exchanges and stem water potential define stress thresholds for efficient irrigation management in olive (*Olea europaea* L.). *Water*, 10:342.
- Marion, G. M., Henry, G. H. R., Freckman, D. W., Johnstone, J., Jones, G., Jones, M. H., ... Virginia, R. A., 1997. Open-top designs for manipulating field temperature in high-latitude ecosystems. *Glob. Chang. Biol.*, 3: 20-32.

- Mariscal, M. J., Orgaz, F., Villalobos, F. J., 2000. Radiation-use efficiency and dry matter partitioning of a young olive (*Olea europaea*) orchard. *Tree Physiol.*, 20: 65–72.
- Martín-Vertedor, A. I., Pérez Rodríguez, J. M., Prieto Losada, H., Fereres Castiel, E., 2011a. Interactive responses to water deficits and crop load in olive (*Olea europaea* L., cv. Morisca) I. - Growth and water relations. *Agric. Water Manage.*, 98: 941–949.
- Martín-Vertedor, A. I., Pérez Rodríguez, J. M., Prieto Losada, H., Fereres Castiel, E., 2011b. Interactive responses to water deficits and crop load in olive (*Olea europaea* L., cv. Morisca) II. - Water use, fruit and oil yield. *Agric. Water Manage.*, 98: 950–958.
- Mesmoudi, K., Bougoul, S., Bournet, P. E., 2012. Thermal performance of an unheated greenhouse under semi-arid conditions during the night. *Acta Hortic.*, 952: 417–424.
- Miserere, A., Searles, P. S., García-Inza, G. P., Rousseaux, M. C., 2018. Elevated temperature affects vegetative growth and fruit oil concentration in olive trees (*Olea europaea*). *Acta Hortic.*, 1199: 523-528.
- Miserere, A., Searles, P. S., Manchó, G., Maseda, P. H., Rousseaux, M. C., 2019. Sap flow responses to warming and fruit load in young olive trees. *Front. Plant Sci.*, 10: 1–13.
- Montero, J. I., Castilla, N., Gutierrez de Ravé, E., Bretones, F., 1985. Climate under plastic in the Almeria area. *Acta Hortic.*, 170: 227–234.
- Morales, A., Leffelaar, P. A., Testi, L., Orgaz, F., Villalobos, F. J., 2016. A dynamic model of potential growth of olive (*Olea europaea* L.) orchards. *Eur. J. Agron.*, 74: 93–102.
- Moratiel, R., Snyder, R. L., Duran, J. M., Tarquis, A. M., 2011. Trends in climatic variables and future reference evapotranspiration in Duero Valley (Spain). *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.*, 11: 1795-1805.
- Moriana, A., Villalobos, F. J., Fereres, E., 2002. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. *Plant. Cell Environ.*, 25:395–405.
- Murchie, E. H., Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.*, 64:3983–3998.
- Norby, R., Edwards, N., Riggs, J., Abner, C., Wullschleger, S., Gunderson, C., 1997. Temperature-controlled open-top chambers for global change research. *Glob. Chang. Biol.*, 3: 259–267.
- Oishi, A. C., Oren, R., Novick, K. A., Palmroth, S., Katul, G. G., 2010. Interannual invariability of forest evapotranspiration and its consequence to water flow downstream. *Ecosystems*, 13: 421–436.
- Orlandi, F., Bonofiglio, T., Romano, B., Fornaciari, M., 2012. Qualitative and quantitative aspects of olive production in relation to climate in southern Italy. *Sci. Hortic.*, 138: 151-158.
- Penalba, O., Rivera, J. A., 2013. Future changes in drought characteristics over southern South America projected by a CMIP5 multi-model ensemble. *Am. J. Clim. Change*, 2: 173–182.

- Peng, S., Laza, R. C., Visperas, R. M., Khush, G. S., Virk, P., Zhu, D., 2004. Rice: progress in breaking the yield ceiling. En: Proceedings of the 4th international crop science congress. Brisbane, Australia.
- Penning de Vries, F.W., Brunsting, A.H., van Laar, H.H., 1974. Products, requirements and efficiency of biosynthesis a quantitative approach. *J. Theor. Biol.*, 45: 339–377.
- Pérez, A. G., León, L., Pascual, M., de la Rosa, R., Belaj, A., Sanz, C., 2019. Analysis of olive (*Olea Europaea* L.) genetic resources in relation to the content of vitamin E in virgin olive oil. *Antioxidants*, 8: 242.
- Pérez-López, D., Ribas, F., Moriana, A., Rapoport, H. F., De Juan, A., 2008. Influence of temperature on the growth and development of olive (*Olea europaea* L.) trees. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 83: 171–176.
- Petrie, P. R., Clingeleffer, P. R., 2005. Effects of temperature and light (before and after budburst) on inflorescence morphology and flower number of Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, 11: 59-65.
- Ploschuk, E. L., Hall, A. J., 1997. Maintenance respiration coefficient for sunflower grains is less than that for the entire capitulum. *F. Crop. Res.*, 49: 147–157.
- Ploschuk, E. L., Hall, A. J., 1995. Capitulum position in sunflower affects grain temperature and duration of grain filling. *F. Crop. Res.*, 44: 111-117.
- Pons, T. L., Welschen, R. A., 2003. Midday depression of net photosynthesis in the tropical rainforest tree *Eperua grandiflora*: contributions of stomatal and internal conductances, respiration and Rubisco functioning. *Tree Physiol.*, 23: 937-947.
- Ponti, L., Gutierrez, A. P., Ruti, P. M., Dell'aquila, A., 2014. Fine-scale ecological and economic assessment of climate change on olive in the Mediterranean Basin reveals winners and losers. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111: 5598–5603.
- Porter, J. R., Gawith, M., 1999. Temperatures and the growth and development of wheat: a review. *Eur. J. Agron.* 10: 23-36.
- Proietti, P., Tombesi, A., 1996. Translocation of assimilates and source-sink influences on productive characteristics of the olive tree. *Adv. Hortic. Sci.*, 10: 11–14.
- Rallo, L., Torreño, P., Vargas, A., Alvarado, J., 1994. Dormancy and alternate bearing in olive. *Acta Hortic.*, 356: 127-136.
- Ramli, U., Baker, D., Quant, P., Harwood, J., 2002. Control mechanisms operating for lipid biosynthesis differ in oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and olive (*Olea europaea* L.) callus cultures. *Biochem. J.*, 364: 385–391.
- Rangel, B., Platt, K. A., Thomson, W. W., 1997. Ultrastructural aspects of the cytoplasmic origin and accumulation of oil in olive fruit (*Olea europaea*). *Physiol. Plant.*, 101: 109–114.
- Rapoport, H.F., 2008. OLEACEAE: *Olea europaea* (olive). Pp. 565–574 en Janick, J., Paull, R.E. (Eds.), *Encyclopedia of Fruits and Nuts*. CAB International, Cambridge.
- Rapoport, H. F., Pérez-López, D., Hammami, S. B. M., Agüera, J., Moriana, A., 2013. Fruit pit hardening: physical measurement during olive fruit growth. *Ann. Appl. Biol.*, 163: 200–208.

- Rattalino Edreira, J. I., Budakli Carpici, E., Sammarro, D., Otegui, M. E., 2011. Heat stress effects around flowering on kernel set of temperate and tropical maize hybrids. *F. Crop. Res.*, 123: 62–73.
- Reich, P. B., Sendall, K. M., Rice, K., Rich, R. L., Stefanski, A., Hobbie, S. E., Montgomery, R. A., 2015. Geographic range predicts photosynthetic and growth response to warming in co-occurring tree species. *Nat. Clim. Chang.*, 5: 148.
- Rodríguez-Calcerrada, J, Reich, P. B., Rosenqvist, E., Pardos, J. A., Cano, F. J., Aranda I., 2008. Leaf physiological versus morphological acclimation to high-light exposure at different stages of foliar development in oak. *Tree Physiol.*, 28:761–771.
- Rondanini, D. P., Castro, D. N., Searles, P. S., Rousseaux, M. C., 2014. Contrasting patterns of fatty acid composition and oil accumulation during fruit growth in several olive varieties and locations in a non-Mediterranean region. *Eur. J. Agron.*,52: 237-246.
- Rondanini, D., Castro, D., Searles, P., Rousseaux, M. C., 2011. Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas y aceites*, 62: 399-409.
- Rondanini, D., Savin, R., Hall, A. J., 2003. Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling. *Field Crops Res.*, 83: 79-90.
- Rosati, A., Esparza, G., DeJong, T. M., Percy, R. W., 1999. Influence of canopy light environment and nitrogen availability on leaf photosynthetic characteristics and photosynthetic nitrogen-use efficiency of field-grown nectarine trees. *Tree Physiol.*, 19: 173–180.
- Rosati, A., Paoletti, A., Al Hariri, R., Morelli, A., Famiani, F., 2018. Resource investments in reproductive growth proportionately limit investments in whole-tree vegetative growth in young olive trees with varying crop loads. *Tree Physiol.*, 38: 1267–1277.
- Rosati, A., Zipančić, M., Caporalli, S., Padula, G., 2009. Fruit weight is related to ovary weight in olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hortic.*, 122, 399–403.
- Rousseaux, M. C., Benedetti, J. P., Searles, P.S., 2008. Leaf-level responses of olive trees (*Olea europaea* L.) to the suspension of irrigation during the winter in an arid region of Argentina. *Sci. Hortic.*, 115: 135–141.
- Rousseaux, M. C., Figuerola, P. I., Correa-Tedesco, G., Searles, P. S., 2009. Seasonal variations in sap flow and soil evaporation in an olive (*Olea europaea* L.) grove under two irrigation regimes in an arid region of Argentina. *Agric. Water Manag.*, 96: 1037–1044.
- Rutishauser, T., Stöckli, R., Harte, J., Kueppers, L., 2012. Climate change: Flowering in the greenhouse. *Nature*, 485: 448–449.
- SADSN (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación), 2015. Tercera Comunicación Nacional de la República Argentina a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Disponible en: <https://unfccc.int/resource/docs/natc/argnc3s.pdf>

- Sadras, V. O., Bubner, R. A., Moran, M. A., 2012a. A large-scale, open-top system to increase temperature in realistic vineyard conditions. *Agric. For. Meteorol.*, 154: 187-194.
- Sadras, V. O., Montoro, A., Moran, M. A., Aphalo, P. J., 2012b. Elevated temperature altered the reaction norms of stomatal conductance in field-grown grapevine. *Agric. For. Meteorol.*, 165: 35–42.
- Sadras, V. O., Moran, M. A., 2013. Nonlinear effects of elevated temperature on grapevine phenology. *Agric. For. Meteorol.*, 173, 107–115.
- Sadras, V.O., Soar, C.J., 2009. Shiraz vines maintain yield in response to a 2–4 °C increase in maximum temperature at key phenostages. *Eur. J. Agron.*, 31: 250–258.
- Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S., Kallel, H., 2008. α -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chem.*, 108: 833–839.
- Salas, J. J., Sánchez, J., Ramli, U., Manaf, A., 2000. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress Lipid Res.*, 39: 151–180.
- Salazar-Parra, C., Aranjuelo, I., Pascual, I., Erice, G., Sanz-Sáez, Á., Aguirreolea, J., ... Morales, F., 2015. Carbon balance, partitioning and photosynthetic acclimation in fruit-bearing grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo) grown under simulated climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) scenarios in temperature gradient greenhouses. *J. Plant Physiol.*, 174: 97–109.
- Sánchez, J., Harwood, J. L., 2002. Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104: 564-573.
- Saxena, A., Varun, El-Sebaili, A.A., 2015. A thermodynamic review of solar air heaters. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 43: 863–890.
- Schumaker, M. A., Bassman, J.H., Robberecht, R., Rademaker, K., 1997. Growth, leaf anatomy, and physiology of *Populus* clones in response to solar ultraviolet-B radiation. *Tree Physiol.*, 17:617–626.
- Searles, P. S., Agüero Alcaras, M., Rousseaux, M. C., 2011. El consumo del agua por el cultivo de olivo (*Olea europea* L.) en el noroeste de Argentina: una comparación con la Cuenca Mediterránea. *Ecol. Austral*, 21: 15–28.
- Searles, P. S., Saravia, D., Rousseaux, M. C., 2009. Root length density and soil water distribution in drip-irrigated olive orchards in Argentina under arid conditions. *Crop Pasture Sci.*, 60: 280-288.
- Seiler G., Brothers M., 1999. Oil concentration and fatty acid composition of achenes of *Helianthus* species (Asteraceae) from Canada. *Econ. Bot.*, 53. 273-280.
- Semenov, M. A., Porter, J.R., 1995. Climatic variability and the modelling of crop yields. *Agric. For. Meteorol.*, 73: 265-283.
- Sendall, K. M., Reich, P. B., Zhao, C., Jihua, H., Wei, X., Stefanski, A., ... Montgomery, R. A., 2015. Acclimation of photosynthetic temperature optima of temperate and boreal tree species in response to experimental forest warming. *Glob. Chang. Biol.*, 21: 1342-1357.

- Seneviratne, S. I., Rogelj, J., Séférian, R., Wartenburger, R., Allen, M. R., Cain, M., ... Warren, R. F., 2018. The many possible climates from the Paris Agreement's aim of 1.5 °C warming. *Nature*, 558: 41–49.
- Sherwin, E. R., 1976. Antioxidants for vegetable oils. *J. Am. Chem. Soc.*, 53:430-436.
- Slot, M., Kitajima, K., 2015. General patterns of acclimation of leaf respiration to elevated temperatures across biomes and plant types. *Oecologia*, 177: 885-900.
- Stewart, J. J., Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Wenzl, C. A., Muller, O., Adams, W. W., 2016. Growth temperature impact on leaf form and function in *Arabidopsis thaliana* ecotypes from northern and southern Europe. *Plant. Cell Environ.*, 39: 1549–1558.
- Taiz, Lincoln, Eduardo Zeiger., 2002. *Stress Physiology*. Pp. 591-623, en *Plant Physiology*. 3rd. England: Sinauer Associates.
- Tanasijevic, L., Todorovic, M., Pereira, L. S., Pizzigalli, C., Lionello, P., 2014. Impacts of climate change on olive crop evapotranspiration and irrigation requirements in the Mediterranean region. *Agric. Water Manag.*, 144: 54-68.
- Thomas, D. S., Montagu, K. D., Conroy, J. P., 2004. Changes in wood density of *Eucalyptus camaldulensis* due to temperature— the physiological link between water viscosity and wood anatomy. *For. Ecol. Manage.*, 193: 157-165
- Tognetti, R., d'Andria, R., Morelli, G., Calandrelli, D., Fragnito, F., 2004. Irrigation effects on daily and seasonal variations of trunk sap flow and leaf water relations in olive trees. *Plant Soil*, 263: 249–264.
- Torres, M., Pierantozzi, P., Searles, P., Rousseaux, M. C., García-Inza, G., Miserere, A., Bodoira, R., Contreras, C., Maestri, D., 2017. Olive cultivation in the southern hemisphere: Flowering, water requirements and oil quality responses to new crop environments. *Front. Plant Sci.*, 8: 1830.
- Tous, J., Romero, A., Plana, J., Guerrero, L., Díaz, I., Hermoso J., 1997. Características químico-sensoriales de los aceites de oliva 'Arbequina' obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites*, 48: 415-424.
- Tranquillini, W., Havranek, W. M., Ecker, P., 1986. Effects of atmospheric humidity and acclimation temperature on the temperature response of photosynthesis in young *Larix decidua* Mill. *Tree Physiol.*, 1: 37-45.
- Trentacoste, E. R., Calderón, F. J., Contreras-Zanessi, O., Galarza, W., Banco, A. P., Puertas, C. M., 2019. Effect of regulated deficit irrigation during the vegetative growth period on shoot elongation and oil yield components in olive hedgerows (cv. Arbosana) pruned annually on alternate sides in San Juan, Argentina. *Irrig. Sci.*, 37: 533–546.
- Trentacoste, E. R., Contreras-Zanessi, O., Beyá-Marshall, V., Puertas, C. M., 2018. Genotypic variation of physiological and morphological traits of seven olive cultivars under sustained and cyclic drought in Mendoza, Argentina. *Agric. Water Manag.*, 196, 48–56.
- Trentacoste, E. R., Puertas, C. M., Sadras, V. O., 2010. Effect of fruit load on oil yield components and dynamics of fruit growth and oil accumulation in olive (*Olea europaea* L.). *Eur. J. Agron.*, 32: 249–254.

- Trentacoste, E. R., Puertas, C. M., Sadras, V. O., 2012. Modelling the intraspecific variation in the dynamics of fruit growth, oil and water concentration in olive (*Olea europaea* L.). *Eur. J. Agron.*, 3: 83–93.
- Uceda, M., Hermoso, M., 2001. La calidad del aceite de oliva. Pp. 589–614 en Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (Eds.), *El cultivo del olivo*. Junta de Andalucía-Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Urban. J., Ingwers, M. W., McGuire, M. A., Teskey, R. O., 2017a. Increase in leaf temperature opens stomata and decouples net photosynthesis from stomatal conductance in *Pinus taeda* and *Populus deltoides x nigra*. *J. Exp. Bot.*, 68: 1757–1767. doi:10.1093/jxb/erx052
- Urban, J., Ingwers, M. W., McGuire, M. A., Teskey, R. O., 2017b. Stomatal conductance increases with rising temperature. *Plant Signal Behav.*, 12:e1356534
- Vico, G., Way, D.A., Hurry, V., Manzoni, S., 2019. Can leaf net photosynthesis acclimate to rising and more variable temperatures? *Plant. Cell Environ.*, 42:1913–1928.
- Villalobos, F. J., Testi, L., Hidalgo, J., Pastor, M., Orgaz, F., 2006. Modelling potential growth and yield of olive (*Olea europaea* L.) canopies. *Eur. J. Agron.*, 24: 296–303.
- Villalobos, F. J., Hall, A. J., Ritchie, J. T., Orgaz, F., 1996. OILCROP-SUN: A development, growth, and yield model of the sunflower crop. *Agron. J.*, 88: 403–415.
- Vivaldi, G., Strippoli, G., Pascuzzi, S., Stellacci, A. M., Camposeo, S., 2015. Olive genotypes cultivated in an adult high-density orchard respond differently to canopy restraining by mechanical and manual pruning. *Sci. Hortic.*, 192: 391–399.
- Vuletin Selak, G., Cuevas, J., Goreta Ban, S., Pinillos, V., Dumcic, G., Perica, S., 2014. The effect of temperature on the duration of the effective pollination period in ‘Oblica’ olive (*Olea europaea*) cultivar. *Ann. Appl. Biol.*, 164: 85–94.
- Vuletin Selak, G. V., Perica, S., Ban, S. G., Poljak, M., 2013. The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hortic.*, 156: 38–46.
- Wada, N., Miyamoto, M., Kojima, S., 1998. Responses of reproductive traits to short-term artificial warming in a deciduous alpine shrub *Geum pentapetalum* (Rosaceae). *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.*, 11: 137–146.
- Wang, G., Kang, M. S., Moreno, O., 1999. Genetic analyses of grain-filling rate and duration in maize. *Field Crops Res.*, 61: 211–222.
- Way, D.A., Domec, J. C., Jackson, R. B., 2013. Elevated growth temperatures alter hydraulic characteristics in trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings: Implications for tree drought tolerance. *Plant Cell Environ.*, 36: 103–115.
- Way, D. A., Oren R., 2010. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. *Tree Physiol.*, 30: 669–688.
- Wertin, T. M., McGuire, M. A., Teskey, R. O., Tissue, D., 2011. Higher growth temperatures decreased net carbon assimilation and biomass accumulation of

northern red oak seedlings near the southern limit of the species range. *Tree Physiol.*, 31:1277–1288.

- Winkler, J. A., Cinderich, A.B., Ddumba, S. D., Doubler, D., Nikolic, J., Perdinan, Pollyea, A. M., Young, D. R., Zavalloni, C., 2013. Understanding the Impacts of Climate on Perennial Crops. Pp. 37–49, en *Climate Vulnerability*. Elsevier.
- Wolf, R. B., Cavins, J. F., Kleiman, R., Black, L. T., 1982. Effect of temperature on soybean seed constituents: oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59: 230-232.
- Yamori, W., Hikosaka, K., Way, D. A., 2013. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth. Res.*, 119:101–117.
- Zaninelli, P. G., Menéndez, C. G., Falco, M., Franca, N. L., Carril, A. F., 2019. Future hydroclimatological changes in South America based on an ensemble of regional climate models. *Clim. Dyn.*, 52, 819–830.
- Zohary, D., Spiegel-Roy, P., 1975. Beginnings of fruit growing in the old world. *Science*, 187: 319–327.

APÉNDICES

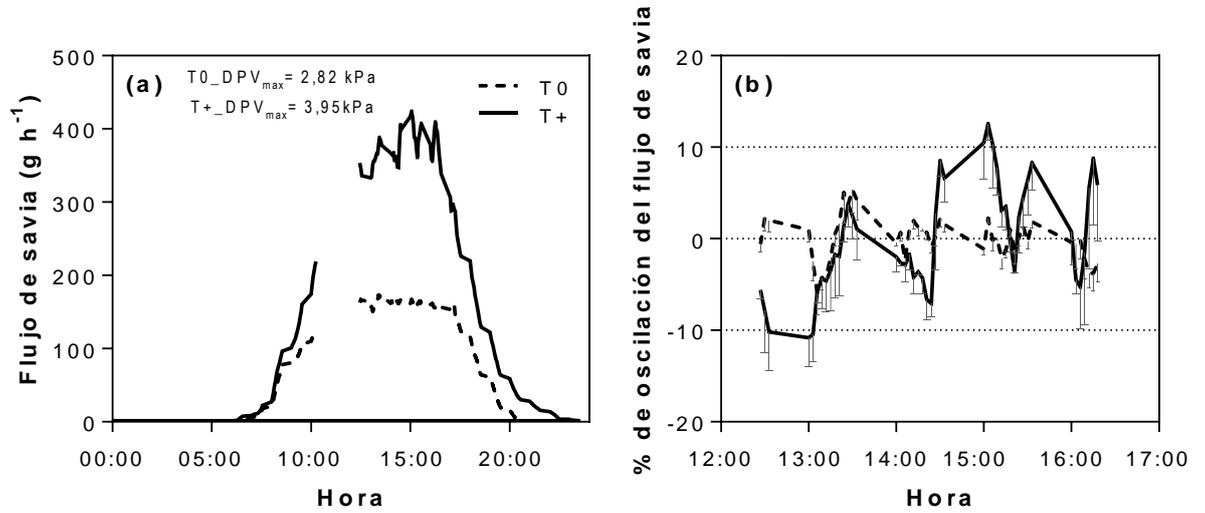
Apéndice I

Transmancia PAR (I/I_0) dentro de las OTCs según el tipo de techo: sin techo (OTC T0) y con reducción de acetato transparente (OTC T+) (ver sección 2.2.3 y 2.2.4; figura 2.2a y b). Las medidas se tomaron dentro de tres cámaras T0 y tres T+, en nueve posiciones horizontales y a una altura de 10 cm por debajo de la altura del techo, utilizando una barra de luz de integración lineal de 1 m de largo. También se tomó una medición fuera de cada OTC al mismo tiempo. La transmitancia PAR se determinó como I / I_0 en cada posición y OTC. Las medidas se realizaron cerca del mediodía solar de un día de verano bajo condiciones soleadas. Se muestra el valor promedio de transmitancia de las posiciones para cada tipo de techo ± 1 error estandar ($n = 3$). Se evaluó la diferencia de medias usando un ANOVA para efectos fijos.

	Tipo de techo de la OTC		<i>p</i> - valor
	Sin techo	Reducido con acetato	
I/I_0	$0,81 \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,08$	<i>ns</i> *

* *ns*, no significativo ($p > 0,05$).

Apéndice II



Dinámica diaria del flujo de savia (a), y porcentaje de oscilación del flujo de savia entre las 12:30 y 16:30 h (b) de olivos jóvenes del cv Arbequina en las OTCs control (T0) y calentadas (T+). Los datos fueron registrados por un datalogger a intervalos de 5 min y corresponden a la medición de un día de verano de 2016. Entre las 10:35 y 12:30 h no se registraron datos debido a un problema con el almacenador de datos. Las líneas representan la media de cuatro repeticiones por tratamiento ($n = 4$). Los porcentajes de oscilación (i.e., amplitud de la oscilación) fueron calculados como la relación entre cada valor de flujo de savia y el valor promedio siguiendo la metodología propuesta por López-Bernal et al. (2017b). En ambos tratamientos térmicos, las oscilaciones máximas estuvieron alrededor del 10 %, por encima o debajo del valor medio.

Apéndice III

Número de hojas, área foliar individual y masa foliar específica de olivos cvs Arbequina y Coratina al finalizar una temporada (2014-15 o 2015-16) de tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos se aplicaron desde diciembre a mayo, una vez ocurrido el cuaje de frutos. El área foliar individual y la masa foliar específica se determinaron a partir del peso seco y área conocidos de una muestra de 50 hojas (ver sección 4.2.3 del capítulo IV para más detalles de la metodología usada). El número de hojas se estimó a partir de la relación entre el peso seco de la muestra de hojas y el peso total de la biomasa de hojas. Se muestran los valores promedios \pm 1 error estándar (n = 4).

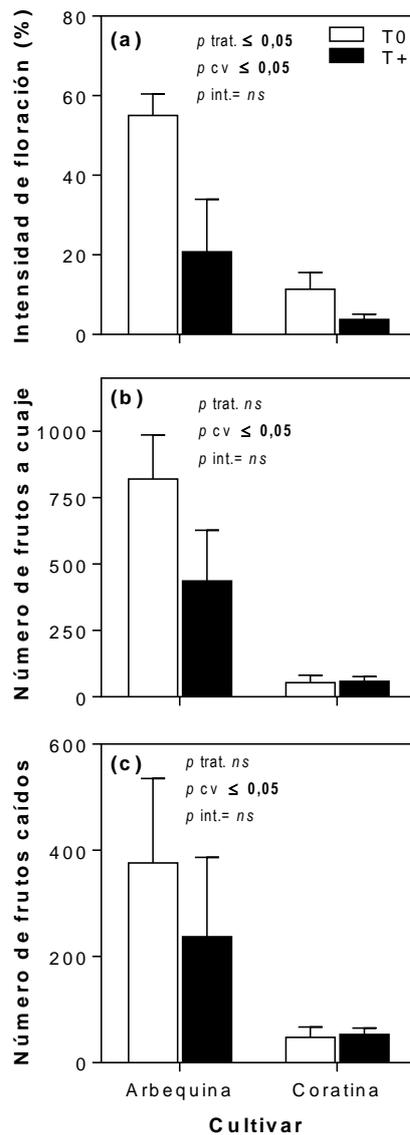
Temporada	Cultivar	Tratamiento	Número de hojas	Área foliar (cm ²)	Masa foliar específica (mg cm ⁻²)
2014-2015	Arbequina	T0	3018 \pm 264	4,21 \pm 0,19	20,53 \pm 0,40
		T+	3889 \pm 617	4,27 \pm 0,13	18,07 \pm 0,46
	Coratina	T0	1939 \pm 294	4,67 \pm 0,46	20,62 \pm 0,35
		T+	2039 \pm 276	6,58 \pm 0,50	18,59 \pm 0,15
2015-2016	Arbequina	T0	5355 \pm 756	3,61 \pm 0,21	21,45 \pm 0,57
		T+	5924 \pm 413	3,55 \pm 0,25	20,86 \pm 1,00
	Coratina	T0	4013 \pm 328	5,04 \pm 0,33	21,16 \pm 0,71
		T+	4891 \pm 371	4,94 \pm 0,12	21,39 \pm 0,17

Apéndice IV

Masa foliar específica (mg cm^{-2}) de olivos cv Coratina bajo tratamiento T+ durante dos temporadas consecutivas (2014-15 y 2015-16). El tratamiento térmico se aplicó desde diciembre a mayo en cada temporada. Se determinó la masa foliar específicas al inicio del tratamiento en la primera temporada (en diciembre de 2014) sobre hojas sin tratamiento y al final de la segunda temporada (en mayo de 2016) (ver secciones 4.2.2 y 4.2.3, capítulo IV, para detalles sobre la metodología usada). Considerando que las hojas de olivo persisten en el árbol dos años, se asume que al finalizar la segunda temporada en otoño, la biomasa foliar pertenecía a hojas desarrolladas entre 2015 y 2016 mientras que las desarrolladas entre la primavera y el verano de 2014 son las que cayeron. Los valores corresponden al promedio \pm 1 error estándar ($n = 4$).

Momento	Masa foliar específica (mg cm^{-2})
2014	$19,35 \pm 0,48$
2016	$21,39 \pm 0,17$

Apéndice V



Intensidad de la floración de retorno en 2015 (a), número de frutos a cuaje (b) y número de frutos caídos estimado (c) de árboles de olivo cvs Arbequina y Coratina sometidos a dos temporadas (2014-15 y 2015-16) de tratamientos térmicos: T0 o T+. Los tratamientos se aplicaron una vez establecido el cuaje hasta cosecha de frutos, desde diciembre a mayo. La intensidad de floración se determinó usando una escala visual con 6 niveles cuando los árboles se encontraban en plena floración ($\geq 50\%$ flores). El número de frutos a cuaje se determinó contando los pequeños frutos luego de establecido el final de floración. Los frutos caídos en 2015-16 se estimaron como la diferencia entre el número de frutos a cuaje y el de cosecha, al final del periodo de calentamiento en 2016. Se muestra el valor promedio ± 1 error estándar ($n = 4$) para cada combinación de cultivar y tratamiento térmico. Se evaluaron las diferencias estadísticas para los factores tratamiento térmico (trat.) y cultivar (cv) y la interacción entre ambos factores (int.) utilizando un ANOVA de dos vías. *P*-valor significativo ($p \leq 0,05$) en negrita; *ns*, no significativo.

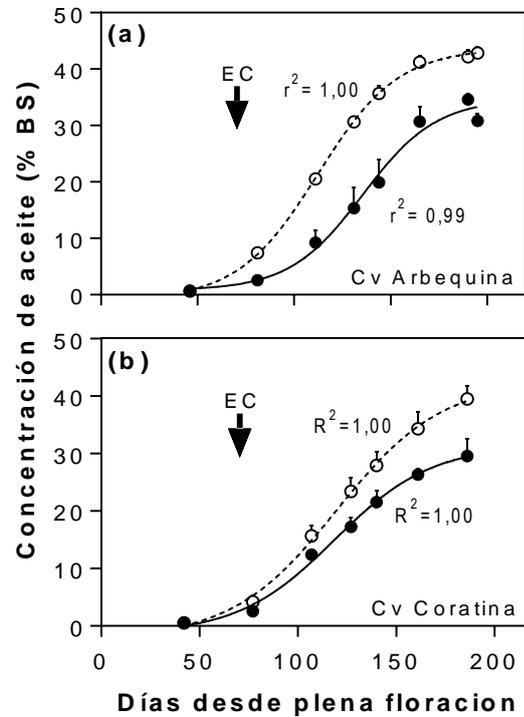
Apendice VI

Fracción (g g^{-1} de materia seca) de carbohidratos, proteínas, lípidos, lignina y minerales en los distintos órganos vegetativos y del fruto de olivo. Los valores fraccionarios luego se utilizaron para determinar los factores de conversión para estimar equivalentes glucosa de la biomasa por órgano. Las fracciones correspondientes a los órganos vegetativos se asumieron fijas y fueron obtenidas de la bibliografía existente (Penning de Vries et al., 1974; Mariscal et al., 2000). En el caso de los frutos, como su composición (e.g., % de aceite BS) varía con las condiciones ambientales bajo las que se desarrollan, se analizaron el mesocarpo y el endocarpo+semilla por separado. Los valores de la composición bioquímica para cada tejido del fruto fueron obtenidos de la bibliografía (Heredia-Moreno et al., 1987; Conde et al., 2008; Rapoport, 2008; Ghanbari et al., 2012) y de nuestros valores de las relaciones pulpa/carozo y concentraciones de aceite del fruto (%).

Fracción	Órgano vegetativo			Frutos	
	Hojas	Ramas y raíces finas	Tronco y ramas gruesas	mesocarpo	Endocarpo + semilla
Carbohidratos (f_c)	0,570	0,615	0,660	$1 - (f_p+f_g+f_l+f_m)$	0,575
Proteínas (f_p)	0,115	0,061	0,020	0,030	0,030
Grasas (f_g)	0,058	0,037	0,010	aceite BS*	0,045
Lignina (f_l)	0,184	0,205	0,300	0,00	0,320
Minerales (f_m)	0,079	0,082	0,010	0,05	0,030

*Aceite BS = $[(\text{g PS fruto} * \% \text{ aceite fruto BS} / 100) - (\text{g PS endocarpo} * 0,03)] / \text{g PS mesocarpo}$

Apendice VII



Dinámica de la acumulación de aceite (% BS) en frutos de olivo cvs Arbequina (a) y Coratina (b) bajo los tratamientos térmicos: control (T0) y calentado (T+). Los tratamientos se aplicaron en árboles enteros en la fase de acumulación de aceite del fruto (diciembre a mayo) durante una temporada (2015-16). Cada símbolo representa el valor promedio ± 1 error estándar ($n=4$) de cada cultivar x tratamiento térmico. El momento de endurecimiento de carozo (EC) se indica con una flecha negra. Para cada cultivar x tratamiento térmico se indica la mejor función de ajuste (sigmoideal) y su coeficiente de determinación (r^2). A partir de la prueba F de suma de cuadrados extra se compararon los ajustes independientes con un ajuste global y se determinó curvas diferentes ($p \leq 0,05$) para cada tratamiento.