TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Patrones y dinámica de la acumulación y composición del aceite durante el crecimiento y desarrollo del fruto en cultivares de olivo (*Olea europaea* L.)

por

Biol. Bodoira Romina Mariana

Director: Maestri Damián Modesto
Co-Directora: Torres Myriam Mariela
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina
2015

COMISIÓN ASESORA

Dra. María Cecilia Rousseaux, Centro Regional de Investigaciones de La Rioja (CRILAR).

Dr. Nelson Rubén Grosso, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Damián Modesto Maestri, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: …….. Aclaración: ……

Firma: …….. Aclaración: ……

Firma: …….. Aclaración: ……

AGRADECIMIENTOS

A Damián, mi director que incondicionalmente me ha acompañado en el trabajo diario, en los problemas que en todo trabajo experimental surgen continuamente, siempre tratando de apoyarme y enseñarme humildemente. Gracias por ser un ejemplo para mí, no sólo en lo académico, si no y principalmente como persona.

A Mariela, mi codirectora, porque desde lejos siempre me brindó su apoyo y ayuda, por lo muestreos realizados para esta tesis y por los consejos y sugerencias en todas las etapas de este trabajo.

Al tribunal de esta tesis por tomarse el tiempo de valorar este trabajo, y particularmente a Cecilia Rousseaux y Rubén Groso por asesorarme durante los cuatro años en los que se llevó a cabo el mismo.

A mis compañeros de trabajo: Jime, Marces, Damián, Ali, Julio, José, Agus, Romis, Diana, Pauli y Seba, que logran un ambiente de trabajo hermoso, diariamente es un gusto compartir con ustedes.

A los ayudantes de laboratorio y tesinistas que durante estos años pasaron por el laboratorio. Gracias: Nico, Fede, Vir, Lucy, Jesi, Ana y Gaby.

A Pierluigi por ayudarme en los primeros años de la tesis en cuanto a lo laboral, y por brindarme siempre su amistad.

Al instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET) y al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA-UNC) por brindarme el lugar físico y los equipos necesarios para llevar a cabo el trabajo realizado.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Estación Experimental Agropecuaria San Juan y Cruz del Eje, Córdoba.

Al los Doctores Agnese Taticchi y Maurizio Servili del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali – Universita degli Studi di Perugia por la colaboración en la caracterización de los fenoles individuales.

A Fernando Aguate y Mónica Balzarini de la cátedra de bioestadística de la Facultad de Ciencias agropecuarias por la gran ayuda que significaron a la hora de analizar los datos de este trabajo.

A la cátedra de química general por facilitarme el uso del liofilizador.

A la Biól. Adriana Pérez (IMBIV – CONICET - UNC) por su apoyo técnico en los análisis de microscopía óptica.

A la Dra. Marcela Palacios (IMBIV – CONICET – UNC) por su predisposición en cualquier consulta respecto al manejo de los cromatógrafos.

Al Servicio Meteorológico Nacional por facilitarme los datos meteorológicos de la provincia de Córdoba.

A CONICET y SECyT- UNC, un sentido reconocimiento de gratitud, ya que sin sus aportes financieros, nada hubiera podido lograr.

A mis papis, por siempre apoyarme en mis estudios y por estar orgullosos de mí y demostrármelo siempre. Pero principalmente por ser el sustento que cualquier persona quisiera, sin él ninguno de mis logros hubiesen sido posibles.

A mis hermanas por ser ejemplo de responsabilidad, constancia, metas cumplidas y principalmente mujeres increíbles.

A mis amigas de siempre, de toda la vida, de todas las experiencias, años de crecimiento y cambios compartidos. Por siempre estar presentes en los momentos importantes de mi vida, no sería quién soy sin ustedes a la par en todo.

Finalmente a mis amores; Ariel… gracias por tanto, por tanto amor, por tanta compresión, por tanta paciencia y orgullo. Gracias por ser parte de mi vida y llenarla de hermosos momentos por tener siempre palabras de aliento, por apoyarme en mis estudios y por brindarme día a día lo mejor de vos. También a mi segundo y nuevo amor, Jere, que me acompañaste desde la panza en la última etapa de este trabajo, espero algún día transmitirte los valores de responsabilidad y constancia pero principalmente la fortaleza de encontrar tu pasión y apostar a ella.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

***** "*Oil biogenesis and antioxidant compounds from "Arauco" olive (Olea europaea* L.*) cultivar during fruit development and ripening*". Romina Bodoira, Mariela Torres, Pierluigi Pierantozzi, Agnese Taticchi, Maurizio Servili y Damián Maestri. *European Journal Lipid Science and Technology*. 2015. 377-388.

* "*Componentes antioxidantes del fruto del olivo (Olea europea* L. cv. Arauco)" en el IV Congreso Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia: La Diversidad Química y Biológica. Río Gallegos. Santa Cruz, Argentina. Septiembre 2014.

***** "*Dynamic of oil accumulation in relation to fruit growth and ripening from Arbequina and Manzanilla cultivars grown at two localities in Argentina"* y "*Oil Accumulation Pattern from Arauco, an Autochthonous Argentinean Olive Cultivar"* en el VII Simposio Internacional de Olivicultura. San Juan, Argentina. Septiembre 2012.

INDICE DE CONTENIDOS

Lista de Figuras 1

Lista de Tablas 8

Lista de Abreviaturas 11

Resumen 13

Summary 14

ANTECEDENTES GENERALES E INTRODUCCIÓN AL TEMA DE ESTUDIO

Taxonomía, distribución y cultivares de olivo 16

Fructificación, fases de crecimiento y maduración del fruto del olivo 22

Biogénesis, acumulación y composición del aceite 26

Componentes menores del aceite 32

Hipótesis 41

Objetivos 42

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y caracterización de los sitios de estudio 44

Riego del olivar 53

Diseño de muestreo de frutos 53

Índice de madurez, estudios morfométricos, histoquímicos y de microscopía 54

Contenido de aceite 55

Composición de ácidos grasos 55

Componentes menores 57

Análisis estadísticos de los resultados 59

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pautas de crecimiento y desarrollo de los frutos y dinámica de la acumulación y composición del aceite en los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco 62

Conclusiones 106

Comportamiento de los cultivares Arbequina y Manzanilla en dos ambientes de cultivo 110

Conclusiones 135

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN 136

BIBLIOGRAFÍA 138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Árbol, ramas fructíferas y frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración del cv. Arbequina.	**19**
Figura 2:	Árbol, rama fructífera y frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración del cv. Manzanilla**.**	**20**
Figura 3:	Árbol, ramas fructíferas y frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración del cv. Arauco.	**21**
Figura 4:	Esquema simplificado de la biosíntesis de triacilglicéridos en células vegetales.	**30**
Figura 5:	Algunos compuestos fenólicos identificados en el fruto del olivo.	**34**
Figura 6:	Estructura de tocoferoles y tocotrienoles.	**37**
Figura 7:	El escualeno como precursor biosintético de esteroles y alcoholes triterpénicos no-esteroidales.	**40**
Figura 8:	Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC), en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11).	**47**
Figura 9:	Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC) en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12).	**48**
Figura 10:	Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11).	**51**
Figura 11:	Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12).	**52**
Figura 12:	Evolución del peso de los frutos (g/fruto) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12).	**65**

Figura 13: Dinámica de la acumulación de materia seca (g/fruto) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **65**

Figura 14: Evolución del índice de madurez de los frutos en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **69**

Figura 15: Evolución del tamaño de células (μm^2) en la sección media del mesocarpo de los frutos en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **69**

Figura 16: Formación de oleosomas en células del mesocarpo de frutos (cv. Arauco) en distintos estadios de desarrollo. a) 33 DDPF, b) 65 DDPF c) 80 DDPF, d) 96 DDPF y e) 156 DDPF. **71**

Figura 17: Células del mesocarpo, conteniendo un único glóbulo de aceite, de frutos obtenidos luego de 150 DDPF. a) cv. Arbequina, b) cv. Manzanilla. **71**

Figura 18: Dinámica de la acumulación de aceite (g/100 fruto, según base seca) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **74**

Figura 19: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmítico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **81**

Figura 20: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido esteárico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **82**

Figura 21: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmitoleico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **82**

Figura 22: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido oleico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **83**

Figura 23: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linoleico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **86**

Figura 24 Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linolénico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **86**

Figura 25: Análisis de regresión lineal entre las concentraciones (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de los ácidos oleico y linoleico en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan ($p \leq 0,05$). Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **87**

Figura 26: Evolución de la relación entre la concentración de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI), en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF) en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **88**

Figura 27: Evolución del contenido de los ácidos grasos mayoritarios (palmítico, 16:0; oleico, 18:1; linoleico, 18:2) del aceite de frutos del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), cultivado en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y **92**

2011-12).

Figura 28: Evolución del contenido de fenoles totales (mg/g fruto, SBS) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **98**

Figura 29: Evolución del contenido de tocoferol totales (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **103**

Figura 30: Evolución del contenido de α-tocoferol (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **104**

Figura 31: Evolución del contenido de β-tocoferol (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **104**

Figura 32: Evolución del contenido de γ-tocoferol (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **105**

Figura 33: Evolución del contenido de escualeno (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **105**

Figura 34: Esquema propuesto para la incorporación de los tres ácidos grasos principales (palmítico, oleico, linoleico) a los glicéridos del aceite del cv. Arauco. **109**

Figura 35: Evolución del peso de los frutos (g/fruto) en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **112**

Figura 36: Dinámica de la acumulación de materia seca (g/fruto) en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **112**

Figura 37: Evolución del índice de madurez de los frutos en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **113**

Figura 38: Dinámica de la acumulación de aceite (g/100 g de fruto, según base seca) en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **115**

Figura 39: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmítico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **120**

Figura 40: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido esteárico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **120**

Figura 41: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmitoleico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **121**

Figura 42: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido oleico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **121**

Figura 43: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linoleico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **122**

Figura 44: Análisis de regresión lineal entre las concentraciones (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de los ácidos oleico y linoleico en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan ($p \leq 0,05$). Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **123**

Figura 45: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linolénico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **124**

Figura 46: Evolución de la relación entre Ácidos Grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) del aceite en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **124**

Figura 47: Evolución del contenido de fenoles totales (mg/g fruto, SBS) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **131**

Figura 48: Evolución del contenido de tocoferoles totales (mg/Kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **131**

Figura 49: Evolución del contenido de α-Tocoferol (mg/Kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **132**

Figura 50: Evolución del contenido de β-Tocoferol (mg/Kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo **132**

cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12).

Figura 51: Evolución del contenido de γ-Tocoferol (mg/Kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. **133**

Figura 52: Evolución del contenido de escualeno (mg/Kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). **133**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Fechas de plena floración (FPF) y período de endurecimiento del endocarpo (expresado en días después de plena floración, DDPF) en los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco, en ambos ciclos de cultivo (2010-2011 y 2011-2012) y sitios de estudio (Cruz del Eje, Córdoba y Dpto. San Martín San Juan). **45**

Tabla 2: Características físicas y físico-químicas del suelo correspondiente al área de estudio del Paraje Las Playas (Cruz del Eje, Córdoba, Argentina). **46**

Tabla 3: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11). **47**

Tabla 4: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12). **48**

Tabla 5: Características físicas y físico-químicas del suelo correspondiente al área de estudio de la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan). **50**

Tabla 6: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11). **51**

Tabla 7: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12). **52**

Tabla 8: Aplicación de modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para componentes de rendimiento y parámetros celulares de frutos de los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco cultivados en EEA-INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración. Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). **66**

Tabla 9: Coeficientes de correlación de Pearson entre el tiempo térmico acumulado y parámetros de rendimiento, histo-químicos y químicos de frutos y aceites de los cultivares Arauco, Arbequina y Manzanilla cultivados en EEA-INTA San Juan. Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). **67**

Tabla 10: Composición de ácidos grasos (% respecto del total de ácidos grasos) de semilla, pulpa (mesocarpo + epicarpo) y fruto completo en estadios tempranos del desarrollo de tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Las muestras de frutos fueron recolectadas durante el ciclo de cultivo 2010/11. **76**

Tabla 11: Análisis de regresión no lineal a dos tramos para algunos componentes químicos del aceite en los cultivares Arbequina, Arauco y Manzanilla cultivados en la EEA-INTA San Juan, en función los días después de plena floración (DDPF). Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). **84**

Tabla 12: Aplicación de modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para cada uno de los tramos de la curva para algunos componentes químicos del aceite en los cultivares Arbequina, Arauco y Manzanilla cultivados en la EEA-INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración (DDPF). Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). **85**

Tabla 13: Variación de la composición de ácidos grasos (% respecto del total de cada fracción) de las fracciones de acilglicéridos en el aceite del cv. Arauco obtenido a partir del mesocarpo de frutos en distintos estadios de desarrollo. Las muestras de frutos fueron recolectadas en la EEA – INTA San Juan durante el ciclo de cultivo 2013/14. **93**

Tabla 14: Concentración de compuestos fenólicos (mg/g fruto, SBS) del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF). **99**

Tabla 15: Aplicación de modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para componentes de rendimiento y parámetros celulares de frutos de los cultivares Arbequina y Manzanilla en EEA-INTA San Juan y en Cruz del Eje - Córdoba, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración. Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). **113**

Tabla 16: Análisis de regresión no lineal a dos tramos para algunos componentes químicos del aceite en los cultivares Arbequina y Manzanilla cultivados en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración. Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). **125**

Tabla 17: Aplicación de modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para cada uno de los tramos de la curva para algunos componentes químicos del aceite en los cultivares Arbequina y Manzanilla cultivados en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración (DDPF). Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). **126**

Tabla 18: Efecto de diferentes fuentes de variabilidad (ANAVA) (CC: ciclo de cultivo, A: ambiente, C: cultivar, EC: época de cosecha) y sus interacciones para algunos parámetros químicos analizados en frutos y aceites de las cultivares Arbequina y Manzanilla, cultivados en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. **134**

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCasa: Acetil-CoA carboxilasa
ACP: Proteína transportadora de acilos
AFLP: Polimorfismo de fragmentos amplificados
AG: ácidos grasos
AGMI: ácidos grasos monoinsaturados
AGPI: ácidos grasos poliinsaturados
AGS: Ácido graso sintetasa
ANAVA: Análisis de la Varianza
AOCS: American Oil Chemists' Society
Aprox.: aproximadamente
BHT: 2,6-diterbutil-4-metilfenol
°C: grados centígrados
°Cd: grados centígrados/día
bs: base seca
CC: Ciclo de cultivo
CCD: Cromatografía en capa delgada
CFT: Contenido de fenoles totales
CG: Cromatografía gaseosa
CG-EM: Cromatografía gaseosa-Espectrometría de masas
cm: centímetros
COI: Consejo Olivícola Internacional
cv: cultivar
DAGAT: Diacilglicerol aciltransferasa
DDPF: Días después de plena floración
Dpto: departamento
EDA: Ácido decarboximetil-elenólico
EEA: Estación Experimental
ETc: evapotranspiración del cultivo
ETo: evapotranspiración de referencia
FAA: Formaldehído + alcohol + agua+ ácido acético
FAB2: Δ^9-estearoil-ACP desaturasa
FID: Detector de ionización de llama
Fig.: Figura
g: gramos
G3PAT: Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
h: horas
ha: hectárea
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
IM: Índice de madurez
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
Kg: kilogramo
Km: Kilómetro
L: litro
LPAAT: Lisofosfatidato aciltransferasa
M: molar
m: metros
m^3: metros cúbicos
mg: miligramo

min: minutos
mL: mililitro
mm: milímetro
N: normal
n: número de réplicas
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ND: No detectado
nm: nanómetro
NO: Noroeste
NOA: Noroeste Argentino
p: nivel de significación
PAL: Fenilalanina amonio liasa
p-HPEA: p-dihidroxifeniletanol (tirosol)
ppm: partes por millón
PPO: Polifenol oxidasa
r: coeficiente de correlacion de Pearson
RAS: relación de adsorción de sodio
R^2: coeficiente de regresión lineal
REML: máxima verosimilitud restringida
SBS: según base seca
sd: sin dato
Tmd: Temperaturas medias
Tmin: Temperaturas mínimas
Tmax: Temperaturas máximas
Tmin md: Temperaturas medias mínimas
Tmax md: Temperaturas medias máximas
Tr: Valores traza
TTA: Tiempo térmico acumulado
UV: Ultravioleta
v/v: volumen en volumen
µ: micras
µL: microlitro
µm: micrómetro
3,4-DHPEA: 3,4- dihidroxifeniletano (hidroxitirosol)

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio de los patrones de crecimiento y la dinámica de la acumulación y composición del aceite durante el desarrollo y los primeros estadios de la maduración de los frutos en tres cultivares de olivo (Arbequina, Manzanilla y Arauco). En forma paralela se analiza el comportamiento en dos ambientes de cultivo localizados en zonas típicas de producción de Argentina.

La dinámica de acumulación de materia seca es afectada tanto por la tasa como por la duración del periodo de llenado de los frutos. En los cultivares Arbequina y Manzanilla la madurez fisiológica se alcanza al inicio del periodo de maduración; en el cv. Arauco se logra durante el envero. La biogénesis del aceite se registra desde fases muy tempranas del desarrollo de los frutos. La dinámica de síntesis sigue patrones similares en los tres cultivares. La sucesión temporal y la duración de los eventos que llevan a la formación de oleosomas en células del mesocarpo ocurren de manera semejante, observándose diferencias sólo en el tamaño final de los glóbulos de aceite. La evolución del contenido de ácido oleico presenta dos fases definidas. En la primera (de síntesis intensa), no se observan diferencias entre los cultivares en las tasas ni en la duración del periodo de acumulación. La máxima concentración (70 – 72 %) se logra con cargas térmicas similares (1450 – 1500 ºCd). Las diferencias entre cultivares en el contenido final de este ácido graso parecen estar determinadas por su tasa de conversión en ácido linoleico antes que por la declinación de su síntesis.

En los tres cultivares, las concentraciones máximas de sustancias fenólicas de los frutos se obtienen en fases anteriores a la maduración. Los cultivares Arbequina y Arauco presentan patrones de acumulación similares, con máximos al inicio y a la finalización de la fase de endurecimiento del endocarpo. En el cv. Manzanilla se observa una declinación prácticamente constante durante todo el periodo de desarrollo. Desde el punto de vista cualitativo, los estudios realizados en el cv. Arauco muestran que la disminución general del contenido de sustancias fenólicas ocurre como consecuencia del marcado descenso en la concentración de compuestos secoiridoides. La evolución del contenido de tocoferoles totales presenta tendencias similares en los tres cultivares: elevadas concentraciones en etapas tempranas del desarrollo, descenso pronunciado hasta la finalización de la fase de endurecimiento del endocarpo, reducción moderada hasta el comienzo de la maduración y valores prácticamente constantes luego de iniciada esta última. La evolución del contenido de escualeno registra una fase de síntesis intensa seguida de declinación pronunciada. Los aceites de los distintos cultivares difieren marcadamente en la concentración de este hidrocarburo, fundamentalmente como resultado de diferencias en las tasas de acumulación.

Los registros térmicos obtenidos durante el periodo primavero-estival, coincidente con las fases fenológicas de cuajado, crecimiento y maduración de los frutos, presentan escasas diferencias entre los dos sitios de cultivo evaluados (San Juan y Cruz del Eje – Córdoba). No obstante, los dos cultivares analizados (Arbequina y Manzanilla) muestran variaciones entre ambientes, principalmente en los patrones de síntesis y acumulación de materia seca, aceite y ácidos grasos mayoritarios. Estos hechos indicarían la concurrencia de otros factores ambientales como moduladores del desarrollo de los frutos, la acumulación de fotoasimilados, y la biogénesis y composición del aceite. Si se tienen en cuenta las concentraciones de aceite y de ácido oleico como parámetros clave en variedades cuyo destino principal es la oleicultura, los datos obtenidos ponen de relieve que el cv. Arbequina expresa su mayor potencial en el ambiente de cultivo de la provincia de San Juan. Los resultados muestran también mayores variaciones entre ambientes en el cv. Arbequina sugiriendo una menor plasticidad fenotípica en este cultivar respecto de Manzanilla.

SUMMARY

The present work was aimed to study the growth patterns and the dynamic of oil accumulation and composition during fruit development and early stages of fruit ripening in three olive cultivars (Arbequina, Manzanilla and Arauco). At the same time, the possible environmental influence is analyzed at two locations in typical olive production areas of Argentina.

The dynamics of dry matter accumulation is affected by both the rate and duration of fruit filling. In Arbequina and Manzanilla cultivars the physiological maturity is reached at the beginning of the ripening period; in cv. Arauco is achieved at onset of the turning colour stage. The oil biogenesis is recorded from very early stages of fruit development. The dynamic of oil accumulation follows similar patterns in all the cultivars analyzed, and only few changes are recorded at their maximum oil concentrations. The temporal succession and duration of events leading to the formation of oleosomes in mesocarp cells occur similarly in all cultivars. Only minor differences are observed in the final size of the oil droplets. The evolution of oleic acid presents two main phases. At the first one, no differences between cultivars are observed in both the rate and the duration of the synthesis period. The maximum oleic acid concentration (70 – 72 %) is achieved at similar thermal times (1450 - 1500 ºCd). The differences between cultivars in final oleic acid content seem to be determined by the rate of conversion into linoleic acid rather than by the decline of its synthesis.

In all olive cultivars, the maximum concentrations of fruit phenolics compounds are obtained at the earliest maturation stages. Arauco and Arbequina cultivars have similar patterns of phenolics accumulation, with peaks at the beginning and at the end of the endocarp hardening period. In cv. Manzanilla a practically constant decline is observed throughout the entire fruit development period. From a qualitative point of view, the studies done in cv. Arauco show that the overall decrease in the content of phenolic compounds occurs as a result of the marked decrease in the concentration of secoiridoids compounds. Regarding the evolution of total tocopherol content, all cultivars show similar trends: high concentrations at early stages of fruit development, strong drop until the end of pit hardening period, moderate decrease until the beginning of fruit ripening, and almost constant values during maturation. The dynamic of squalene accumulation show an active synthesis period followed by strong decrease. The oils of the different cultivars differ markedly in squalene concentration mainly as a result of differences in the accumulation rates.

Thermal records obtained during the spring-summer period (coinciding with the phenological phases of fruit setting, growth and ripening of the fruits) present few differences between the two cultivation sites evaluated (San Juan and Cruz del Eje - Córdoba). Nevertheless, the two cultivars tested (Arbequina and Manzanilla) show variations between environments, mainly in the patterns of synthesis and accumulation of dry matter, oil and main fatty acids. These facts could indicate the concurrence of other environmental factors as modulators of fruit development, accumulation of photo-assimilates, and oil biogenesis and composition. If oil and oleic acid concentrations are considered as key parameters in varieties mostly used for oleiculture purpose, the data obtained show that the cv. Arbequina express its greatest potential in the growing environment conditions of San Juan province. The results also show that this cultivar presents greater variations between environments that the cv. Manzanilla suggesting a lower phenotypic plasticity.

ANTECEDENTES GENERALES E INTRODUCCIÓN AL TEMA DE ESTUDIO

Taxonomía, distribución y cultivares de olivo

El olivo es un árbol perteneciente a la familia *Oleaceae* (Hoffmanns & Link) , la cual comprende 29 géneros y unas 600 especies de distribución cosmopolita. Presenta dos subfamilias: *Oleoideae* y *Jasminoideae.* El género *Olea* pertenece a la primera y abarca alrededor de 35 especies. Tanto los olivos cultivados como los silvestres (acebuches) se incluyen en la especie *O. europaea* L., siendo el olivo cultivado *O. europaea* L. subsp. *europaea* (*O. europaea* L. var. *sativa* Lehr.), y los acebuches, *O. europaea* L. subsp. *sylvestris* (Miller) Hagi (*O. europaea* L. subsp. *oleaster*). El olivo cultivado es la especie de mayor importancia económica de la familia y la única con fruto comestible (Rapoport, 2008).

El cultivo del olivo se originó en la región geográfica que va desde el sur del Cáucaso hasta las altiplanicies del Irán, Palestina y la zona costera de Siria, extendiéndose por Chipre hacia Anatolia y, a través de Creta, hacia Egipto, hasta poblar todos los países ribereños del Mediterráneo. Con la conquista de América, su cultivo se expandió por el nuevo mundo y, en la actualidad, se encuentra también en Sudáfrica, China, Japón y Australia (Civantos, 2008).

El hábitat del olivo se concentra entre las latitudes 30º y 45º, tanto en el hemisferio norte como en el sur, en regiones climáticas del tipo Mediterráneo, caracterizadas por un verano seco y caluroso. Cerca del 98 % de los olivos que existen en el mundo se sitúan en los países de la cuenca mediterránea; el 2 % restante se reparte entre unos pocos países del continente americano (principalmente Argentina), Asia oriental y Oceanía. La superficie agrícola destinada a su cultivo en todo el orbe es de aproximadamente 10 millones de hectáreas. A nivel mundial, la producción del olivar alcanza un promedio anual de 16 millones de toneladas de aceitunas, de las cuales aproximadamente el 90 % se destinan a la obtención de aceite, mientras que el 10 % restante se consumen elaboradas como aceitunas de mesa (Civantos, 2008).

La iteración de los procesos de selección de acebuches, difusión mediante reproducción vegetativa, hibridación con acebuches de nuevas zonas de implantación, selección y clonación, ha originado un elevado número de cultivares autóctonos en casi todas las zonas de cultivo (Barranco, 2008). De acuerdo a Bartolini et al. (1998), existen 1.200 cultivares con más de 3.000 denominaciones diferentes en Bancos de Germoplasma repartidos en 24 países; sin embargo, Lavee (1994) estima que el número de genotipos distintos sobrepasa los 2.000.

Argentina se encuentra situada geográficamente en una franja latitudinal propicia para el desarrollo del olivo lo que permite contar con las condiciones climáticas y edáficas adecuadas para el mismo. Merced a diferentes políticas de promoción y a la implementación de las leyes de diferimientos impositivos para emprendimientos industriales, agrícolas, ganaderos y turísticos (Leyes Nacionales de Promoción Agrícola 22.021, 22.702 y 22.975), el cultivo del olivo experimentó en los últimos años un crecimiento sostenido. A principios de la década del '90 nuestro país contaba con alrededor de 30.000 hectáreas implantadas, pero hacia fines de la década pasada había sobrepasado las 100.000 hectáreas.

En relación a la superficie comprometida con el cultivo, las principales provincias productoras son Catamarca (31000 ha), La Rioja (30000 ha), San Juan (20000 ha), Mendoza (19000 ha), Córdoba (5500 ha) y las provincias de Río Negro, Neuquén y Buenos Aires con pequeñas producciones (Searles et al., 2012). En cuanto a los volúmenes de producción, según cifras del Consejo Oleícola Internacional (COI), Argentina aporta el 5 % de la producción mundial de aceitunas de mesa y el 1 % de la producción de aceite de oliva.

Si bien el mapa de cultivares se fue modificando progresivamente mediante la introducción de nuevos genotipos, en general el panorama varietal en nuestro país continúa dominado por los cultivares Arbequina y Manzanilla (Figs. 1 y 2), ambas de origen español. La primera es una variedad típicamente aceitera y está casi siempre presente en las plantaciones cuando el perfil de la producción se orienta a la elaboración de aceites. Es muy apreciada por su precoz entrada en producción, elevada productividad, buen rendimiento y calidad del aceite, aunque éste presenta baja estabilidad (Torres et al., 2007; Uceda et al., 2008). Es considerada una variedad rústica ya sea por su resistencia al frío como por su tolerancia a la salinidad. Su vigor reducido permite su utilización en plantaciones intensivas (Barranco Navero et al., 2000). Los frutos son pequeños, elípticos, simétricos, ligeramente alargados. Los mismos se ubican en todo el largo de la rama fructífera, raramente de a uno; lo normal son dos o tres. La relación pulpa/hueso es media. La maduración del fruto es escalonada, alcanzando un color negro al final de la misma. En cuanto a enfermedades, se le atribuye cierta sensibilidad a la mosca del olivo y a la verticilosis. Resulta tolerante a la tuberculosis. Esta variedad ha sido multiplicada en Argentina fundamentalmente mediante propagación vegetativa lo que ha dado origen a un cultivo con una uniformidad genética relativamente alta en las diferentes fincas olivareras (Torres, 2006).

Manzanilla es el cultivar de olivo más difundido a nivel mundial. El Consejo Oleícola Internacional (COI) reconoce tres variedades de este cultivar: Manzanilla de Sevilla, la más difundida, Prieta y Cacereña, las tres de origen español (Barranco Navero et al., 2000). Se considera de doble aptitud, apreciado tanto para aceituna de mesa como para producción de aceite. Es poco vigoroso y se adapta fácilmente al cultivo en plantaciones intensivas. La época de floración y la entrada en producción son precoces, la productividad es elevada y alternante. La maduración de las drupas es precoz y éstas presentan elevada resistencia al desprendimiento (Barranco Navero et al., 2000). Por la calidad de su pulpa, los frutos de Manzanilla son muy valorados, tanto en verde como en negro, para aderezo. Si bien su contenido en aceite es medio, el mismo resulta de elevada calidad y estabilidad (Torres y Maestri, 2006; Uceda et al., 2008). Es un cultivar sensible a la verticilosis y a la tuberculosis.

El cv. Arauco (Fig. 3) es el único de origen argentino reconocido por el COI (IOOC, 2000). Su origen es incierto; probablemente se originó a partir de la selección de esquejes provenientes de España en tiempos coloniales. Presenta similitudes con los cultivares Azapa de Chile y Sevillana de Perú. Se considera un cultivar auto-estéril, de elevado vigor, porte abierto y alta densidad de copa. Su productividad es medio-alta pero con frecuencia alternada, debido probablemente a una inadecuada condición de cultivo. Los frutos son asimétricos, de peso elevado (valor medio 8.5 g), forma elíptica, con ápice apuntado y base truncada. En relación a su comportamiento agronómico, el cv. Arauco resulta tolerante a suelos áridos, salinos y calcáreos. Por el contrario, no posee una buena resistencia al frío y a la elevada humedad atmosférica, adaptándose bien a ambientes secos. Presenta baja tolerancia a las enfermedades más comunes del olivo: mosca del olivo (*Bractocera oleae*), repilo (*Cycloconium olaginum*), cochinilla gris (*Melanaspis paulista*), cochinilla negra (*Saissetia oleae*), tuberculosis (*Pseudomonas savastanoi*) y verticilosis (*Verticillum dahliae*). Por el contrario, su resistencia a *Gloeosporium olivarum*, causante del mal conocido como "aceituna jabonosa", es elevada (Torres et al., 2007).

Figura 1: Árbol, ramas fructíferas y frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración del cv. Arbequina.

Tomado de "Catálogo de las variedades de olivo de la provincia de Córdoba" (Torres et al., 2007).

Figura 2: Árbol, rama fructífera y frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración del cv. Manzanilla.

Tomado de "Catálogo de las variedades de olivo de la provincia de Córdoba" (Torres et al., 2007).

Figura 3: Árbol, ramas fructíferas y frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración del cv. Arauco.

Tomado de "Catálogo de las variedades de olivo de la provincia de Córdoba" (Torres et al., 2007).

Fructificación, fases de crecimiento y maduración del fruto del olivo

En un sentido amplio, la fructificación es el resultado de un conjunto de procesos fisiológicos secuenciales e interrelacionados, que se inician con la inducción floral y terminan con la maduración de los frutos. En un sentido más restrictivo, se define como el proceso de cuajado de la flor que resulta en la conversión del ovario en fruto (SECH, 1998).

Desde el punto de vista botánico el fruto del olivo es una drupa formada por tres tejidos principales: endocarpo (hueso o carozo), mesocarpo (pulpa o carne) y exocarpo (piel o capa externa). El conjunto de estos tres tejidos recibe el nombre de pericarpio y tiene su origen en la pared del ovario. El desarrollo de los tejidos del fruto tiene lugar mediante procesos de división, expansión y diferenciación celular, a partir de la fecundación y el cuajado inicial. El endocarpo es la parte leñosa de la oliva y contiene la semilla. Comienza a crecer a partir de la fecundación y aumenta de tamaño los dos meses siguientes. En el estado maduro el endocarpo está totalmente compuesto por células esclerificadas, las cuales deben su dureza a la deposición de una doble pared secundaria con alto contenido en lignina. El mesocarpo es un tejido carnoso que comienza a desarrollarse a partir de la fecundación y que sigue creciendo hasta la maduración. Sus células son parenquimáticas, poco diferenciadas, pero con una gran capacidad de crecimiento. Desde el interior al exterior del mesocarpo existe un creciente aumento del tamaño celular (Hammami et al., 2011). El almacenamiento de aceite se realiza en las vacuolas de las células parenquimáticas del mesocarpo. El exocarpo o epicarpo es la capa exterior y más delgada del fruto. Este tejido está compuesto por la epidermis y su cutícula, que es fina cuando el ovario se encuentra todavía protegido por los pétalos, pero rápidamente se desarrolla para formar una gruesa capa protectora. Cuando la oliva está completamente desarrollada, la pulpa representa un 70 - 90 %, el hueso un 9 – 27 % y la semilla un 2 – 3 % del peso total del fruto. La composición de este último varía en función del cultivar, y dentro de un mismo cultivar en función de su estado de desarrollo y maduración (Beltrán et al., 2008). Los componentes mayoritarios de la pulpa y de la semilla son el agua y el aceite, le siguen en importancia los azúcares y polisacáridos. En la pulpa, los azúcares más importantes son los reductores destacando la glucosa, seguida de fructosa y sacarosa. Entre los polisacáridos se encuentran fundamentalmente celulosa, lignina y hemicelulosa. La pulpa es también abundante en compuestos fenólicos.

El crecimiento del fruto del olivo sigue una curva sigmoidal doble, característica de las drupas (Lavee, 1986; Rallo y Cuevas, 2008), con cuatro estadios o fases diferentes. Los límites entre las fases varían de acuerdo al genotipo, carga y estado nutritivo del árbol, y condiciones ambientales y de cultivo. En algunos casos, la delimitación de las fases es poco evidente (Lavee, 1986).

En la primera fase, el endocarpo ocupa la mayor parte del volumen del fruto, y la semilla está constituida principalmente por el endospermo (Lavee, 1986). El aumento de tamaño del fruto se debe tanto a la intensa división celular como a la expansión de las células, siendo la primera el principal componente del aumento de tamaño en los primeros estadios del crecimiento (Rallo y Cuevas, 2008). De acuerdo a Manrique et al. (1999), a partir de la octava semana del desarrollo, el principal aporte al crecimiento se debe al aumento en el tamaño celular.

La segunda fase comprende el endurecimiento del endocarpo y coincide con una ralentización del crecimiento del fruto. Manrique (1997) ha observado que dicha ralentización puede estar fuertemente condicionada por el ambiente, en particular por el déficit hídrico, ya que esta fase se aprecia claramente en frutos de árboles en secano, mientras que en regadío no se presenta o lo hace de manera muy atenuada. El endurecimiento del hueso se inicia tras la antesis, encontrándose dispersas las células lignificadas. Entre 4 y 6 semanas luego de la plena floración se produce la esclerificación masiva de las células (Lavee, 1986). El endocarpo finaliza su crecimiento y expansión aproximadamente 2 meses después de la plena floración (Manrique, 1997; Rapoport, 2008). En esta fase tienen lugar los procesos que ajustan la carga frutal actual del árbol (finaliza la abscisión de frutos en cuajado) e influyen en la carga potencial del año siguiente.

El crecimiento del mesocarpo con el consiguiente aumento del tamaño del fruto define la tercera etapa del desarrollo. Este incremento se debe principalmente a expansión celular, y es en esta fase donde tiene lugar la acumulación de aceite en vacuolas de las células parenquimáticas de la pulpa (Uceda et al., 2008). Al final de la misma, el fruto alcanza su tamaño real y ocurre el enverado o cambio de color de la epidermis que marca el comienzo del periodo de maduración. El tamaño final del fruto es una característica varietal determinada por el número de células, el tamaño de las mismas y el volumen de los espacios intercelulares. En un cultivar determinado el tamaño del fruto puede variar notablemente entre años y entre distintos árboles fundamentalmente en función de la carga

de los mismos y de la disponibilidad de agua durante el crecimiento (Rallo y Cuevas, 2008). Una vez que la pulpa alcanza el tamaño definitivo, el fruto puede presentar oscilaciones en su peso como consecuencia de fluctuaciones en su contenido de humedad.

Al inicio de la maduración, los frutos sufren los primeros cambios en su pigmentación, el embrión alcanza la madurez y presenta la tasa germinativa más alta (Lavee, 1986). Posteriormente, el crecimiento del fruto y la acumulación de aceite se reducen de manera notable. La maduración involucra una compleja combinación de cambios bioquímico-fisiológicos. Su duración es variable siendo afectada por las condiciones agro-ecológicas y las características varietales. Los cambios más importantes en la pigmentación de los frutos son los debidos a la reducción del contenido de clorofila y el incremento de la síntesis de antocianinas (Lavee, 1986). La concentración de estas últimas determina la intensidad del color, que puede ir del rojizo al violáceo intenso o negro-violáceo. En la mayor parte de los cultivares, el cambio de coloración de la epidermis se inicia en el ápice (inicio del envero) y continúa hacia el extremo opuesto, junto al pedúnculo (final del envero). Posteriormente, comienza a colorearse el mesocarpo, desde la parte externa hacia el interior, junto al hueso.

El periodo de crecimiento y el tamaño final de los frutos muestran una considerable influencia genética. Aunque se asume que las pautas de crecimiento mencionadas son de ocurrencia general, existen evidencias que indican que la tasa de los procesos de división y expansión celular pueden experimentar variaciones en los distintos cultivares de olivo (Rallo y Rapoport, 2001). Sin embargo, la oportunidad y duración del periodo de división celular intensa no parecen diferir entre genotipos; la mayor parte de las células se forman durante los dos meses posteriores a la floración (Hammami et al., 2011). Estos autores sostienen asimismo que el proceso de expansión celular contribuye marcadamente al tamaño final del fruto; no obstante, los distintos genotipos presentan escasas diferencias en el tamaño de sus células a lo largo de todo el periodo de crecimiento y desarrollo de los frutos.

De acuerdo a Cimato et al. (1990), los modelos fenológicos de crecimiento, maduración y productividad presentan diferencias tanto entre cultivares como entre zonas de cultivo, modificando la dinámica de maduración de los frutos y, por lo tanto, la época óptima de recolección.

En plantaciones intensivas del cv. Arbequina, bajo condiciones de riego no deficitario (100 % de la evapotranspiración del cultivo), se ha observado que la carga frutal afecta el tamaño de los frutos principalmente por su efecto sobre la tasa de llenado. Por el contrario, la carga frutal no tiene efecto significativo sobre la duración del periodo de crecimiento ni sobre la dinámica de acumulación de agua y aceite en los frutos (Trentacoste et al., 2010).

En un estudio sobre diez cultivares bajo condiciones de manejo tradicional en Mendoza, tanto la tasa como la duración del periodo de llenado de los frutos presentaron diferencias significativas entre genotipos. La duración del periodo de acumulación fue el factor más influyente sobre la concentración de aceite en el fruto. Variaciones interanuales en la carga frutal no tuvieron mayor efecto sobre este último parámetro (Trentacoste et al., 2012). Estos resultados contrastan con estudios realizados en seis variedades cultivadas en distintos ambientes de La Rioja (Rondanini et al., 2014) donde se ha encontrado que la máxima acumulación de peso seco se correlaciona fuertemente con la tasa de crecimiento de los frutos, pero resulta independiente del periodo de duración. De manera similar, la concentración máxima de aceite se relaciona positivamente con su tasa de acumulación pero no es afectada significativamente por la duración del periodo de síntesis.

La variación del color de los frutos es un parámetro frecuentemente utilizado para definir la época de cosecha. Para aquellos cultivares cuya finalidad es la producción de aceite, el periodo óptimo para la cosecha de los frutos debería coincidir con el momento en el cual éstos poseen la máxima concentración de aceite y el mismo resulta de la mejor calidad. Para determinar esta última podrían seguirse estrictamente los parámetros de calidad establecidos por el COI, aunque es deseable tener en cuenta también otros criterios, sobre todo aquellos (como el contenido de polifenoles u otras sustancias antioxidantes) que contribuyen a la estabilidad y cualidades sensoriales del aceite.

Algunas evidencias demuestran que en distintos cultivares de olivo el peso máximo de los frutos y la máxima acumulación de aceite se logran en diferentes estadios de la maduración (Beltrán et al., 2008). Éstos, a su vez, pueden alcanzarse en distintos tiempos dependiendo de la carga frutal. En general se observa una relación inversa entre ésta y la tasa de maduración (Tognetti et al., 2006; Gucci et al., 2007; Trentacoste et al., 2010; Martín-Vertedor et al., 2011; Pierantozzi et al., 2014). En cualquier caso, la síntesis de aceite no parece ser afectada por la carga frutal siendo el contenido graso del fruto determinado por la proporción de mesocarpo presente en el mismo (Lavee y Wodner, 2004).

Biogénesis, acumulación y composición del aceite

En el fruto del olivo, la mayor proporción de lípidos de reserva (principalmente triglicéridos) se acumula en células del mesocarpo las cuales tienen la capacidad de metabolizar foto-asimilados fijados tanto en cloroplastos de las hojas como de los propios frutos (Salas et al., 2000; Hernández et al., 2009). La biogénesis del aceite tiene lugar durante casi todo el periodo de crecimiento y desarrollo del fruto, el cual involucra un proceso de larga duración (4 a 5 meses). Las particularidades mencionadas suponen un sistema complejo sujeto a sustanciales variaciones estacionales de temperatura y otras variables ambientales.

La formación de lípidos de almacenamiento involucra la síntesis *de novo* de ácidos grasos y su posterior incorporación a unidades de glicerol-3-fosfato mediante una serie de reacciones mediadas enzimáticamente (Fig. 4).

La síntesis *de novo* de los ácidos grasos es un proceso que tiene lugar en los plastidios y necesita la actividad conjunta de dos enzimas, acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) y el sistema enzimático ácido graso sintetasa (AGS). La primera cataliza la condensación, con consumo de ATP, de una molécula de bicarbonato y otra de acetil-CoA para producir malonil-CoA. Antes de entrar en la ruta de síntesis, el grupo malonil es transferido de la CoA a un factor proteico (ACP, proteína transportadora de acilos) por la enzima malonil transacilasa.

El proceso enzimático que cataliza la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH, culmina con la formación de palmitoil-ACP el cual puede ser elongado a estearoil-ACP en un ciclo posterior, de manera que el producto final del complejo multi-enzimático ácido graso sintetasa es casi siempre una mezcla de palmitato y estearato. La relación entre ellos está directamente relacionada con el grado de insaturación del producto oleoso final ya que el palmitato es el ácido graso saturado más abundante del aceite de oliva y los ácidos grasos de dieciocho átomos de carbono son prácticamente en su totalidad insaturados.

Los ácidos grasos insaturados se forman a partir de los ácidos palmítico y esteárico. Una de las enzimas clave en estas transformaciones es la Δ^9-estearoil-ACP desaturasa (FAB2), comúnmente conocida como Δ^9-desaturasa, la cual cataliza la transformación del ácido esteárico (saturado, C18:0) en oleico (monoinsaturado, C18:1$^{\Delta 9}$) mediante la remoción

de átomos de hidrógeno de las posiciones 9/10 de la cadena hidrocarbonada y la consiguiente introducción de un doble enlace (Shanklin y Somerville, 1991; Thompson et al., 1991). La importancia de esta enzima puede deducirse de la elevada concentración de ácido oleico en el aceite de oliva. Desaturaciones posteriores del ácido oleico para producir ácidos grasos poli-insaturados pueden tener lugar en el plastidio o en el retículo endoplásmico. En muchas plantas, incluyendo el olivo, la desaturación del oleato conlleva su transporte fuera del plastidio hacia el citosol. Las cadenas acílicas de oleato pueden ser desaturadas a linoleato y después a α-linolenato mediante Δ^{12} y Δ^{15}-desaturasas (Salas et al., 2000).

El proceso de elongación y desaturación de los ácidos grasos termina con la liberación de los grupos acilo de las proteínas transportadoras de acilos, mediante la acción de tioesterasas presentes en los plastidios o con su transferencia a lípidos complejos mediante aciltransferasas.

El acoplamiento de las unidades de acil-CoA a unidades de glicerol-3-fosfato tiene lugar en el retículo endoplásmico y se conoce como la ruta de Kennedy ("Kennedy pathway") (Fig. 4). La actividad y las especificidades de las enzimas (aciltransferasas) que intervienen respecto de la posición que esterifican y del ácido graso que incorporan preferentemente determinan la composición de los glicéridos parciales y, finalmente, la composición general y la tasa de acumulación del aceite. En algunos estudios realizados en semillas y frutos oleaginosos (Eccleston y Harwood, 1995; Chen et al., 2011) se ha observado que la primer enzima (glicerol-3-fosfato aciltransferasa) que participa en la secuencia de reacciones que llevan a la formación de triglicéridos muestra a menudo preferencia por palmitoil-CoA, pero también puede aceptar oleil-CoA, especialmente si éste está presente en concentraciones elevadas. La segunda aciltransferasa (lisofosfatidato aciltransferasa) presenta fuerte selectividad por oleil-CoA y es inactiva frente a acil-CoAs de ácidos grasos saturados. La última fase en la biosíntesis de triglicéridos, es decir, el acoplamiento de una unidad de diacilglicerol con una de acil-CoA, es catalizada por la diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT) la cual muestra una baja especificidad con respecto al ácido graso que esterifica.

La acumulación de aceite en la oliva tiene lugar en forma concomitante al ensanchamiento de las células del mesocarpo. Se segregan pequeñas gotas de aceite en los extremos del retículo endoplasmático que se fusionan seguidamente para formar gotas de mayor volumen (Rangel et al., 1997; Matteucci et al., 2011). La tasa de acumulación de

aceite durante el desarrollo del mesocarpo del fruto del olivo se adapta generalmente a una curva de tipo sigmoide con tres fases más o menos definidas. La primera fase, de acumulación lenta, caracteriza a los frutos recién formados y tiene lugar hasta el endurecimiento del endocarpo. En la segunda, de acumulación rápida, la cantidad de aceite aumenta linealmente. Esta fase es de duración variable y durante la misma tiene lugar una síntesis activa de diglicéridos y triglicéridos. Hacia el final de misma ocurren los primeros cambios de coloración de la epidermis que marcan el inicio de la maduración. La tercera fase coincide con una ralentización progresiva y finalmente la paralización de la síntesis lipídica. Esta fase estacionaria abarca unas cuatro semanas y precede al fenómeno de sobre-maduración de la oliva (Lavee y Wodner, 1991).

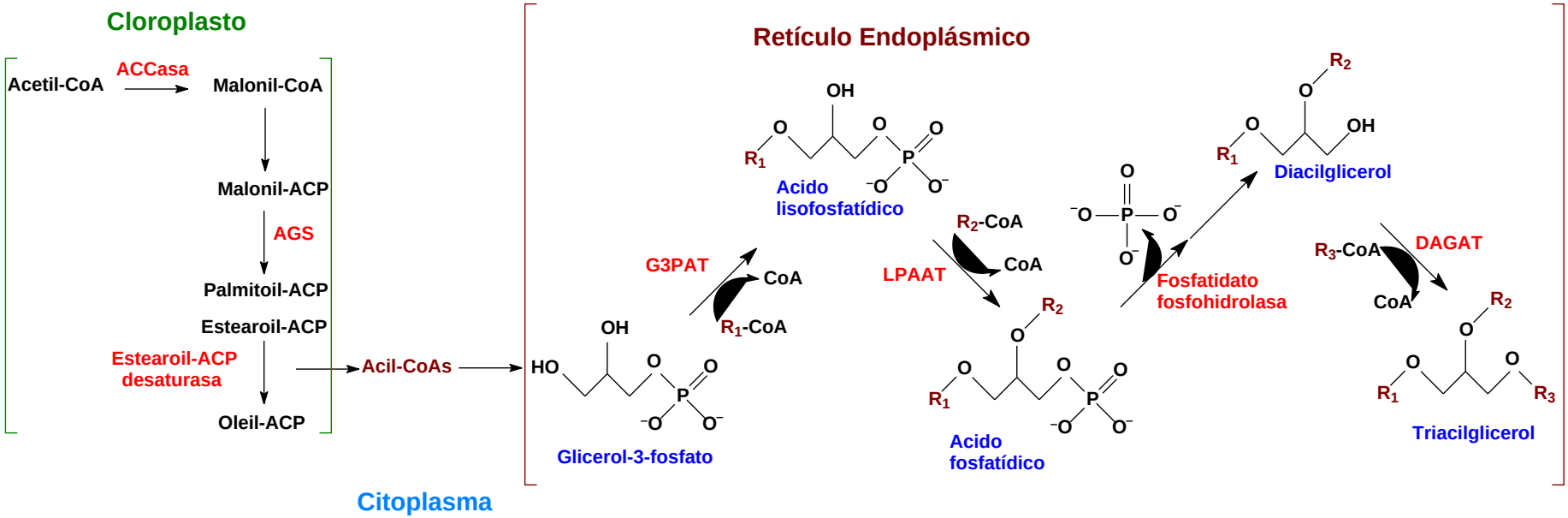
Aunque la acumulación y composición de glicéridos parecen ocurrir según las pautas generales mencionadas anteriormente, las variaciones en la composición y el contenido de ácidos grasos durante el desarrollo y la maduración del fruto del olivo, no siempre siguen un patrón determinado y muestran una considerable influencia varietal y climática (Damak et al., 2008; Lazzez et al., 2008; Mailer, et al., 2010; Menz y Vriesekoop, 2010; Dag, et al., 2011; Di Vaio et al., 2012; Rondanini et al., 2014).

A la madurez del fruto, los triacilglicéridos constituyen aproximadamente el 98 % del aceite. El ácido oleico (*cis*-9-octadecenoico) representa hasta el 83 % del total de ácidos grasos; los ácidos palmítico (hexadecanoico) y linoleico (*cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico) están presentes en cantidades que varían entre 10 – 20 % y 2.5 – 20 %, respectivamente. Los ácidos palmitoleico (*cis*-9-hexadecenoico), esteárico (octadecanoico) y linolénico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15-octadecatrienoico) se encuentran en bajas concentraciones (< 3,5 %).

La mayor parte de los estudios sobre composición de ácidos grasos del aceite de oliva se ha focalizado en las variaciones que experimenta la misma durante el periodo de maduración del fruto (Salvador et. al 2001; Beltrán et al., 2004; Matos et. al 2007; Damak et. al 2008; Goméz-González et al., 2011; De la Rosa et al., 2013; Rondanini et al., 2014). Beltrán et al. (2004) estudiaron la composición del aceite del cv. Picual en tres años sucesivos; encontraron reducciones en el contenido de ácidos grasos saturados e incrementos en los ácidos oleico y linoleico con el avance de la maduración y determinaron que, además de la influencia estacional, el año de cultivo ejerce un efecto marcado sobre las concentraciones de estos ácidos grasos. Por el contrario, Salvador et al. (2001) han observado una correlación negativa entre el índice de madurez y el contenido de ácido

oleico durante la maduración de los frutos del cv. Cornicabra. Baccouri et al. (2008) han informado asimismo que en los cultivares Chétoui y Chemlali se produce una disminución en el contenido de ácido oleico y un incremento del ácido linoleico a medida que avanza la madurez de los frutos. En ese mismo sentido, Youssef et al. (2009) y Dag et al. (2014) informaron reducciones significativas en la relación ácidos grasos mono-insaturados/ácidos grasos poli-insaturados (AGMI/AGPI) de aceites procedentes de los cultivares Chétoui y Barnea, en función del incremento del índice de madurez. A su vez, Uceda et al. (2008) sostienen que, independientemente del cultivar y una vez finalizada la lipogénesis, la maduración conlleva una disminución del contenido en ácido palmítico y aumento del ácido linoleico, manteniéndose constante la proporción de ácido oleico. Sakouhi et al. (2011[a]) han observado en cambio que las variaciones más importantes en la composición de ácidos grasos en el cv. Sayali ocurren durante el desarrollo de los frutos, en tanto pequeñas modificaciones se registran durante la maduración. Por otra parte, en un estudio realizado durante cinco años sobre treinta cultivares de olivo, Uceda et al. (2008) determinaron que el genotipo es el principal responsable de la variación en la concentración de los ácidos grasos mayoritarios del aceite; las diferencias entre años de cultivo y estadios de maduración del fruto resultaron de menor significación. Un estudio reciente (Rondanini et al., 2014) ha evaluado el comportamiento de seis cultivares de olivo en distintos ambientes de la provincia de La Rioja. Se ha observado que durante el desarrollo del fruto el contenido de ácido oleico disminuye marcadamente, con tasas de cambio y periodo de inicio de la fase de reducción que varían según el cultivar. Como resultado de dichas reducciones, en los cvs. Arbequina y Arauco el contenido de ácido oleico cae a valores por debajo del 50 %.

Figura 4: Esquema simplificado de la biosíntesis de triacilglicéridos en células vegetales.



Referencias: ACCasa, acetil-coenzima A carboxilasa; AGS, ácido graso sintetasa; ACP, proteína transportadora de acilo ("acil carrier protein"); G3PAT, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; LPAAT, lisofosfatidato aciltransferasa; DAGAT, diacilglicerol aciltransferasa; R_1, R_2 y R_3 representan grupos acilo de diferentes ácidos grasos.

Los antecedentes reseñados en el párrafo anterior, sugieren que la tasa de acumulación y la composición de ácidos grasos no guardan una relación unívoca con el grado de maduración de los frutos encontrándose variaciones más o menos marcadas entre los distintos cultivares de olivo.

Si bien parece claro que la composición de ácidos grasos es una característica regulada genéticamente, existen también evidencias del efecto modulador del ambiente sobre su síntesis. La incidencia del medio agro-ecológico resulta particularmente notable en los llamados cultivares "poco plásticos", tal como Arbequina (Tous y Romero, 1994), donde la composición de ácidos grasos puede variar notablemente en función de la latitud y las condiciones climáticas donde se desarrolla el cultivo (Uceda et al., 2008; Torres et al., 2009; Ceci y Carelli, 2007; Rondanini et al., 2011). Una dificultad a la que se enfrenta la producción nacional de aceites de oliva (el bajo contenido de ácido oleico, principalmente la de aquellos aceites provenientes de la región noroeste del país) puede guardar relación con dicho efecto. En particular, se ha observado que los aceites obtenidos del cv. Arbequina presentan menores contenidos de ácido oleico con respecto a los producidos en países de la cuenca Mediterránea a partir de este mismo cultivar.

En relación a lo mencionado en el párrafo anterior, Torres et al. (2009) han observado, mediante el empleo de marcadores moleculares de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), una elevada similitud genética del cv. Arbequina en la provincia de Córdoba con un patrón de "Arbequina Internacional". No obstante el bajo nivel de polimorfismos detectado, estos autores encontraron asimismo marcadas variaciones en la composición de ácidos grasos entre los aceites obtenidos en Argentina con respecto a los procedentes de la misma variedad cultivada en España.

En la región Noroeste y centro de Argentina el régimen de temperatura del aire a lo largo del año es diferente respecto de la región Mediterránea, siendo las temperaturas de invierno y primavera sustancialmente mayores. Esta situación trae aparejada un adelanto en la fenología del cultivo; la fase de acumulación de aceite tiene lugar principalmente en el verano con temperaturas medias más elevadas que aquellas registradas en las regiones de cultivo del hemisferio norte.

En nuestro país, las posibles variaciones que puede experimentar la composición del aceite de cultivares de olivo en función de ambientes que presentan diferencias en sus características agro-climáticas han sido poco exploradas. Estudios recientes realizados en cultivos de olivo de la región noroeste de Argentina se han focalizado en la evaluación del efecto de la temperatura sobre la tasa de acumulación de aceite y la composición de ácidos grasos en diferentes cultivares. Rondanini et al. (2011) encontraron una interacción significativa genotipo x ambiente para el contenido de ácido oleico en variedades de olivo cultivadas en la provincia de La Rioja. Posteriormente estos mismos autores (Rondanini et al., 2014) demostraron una correlación negativa en algunos cultivares entre la temperatura durante el periodo de síntesis del aceite y la concentración de este último a la madurez de los frutos. También observaron una disminución lineal del contenido de ácido oleico cuando el mismo fue modelado en función del tiempo térmico durante la síntesis y acumulación del aceite. En experimentos realizados a campo bajo condiciones controladas de temperatura, García-Inza et al. (2014) demostraron asimismo que las altas temperaturas durante la fase de lipogénesis pueden afectar negativamente el rendimiento y la composición del aceite del cv. Arauco. En este mismo sentido, Lombardo et al. (2008), Zarrouk et al. (2009) y Dag et al. (2014) han informado reducciones significativas de la relación AGMI/AGPI en variedades cultivadas en regiones cálidas o durante ciclos de cultivo con temperaturas medias más elevadas.

Componentes menores del aceite

Fracción fenólica

En los últimos años se ha generado un gran interés por los compuestos fenólicos del olivo. Prueba de ello es la aparición de numerosos trabajos científicos y revisiones bibliográficas dedicadas a diferentes aspectos de estos compuestos (Owen et al., 2000; Soler et al., 2000; Fabiani et al., 2002; Ryan et. al 2002; Servili et al., 2004, 2009, 2011). Las sustancias fenólicas presentes en el olivo son reconocidas por su actividad antimicrobiana (Aziz et al., 1998; Cicerale et al., 2012), por su papel preventivo en algunas patologías como el cáncer y la arterioesclerosis (Visioli y Galli 1998; Fabiani et al., 2002; Lou-Bonafonte et al., 2012), por sus propiedades antioxidantes y su relación con la estabilidad oxidativa de los aceites (Baldioli et al., 1996; Caponio et. al 2001; Visioli et al., 2002; Rotondi et. al 2004; Vissers et al., 2004; Olmedo et al., 2009), entre otros aspectos.

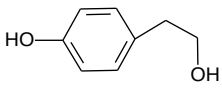
Los compuestos fenólicos son considerados una parte importante del sistema químico de defensa del fruto del olivo. Los flavonoides, por su parte, desempeñan una función relevante en la prevención *in vivo* del daño oxidativo (Galli y Visioli, 1999), al limitar, en virtud de su espectro de absorción, los efectos deletéreos de las radiaciones UV.

El fruto del olivo contiene diferentes clases de compuestos fenólicos (Fig. 5). Los mismos comprenden alcoholes fenólicos (*p*-hidroxifeniletanol - *p*-HPEA - o tirosol, y 3,4-dihidroxifeniletanol - 3,4-DHPEA o hidroxitirosol), ácidos fenólicos (cafeico, vainíllico, ferúlico, sinápico, p-cumárico, hidroxicinámico, entre otros), flavonoides (principalmente luteolina, apigenina y derivados), lignanos (principalmente 1-pinoresinol y 1-acetoxypinoresinol) y secoiridoides. De los compuestos derivados del ácido hidroxicinámico, el verbascósido (un éster heterosídico del ácido cafeico y el hidroxitirosol) es el más importante.

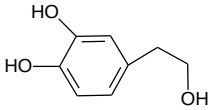
Los secoiridoides son los componentes más abundantes e incluyen a la oleuropeína (un éster heterosídico del ácido elenólico y el hidroxitirosol), y la forma dialdehídica del ácido decarboximetil-elenólico unida al 3,4-DHPEA o al p-HPEA (3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA, respectivamente).

Figura 5: Algunos compuestos fenólicos identificados en el fruto del olivo.

Alcoholes fenólicos

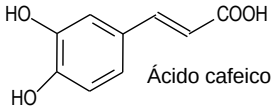


Tirosol

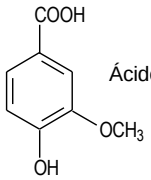


Hidroxitirosol

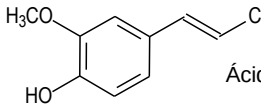
Ácidos fenólicos



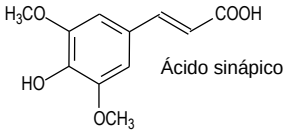
Ácido cafeico



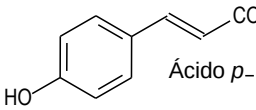
Ácido vainíllico



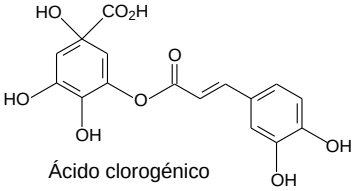
Ácido ferúlico



Ácido sinápico

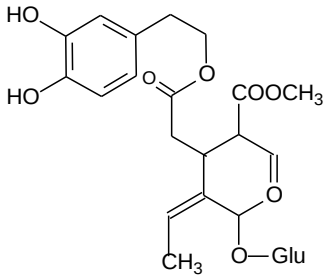


Ácido *p*–cumárico



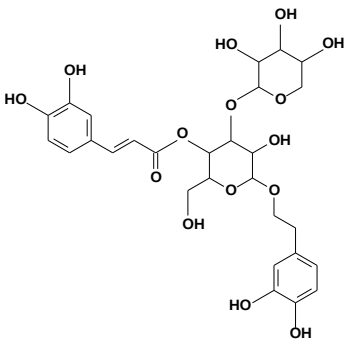
Ácido clorogénico

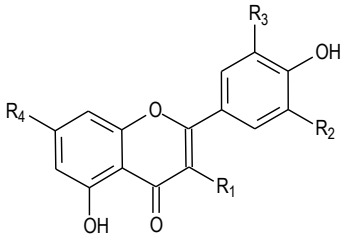
Compuestos secoiridoides



Oleuropeína

Verbascósido





Flavonoides	**R_1**	**R_2**	**R_3**	**R_4**
Apigenina	H	H	H	OH
Apigenina-7-O-glucósido	H	H	H	Glucosa
Luteolina	H	H	OH	OH
Luteolina-7-O-glucósido	H	H	OH	Glucosa
Rutina	*o*-Rutinósido	H	OH	OH

Respecto a la pigmentación de los frutos durante la maduración, la adquisición del color es debida en gran medida a la formación de antocianinas (un tipo de flavonoides glicosidados). Por otra parte, determinados atributos sensoriales del fruto y de los aceites de oliva vírgenes, como el amargor y el picor, están asociados a la presencia de compuestos fenólicos. El principio amargo más importante es la oleuropeína, en su forma glicosilada. La oleuropeína aglicona probablemente es también amarga, mientras que los otros dos productos de degradación, el ácido elenólico y el hidroxitirosol, son juzgados como no amargos (Angerosa et al., 2000).

Durante la extracción del aceite de oliva virgen, los componentes fenólicos del fruto son transferidos, al menos en parte, al aceite. Dicha transferencia está en función, en gran medida, de la concentración y del balance hidrofílico/lipofílico de los compuestos presentes y es afectada por las condiciones empleadas para la obtención del aceite (Lavelli y Bondesan, 2005; Uceda et al., 2008; Taticchi et al., 2013).

La presencia de compuestos fenólicos confiere al aceite de oliva una particular resistencia al desarrollo de rancidez. Numerosos autores han puesto en evidencia la relación entre el contenido de compuestos fenólicos del aceite y su estabilidad frente a la oxidación (Owen et al., 2000; Morelló et al., 2004; Bendini et al., 2006; Baccouri et al., 2008; Baiano et al., 2009; Cioffi et al., 2010; Ziogas et.al., 2010; Torres et al., 2011; Servili et al., 2014).

La composición cuali y cuantitativa de la fracción fenólica del fruto del olivo es altamente variable, siendo afectada notablemente por el cultivar, el estado de desarrollo y maduración del fruto y el ambiente de cultivo, en particular la condición hídrica (Morelló et al., 2005; Baccouri et al., 2008; Dabbou et al., 2011; Gutiérrez-Rosales et al., 2012; Jiménez et al., 2013).

La influencia del genotipo se hace evidente en las notables diferencias cuantitativas que existen en el contenido de polifenoles totales de los aceites de distintos cultivares el cual abarca un rango comprendido entre 100 y 1200 mg/kg (Uceda et al., 2008). Sin embargo, el factor genético es fuertemente influenciado por el ambiente. Algunas observaciones han permitido determinar que los aceites provenientes de la misma variedad cultivada en distintas áreas geográficas presentan características significativamente diferentes respecto a la concentración de compuestos fenólicos mostrando que la tipicidad

de los aceites está definida también por la zona de producción (Vihna et al., 2005; Tura et al., 2007).

En relación a la evolución de la composición de sustancias fenólicas durante la ontogenia del fruto, la mayor parte de los trabajos se han focalizado en las variaciones que tienen lugar durante la maduración. En general, se ha observado una disminución del contenido de polifenoles totales conforme avanza la madurez (Gutiérrez et al., 1999; Caponio et al., 2001; Briante et al., 2002; Ryan et al., 2003; Bonoli et al., 2004; Morelló et al., 2004; Baccouri et al., 2008; Jiménez et al., 2013). Sin embargo, se debe recordar el incremento que experimentan algunos flavonoides, específicamente las antocianinas, a partir del envero (Lavee, 1986).

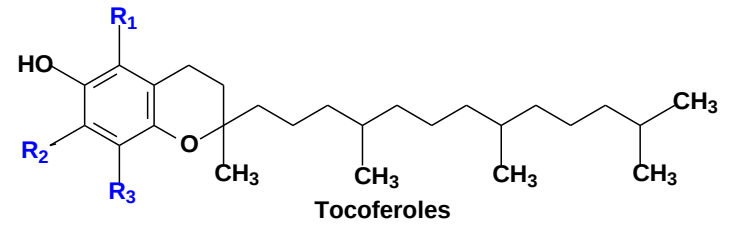
Vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles)

Esta vitamina liposoluble se encuentra en la naturaleza como una serie de tocoferoles y tocotrienoles. Aunque poseen un anillo fenólico, no se consideran dentro de este grupo de compuestos fundamentalmente porque provienen de diferentes precursores biosintéticos. La vitamina E está constituida por una estructura de cromano provisto de una cadena lateral isoprenoide de 16 átomos de carbono, saturada (tocoferoles) o insaturada (tocotrienoles). Dependiendo del número y de la posición de los grupos metilo en el anillo aromático, los compuestos resultantes se conocen con la denominación alfa, beta, gama y delta (Fig. 6).

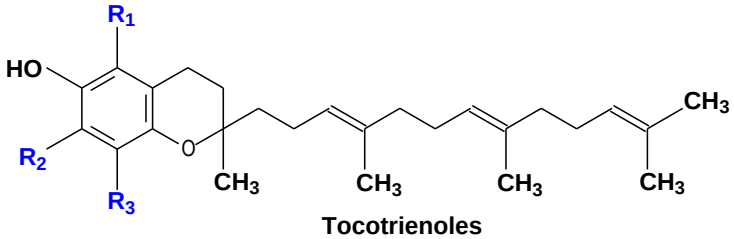
A pesar de su concentración relativamente baja, los tocoferoles tienen importancia desde el punto de vista del valor biológico y de la conservación del aceite de oliva. En el mismo, la forma más abundante es el α-tocoferol, representando aproximadamente el 90 - 95 % del total de tocoferoles. Las formas β y γ se encuentran por debajo del 10 % y la forma δ en proporciones muy bajas. Algunos autores, incluso, afirman que el δ-tocoferol no está presente en el aceite de oliva (Dionisi et al., 1995; Rovellini et al., 1997).

La concentración de tocoferoles totales en aceites de oliva vírgenes es altamente variable (150 - 450 mg/kg) y depende marcadamente del genotipo (Uceda et al., 2008). Muzzalupo et al. (2011) han encontrado contenidos superiores a 600 mg/kg en aceites de algunos cultivares de origen italiano.

Figura 6: Estructura de tocoferoles y tocotrienoles



Tocoferoles



Tocotrienoles

Posición del grupo metilo (CH_3) sobre el anillo aromático	Tocoferoles	Tocotrienoles
R_1, R_2, R_3	α-tocoferol	α-tocotrienol
R_1, R_3	β-tocoferol	β-tocotrienol
R_2, R_3	γ-tocoferol	γ-tocotrienol
R_3	δ-tocoferol	δ-tocotrienol

En el aceite de oliva no se han detectado tocotrienoles, a excepción de las referencias de Agramont et al. (1986) quienes informan la presencia de β y γ-tocotrienol en aceites de variedades españolas cultivadas en Tarragona, y de Cunha et al. (2006) quienes dan cuenta de la presencia de α y γ-tocotrienol en aceites de oliva de Portugal.

En términos generales, el contenido de α-tocoferol en aceites de oliva obtenidos a escala laboratorio varía entre 100 y 300 mg/kg, aunque se pueden encontrar aceites de ciertos cultivares con niveles superiores a 350 mg/kg (Beltrán et al., 2005; 2010; Lavelli y Bondesan, 2005; Tura et al., 2007). En aceites comerciales, estos niveles son más bajos (Psomiadou et al., 2000). Estos últimos autores analizaron el contenido en α-tocoferol de 90 aceites de oliva vírgenes de diferentes cultivares y regiones de Grecia durante tres campañas consecutivas, estableciendo valores extremos de 98 y 370 mg/kg, con un 60 %

de las muestras con cantidades superiores a 200 mg/kg de α-tocoferol. Algunos estudios realizados en España han mostrado una concentración media de 230 mg/kg de α-tocoferol en aceites del cv. Arbequina (Jiménez y Uceda, 1995). Los aceites de los cultivares Hojiblanca y Picual presentan contenidos medios de α, γ y β-tocoferol de 187; 1,5 y 11 mg/kg, y 208; 1,5 y 15 mg/kg, respectivamente (Aparicio et al., 1999). En aceites del cv. Cornicabra, en tanto, la concentración de α-tocoferol se encuentra en el rango 55 - 234 mg/kg, con un valor medio de 157 mg/kg (Salvador et al., 1998). Lavelli y Bondesan (2005) han determinado concentraciones entre 81 y 474 mg/kg de α-tocoferol en aceites de seis variedades italianas. Estos autores han observado, asimismo, que el descarozado de los frutos tiene escasa influencia sobre el contenido de α-tocoferol de los aceites.

Existen escasos antecedentes sobre la evolución del contenido y la composición de tocoferoles durante la ontogenia del fruto del olivo. La mayor parte de los trabajos se han realizado en la fase de maduración no encontrándose una relación unívoca entre la concentración de tocoferoles y el índice de madurez. Baccouri et al. (2008) no observaron cambios significativos en el contenido de α-tocoferol durante la maduración del cv. Chétoui; sin embargo, otro cultivar de origen tunecino (Chemlali) mostró una disminución del mismo a partir de un índice de madurez superior a 3. Por su parte, en este último cultivar, Lazzez et al. (2008) han registrado reducciones significativas de la concentración de tocoferoles totales a lo largo de todo el proceso de maduración, aunque la tasa de decrecimiento estuvo influenciada por el origen geográfico de las muestras. Por otra parte, Sakouhi et al. (2008) detectaron incrementos significativos de α-tocoferol durante la maduración de los frutos de los cultivares Sayali, Picholine y Meski. Finalmente, Rannali et al. (1998) y Beltrán et al. (2005) han observado que, en algunos cultivares, con el avance de la maduración, las concentraciones de α y β-tocoferol se reducen significativamente mientras que la de γ-tocoferol se incrementa.

Hidrocarburos

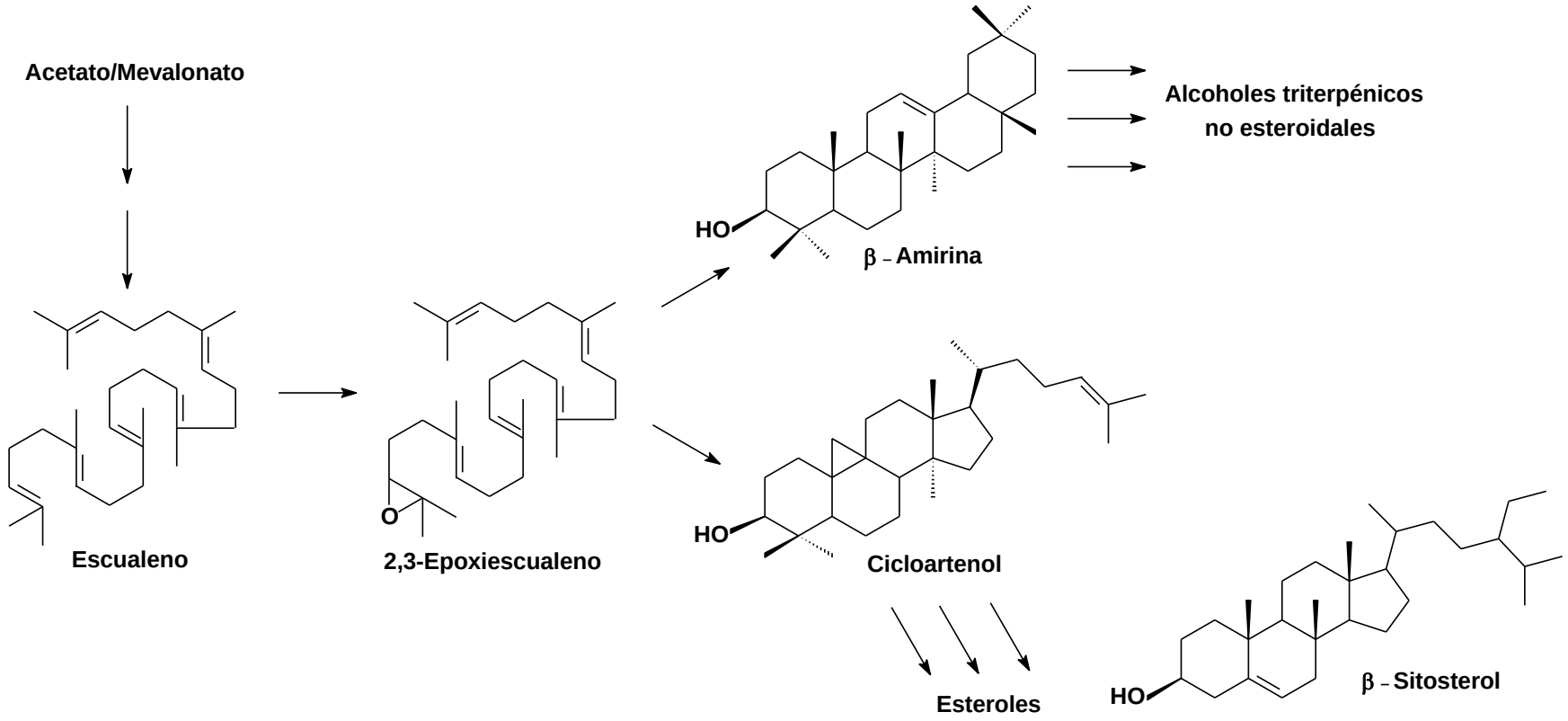
En aceites vegetales pueden estar presentes pequeñas cantidades de hidrocarburos. El origen de los mismos es diverso. Estos compuestos pueden provenir de la cubierta cerosa que recubre el tegumento de la semilla o la epidermis del fruto (aceituna). En el aceite de oliva el hidrocarburo predominante es el escualeno. Su estructura química corresponde a la de un triterpeno. La importancia de este compuesto radica en varios

aspectos. En primer lugar, provee el esqueleto hidrocarbonado para la síntesis de una amplia gama de compuestos isoprenoides. Constituye, de esta manera, el precursor biosintético común a dos familias de sustancias (esteroles y triterpenoides no-esteroidales) profusamente distribuidas en el fruto del olivo y asociadas a numerosos efectos beneficiosos sobre la salud. Stiti et al. (2007, 2010) y Szakiel et al. (2012) han dedicado extensas revisiones bibliográficas a estos aspectos. En segundo lugar, algunos antecedentes sugieren que el escualeno podría aportar al mantenimiento de la estabilidad oxidativa del aceite (Manzi et al., 1998; Psomiadou y Tsimidou, 2002; Owen et al., 2000; Mateos et al., 2003).

La biosíntesis del escualeno tiene lugar por la vía del acetato/mevalonato. La ciclación oxidativa del mismo conduce, por un lado, a la formación de cicloartenol (el primer precursor cíclico de los esteroles) y, por otro, a varios intermediarios que finalmente dan lugar a una gran diversidad de alcoholes triterpénicos no esteroidales (Fig. 7).

La concentración de escualeno en aceites de oliva vírgenes varía ampliamente (1250 – 10500 mg/kg de aceite); el genotipo es la principal fuente de dicha variabilidad (Baccouri et al., 2008; Samaniego-Sánchez et al., 2010). Prácticamente no existen antecedentes relacionados a la posible influencia del ambiente sobre la síntesis y la tasa de acumulación de este compuesto durante la ontogenia del fruto del olivo. Sakouhi et al. (2011[b]) han observado que la concentración de escualeno disminuye abruptamente en fases muy tempranas de la maduración del cv. Meski; posteriormente, su concentración permanece estable o decae lentamente hasta la madurez completa de los frutos. La disminución observada podría deberse a la conversión de este compuesto en 2,3-epoxiescualeno, antes que a una reducción de la tasa de síntesis. En cualquier caso, la valoración del contenido de escualeno durante el desarrollo y la maduración del fruto puede brindar información sobre su dinámica de síntesis y tasa de conversión, a la vez que constituye un elemento más para la evaluación de la calidad del aceite.

Figura 7: El escualeno como precursor biosintético de esteroles y alcoholes triterpénicos no-esteroidales



Hipótesis de trabajo

Hipótesis 1

Si bien se asume que las pautas de crecimiento y desarrollo de los frutos de los distintos cultivares de olivo siguen un patrón general, la dinámica de dichos procesos puede experimentar variaciones considerables sobre todo entre genotipos que presentan diferencias amplias en el tamaño de los frutos. Se presume que en los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco dichas variaciones afectarán la tasa y duración del periodo de llenado de los frutos, así como la dinámica de síntesis, acumulación y composición de los aceites.

Hipótesis 2

Aunque se asume que el contenido y la composición del aceite de oliva constituyen características reguladas genéticamente, existen evidencias del efecto modulador del ambiente sobre su síntesis. Se presume que los cultivares Arbequina y Manzanilla presentan comportamientos diferentes en la dinámica de acumulación del aceite y su composición en función de los ambientes de cultivo característicos de la provincia de San Juan y de la región NO de la provincia de Córdoba.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar los patrones y la dinámica de la acumulación y composición del aceite durante el crecimiento y desarrollo del fruto en tres cultivares de olivo (Arbequina, Manzanilla y Arauco).

Objetivos específicos

1- Establecer el marco temporal y la contribución de las distintas fases de crecimiento y desarrollo de los frutos a la biogénesis del aceite.

2- Relacionar los procesos mencionados con los patrones de acumulación y composición de ácidos grasos y algunos componentes menores (fenoles, tocoferoles, escualeno) de los aceites.

3- Analizar la dinámica de los cambios en la composición de acilglicéridos en función del grado de desarrollo de los frutos.

4- Evaluar el comportamiento de los cultivares Arbequina y Manzanilla, en términos de contenido y composición de los aceites, en dos ambientes de cultivo localizados en la provincia de San Juan y en la región NO de la provincia de Córdoba.

5- Analizar correlaciones y modelos de regresión entre el tiempo térmico acumulado durante el crecimiento y desarrollo de los frutos y los parámetros químicos y bioquímicos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y caracterización de los sitios de estudio

El estudio se llevó a cabo durante dos ciclos de cultivo consecutivos (2010/11 y 2011/12), en dos plantaciones de olivo (Olea europaea L.), una de ellas ubicada en el Dpto. Cruz del Eje (provincia de Córdoba) y la otra en el Dpto. San Martín (provincia de San Juan). Se trabajó con los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco.

Con respecto a la identificación de los cultivares, las muestras de frutos de Arbequina se tomaron de árboles cuya identidad fue previamente confirmada mediante el uso de marcadores moleculares (Torres et al., 2009). La identidad del cv. Arauco no plantea inconvenientes debido a sus particulares características botánicas. Un estudio realizado por Cavagnaro y Masuelli (2002) ha mostrado además una elevada homogeneidad genética en estos dos cultivares. En relación al cv. Manzanilla, no hay registro local de datos a nivel de marcadores moleculares que permitan establecer fehacientemente su identidad. En base a registros compilados en una obra de reciente publicación (Searles, 2012), se conoce que a partir de la década de 1930 se produjo una fuerte introducción de cultivares (entre ellos ´Manzanilla´) fundamentalmente desde España. Los registros del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA – Cruz del Eje y EEA - San Juan) permitieron confirmar que la implantación de este cultivar en los dos sitios analizados, data de la misma época. Dentro de las variedades de Manzanilla reconocidas por el COI, la llamada ´Manzanilla de Sevilla´ fue la más difundida en Argentina. Las características de los frutos recogidos a partir de los árboles seleccionados, coinciden con aquellos ya registrados para esta variedad (Torres et al., 2007), a saber: el peso de los mismos es medio-alto (3,50 ± 0,5 g), la forma es ovoidal, con ápice redondeado y base truncada. La longitud es de 23 ± 3 mm y el diámetro transversal de 18 ± 3 mm. El endocarpo es de peso elevado (0,58 ± 0,05 g), forma redondeada, con base truncada y ápice redondeado. La superficie es rugosa y el número de surcos fibro-vasculares es medio-alto (valor promedio 9).

En ambos sitios de estudio, las plantas utilizadas poseen una edad aproximada de 70 años y se encuentran dispuestas en un marco de plantación de 10 x 10 m. En la tabla 1 se muestran las fechas de plena floración (FPF) y el periodo en el cual se observó el endurecimiento del endocarpo. Este último se evaluó sobre una muestra de 100 frutos registrándose el dato en el momento que se apreció incapacidad de atravesar el carozo a la altura media del fruto con el filo de un bisturí.

Tabla 1: Fechas de plena floración (FPF) y período de endurecimiento del endocarpo (expresado en días después de plena floración, DDPF) en los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco, en ambos ciclos de cultivo (2010-2011 y 2011-2012) y sitios de estudio (Cruz del Eje, Córdoba y Dpto. San Martín San Juan).

Cultivar	Ciclo de cultivo	Sitio	Fecha plena floración (FPF)	Endurecimiento endocarpo (DDPF)
Manzanilla	2010-2011	Córdoba	28/10/2010	35-50
		San Juan	26/10/2010	50-65
	2011-2012	Córdoba	15/10/2011	35-50
		San Juan	20/10/2011	55-70
Arbequina	2010-2011	Córdoba	28/10/2010	35-50
		San Juan	30/10/2010	45-60
	2011-2012	Córdoba	15/10/2011	35-50
		San Juan	24/10/2011	50-65
Arauco	2010-2011	San Juan	28/10/2010	60-75
	2011-2012	San Juan	22/10/2011	65-80

A continuación se resumen las principales características de ambos sitios de estudio:

- Paraje Las Playas (30º39´ S, 64º57´ O; Dpto. Cruz del Eje, provincia de Córdoba).

Este sitio de estudio se encuentra ubicado aproximadamente 10 km al NO de la ciudad de Cruz del Eje. Los suelos de la región son heterogéneos, compuestos por arena arcillosa, pobres en nitrógeno, pero bien provistos de potasio y calcio. Poseen textura liviana y corresponden a la clasificación Haplustol típico. Debido a su escasez en materia orgánica son propicios a la erosión, lo que motiva extremo cuidado en su conservación. Por ser zona árida y de regadío, el pH en la mayoría de los casos supera el valor de 7; con un buen manejo el peligro de salinización no es alto (Pierantozzi 2012). Las principales características del suelo en este sitio se resumen en la Tabla 2.

El sitio de estudio cuenta con agua para riego provista por el consorcio de riego del Dique Cruz del Eje. Los análisis físico-químicos del agua suministrada al olivar (Ayers y Westcot, 1985) permitieron establecer que la misma es apta para riego, con bajo riesgo de salinización (conductividad eléctrica 0.20 ds/m) y de sodificación (relación de adsorción de sodio, RAS Aj. 1.4) del suelo.

Tabla 2: Características físicas y físico-químicas del suelo correspondiente al área de estudio del Paraje Las Playas (Cruz del Eje, Córdoba, Argentina).

	Horizonte			
Parámetro	A1 y A3	Bw	BC	C
Profundidad (cm)	0 - 25	30 - 40	50 - 60	70 - 80
Materia orgánica (%)	2,65	1,68	1,02	0,66
Nitrógeno total (%)	0,15	0,11	0,09	0,07
Nitrógeno de nitrato (ppm)	12	7,0	5,7	4,8
Fósforo extractable (ppm)	22	17	6	3
Arena muy gruesa (1-2 mm)	7,45	6,69	----	4,05
Arena gruesa (500 -1000µ)	8,21	7,51	----	5,02
Arena media (250-500µ)	15	11,4	----	13,5
Arena fina (100-250µ)	18	13	----	12,8
Arena muy fina (50-100µ)	15	11,2	----	12,7
Limo grueso (20-50µ)	18	25,1	----	43,6
Limo fino (2-20µ)	9	10,2	----	6,45
Arcilla (<2µ)	10	15,5	----	2,14
pH	7,86	7,93	8	8,55
Conductividad eléctrica (ds/m)	1,5	0,9	0,8	0,8

Datos otorgados por INTA, Cruz del Eje.

El clima imperante en esta región es templado seco, con vientos cálidos si corren del norte y frescos si son del sur. El mes de enero es el más cálido, mientras que julio es el más frío. El invierno normalmente no es riguroso presentando pocos días de heladas. En el verano se registran las mayores precipitaciones. La acumulación de las lluvias en el ciclo primavero - estival es, en promedio, del orden de 420 mm, mientras que la acumulación en el ciclo otoño - invernal es de aproximadamente 130 mm. La humedad relativa promedio es de 53 %, siendo los meses de septiembre y octubre los de menor humedad.

Durante ambos ciclos de cultivo analizados, las temperaturas medias mínimas mensuales más bajas se registraron durante el mes de julio (2,6 y 3,9 ºC), mientras que las medias máximas más altas se obtuvieron en enero (32,7 y 34,2ºC) (Tablas 3 y 4). En las

figuras 8 y 9 se muestran las temperaturas máximas, mínimas y media diarias entre los meses de octubre y mayo de los ciclos de cultivo 2010-2011 y 2011-2012, respectivamente.

Tabla 3: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11).

Mes	T md	Tmin md	Tmax md	Precipitación	ETo	ETc
Junio	11,7	5,6	19,1	2	48,3	19,3
Julio	10,1	2,6	18,0	0	72,2	28,8
Agosto	12,7	6,0	20,3	2	103,9	41,5
Setiembre	17,1	9,7	24,2	10	144,6	98,4
Octubre	19,4	11,8	27,3	3	170,5	115,9
Noviembre	22,2	14,7	29,4	42	181,2	123,2
Diciembre	25,3	17,6	32,6	79	216,1	146,9
Enero	25,4	18,6	32,7	125	188,8	128,4
Febrero	23,4	17,6	30,0	208	139,2	94,7
Marzo	23,1	14,8	29,8	26	140,7	95,7
Abril	20,9	13,7	28,1	13	112,7	76,6
Mayo	15,7	9,9	21,4	0	80,1	54,5

Figura 8: Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC), en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11). Las líneas de corte representan el periodo en el que se realizó la toma de muestra de los frutos.

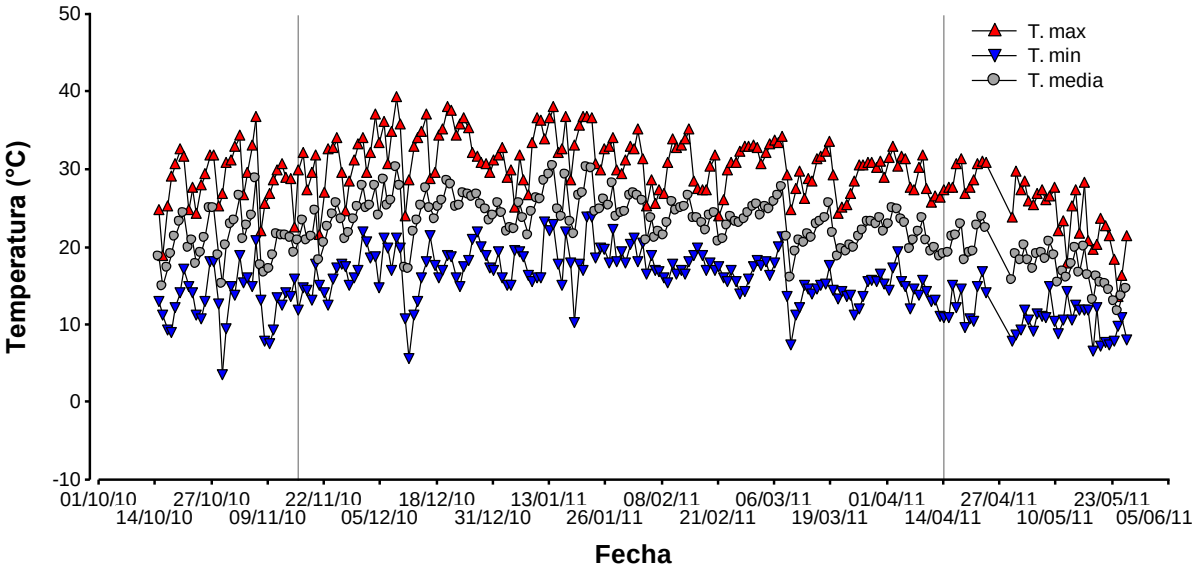
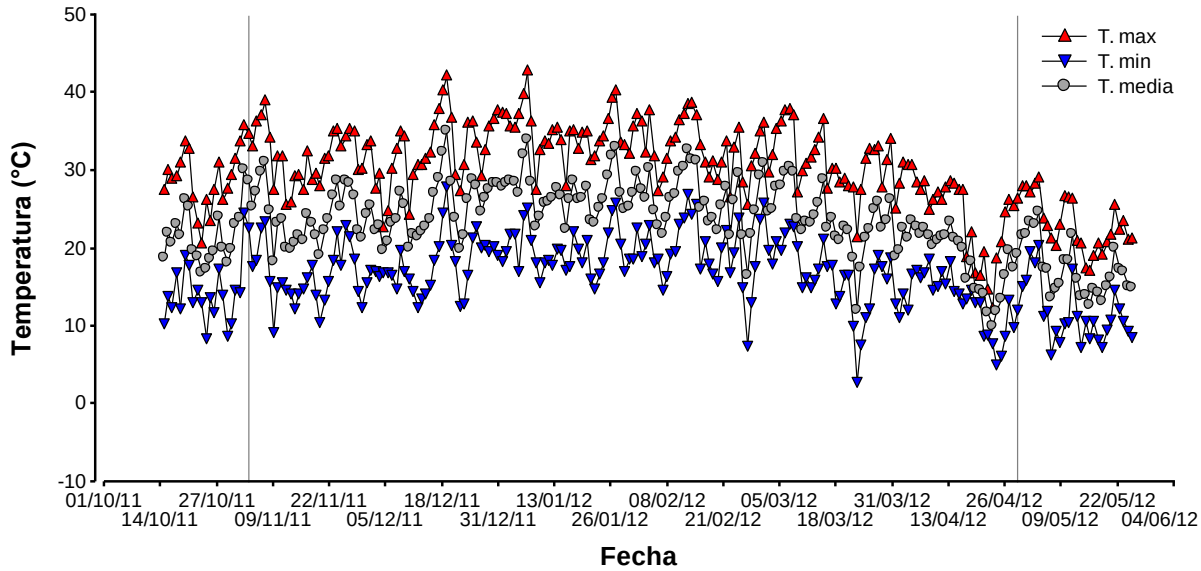


Tabla 4: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12).

Mes	T md	Tmin md	Tmax md	Precipitación	ETo	ETc
Junio	13,0	8,0	18,0	1	62,6	25,0
Julio	11,0	3,9	17,8	0	55,6	22,2
Agosto	13,0	5,2	20,8	11	71,5	28,6
Setiembre	19,1	10,9	27,2	55	109,3	74,3
Octubre	21,0	12,7	29,2	82	141,5	96,2
Noviembre	24,7	16,7	32,6	54	168,3	114,4
Diciembre	24,8	17,1	32,4	44	190,4	129,5
Enero	26,5	18,8	34,2	147	206,5	140,4
Febrero	26,1	18,9	33,2	59	183,7	124,9
Marzo	24,2	16,3	32,1	58	164,9	112,3
Abril	20,6	14,5	26,6	26	122,9	83,6
Mayo	18,9	12,6	25,1	18	94,9	64,5

Figura 9: Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC) en Cruz del Eje (Córdoba, Argentina) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12). Las líneas de corte representan el periodo en el que se realizó la toma de muestra de los frutos.



-Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (31º39´, 68º35´ W; Dpto. San Martín, provincia de San Juan).

Este sitio de estudio se encuentra ubicado 18 km al este de la ciudad de San Juan. Dadas las condiciones de aridez, los suelos de esta región se caracterizan en general por ser jóvenes e inmaduros con escasa evolución hacia horizontes pedogenéticos. Son pobres en materia orgánica, pero bien provistos de potasio y medianamente de fósforo. Se clasifican como Entisoles y están constituidos por sedimentos gravitatorios, eólicos y fluviales (Moscatelli et al., 1990), con una capa de textura franco-arenosa superficial y una capa arenosa más profunda (Tabla 5).

El sitio de estudio cuenta con agua para riego provista por el canal provincial secundario Sarmiento, dependiente del canal principal denominado Canal del Norte. La conductividad eléctrica del agua suministrada a los olivares es de 0,65 ds/m, siendo la misma considerada de buena calidad para riego.

El clima árido desértico domina toda la región. Las precipitaciones están concentradas principalmente en el periodo estival y, en general, no superan los 100 mm anuales. La región se caracteriza por presentar alta heliofanía, baja nubosidad y gran intensidad de radiación solar. El período libre de heladas oscila entre 220 y 300 días, extendiéndose desde el mes de octubre hasta mayo. La temperatura media anual varía entre 16 ºC y 18 ºC, con máximas absolutas que superan los 45 ºC y mínimas absolutas entre 5 ºC y 10 ºC bajo cero.

Durante ambos ciclos de cultivo analizados, las temperatura medias mínimas mensuales más bajas se registraron durante el mes de julio (-3,1 y -2,7 ºC), mientras que las medias máximas más altas se obtuvieron en diciembre (36,5 ºC, ciclo 2010-2011) y enero (37,8 ºC, ciclo 2011-2012) (Tablas 6 y 7). En las figuras 10 y 11 se muestran las temperaturas máximas, mínimas y media diarias entre los meses de octubre y mayo de los ciclos de cultivo 2010-2011 y 2011-2012, respectivamente.

Tabla 5: Características físicas y físico-químicas del suelo correspondiente al área de estudio de la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan).

	Horizontes		
Parámetro	A	AC	C
Profundidad (cm)	0 - 20	20 - 80	> 80
Textura	Franco arenosa	Franco-arenosa/arenosa	Arenosa
Materia orgánica (%)		0,85	---
Fósforo extractable (ppm)		47	---
Potasio intercambiable (ppm)		232	---
Ca^{+2} (me/l)		7,54	---
Mg^{+2} (me/l)		1,53	---
Na^{+} (me/l)		4,23	---
CO_3H^{-} (me/l)		7,35	---
Cl^{-} (me/l)		2,76	---
SO_4^{-2} (me/l)		3,19	---
Fe (ppm)		3,2	---
Zn (ppm)		3	---
Cu (ppm)		2	---
pH		8	---
Conductividad eléctrica (ds/m)		1,2	---

Datos otorgados por INTA, San Juan.

Tabla 6: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11).

Mes	T md	Tmin md	Tmax md	Precipitación	ETo	ETc
Junio	9,50	-0,5	19,5	0	53,3	16,0
Julio	6,75	-3,1	16,6	0	58,6	16,4
Agosto	10,2	0,6	19,8	0	90,2	27,1
Setiembre	14,9	5,1	24,6	6	108,3	55,2
Octubre	19,2	9,6	28,8	5	140,4	71,6
Noviembre	23,1	13,5	32,6	5	171,0	87,2
Diciembre	26,6	16,7	36,5	33	190,4	97,1
Enero	27,0	18,1	35,9	21	180,4	92,0
Febrero	25,3	17,1	33,4	30	132,6	67,6
Marzo	22,9	13,9	31,8	8	167,1	85,2
Abril	18,9	9,0	28,8	0	136,6	69,7
Mayo	12,8	2,8	22,8	0	86,4	44,1

Figura 10: Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el primer ciclo de cultivo analizado (2010/11). Las líneas de corte representan el periodo en el que se realizó la toma de muestra de los frutos.

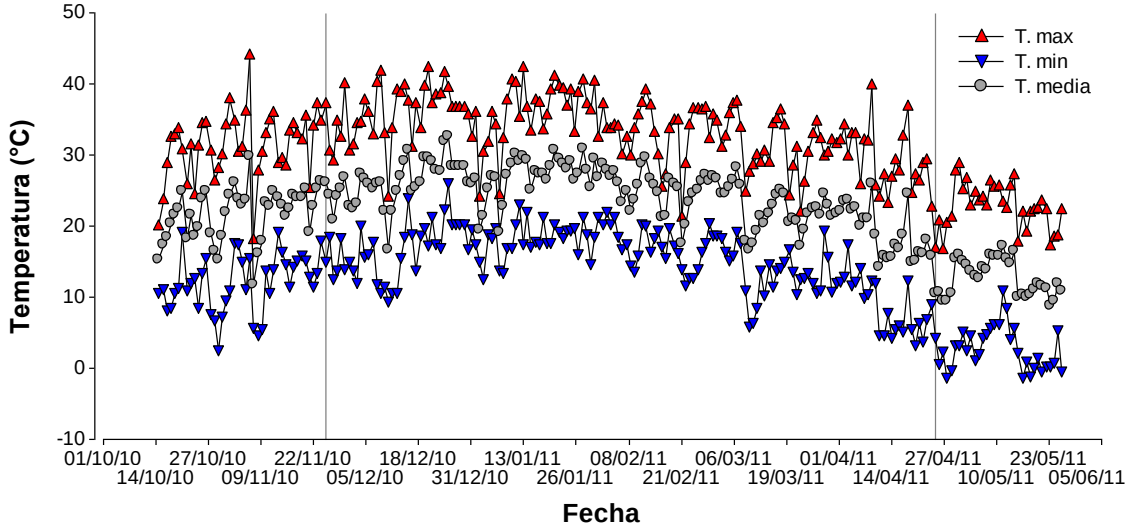
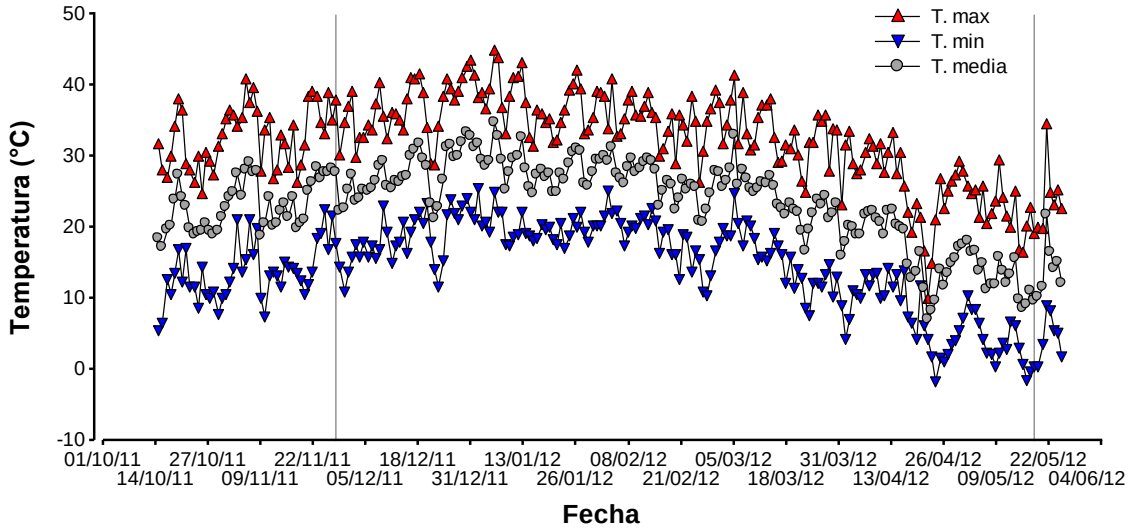


Tabla 7: Temperaturas medias (T md), medias mínimas (Tmin md) y medias máximas (Tmax md) mensuales (ºC), precipitaciones efectivas (mm), evapotranspiración de referencia (ETo, mm/día) y evapotranspiración del cultivo (ETc, mm/día) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12).

Mes	T md	Tmin md	Tmax md	Precipitación	ETo	ETc
Junio	8,9	-1,0	18,7	0	63,1	18,9
Julio	7,8	-2,7	18,3	3	55,9	16,8
Agosto	10,4	-0,4	21,1	0	88,4	26,5
Setiembre	16,3	4,5	28,1	0	139,1	70,9
Octubre	19,2	9,8	28,6	0	157,9	80,5
Noviembre	24,5	15,0	33,9	6	196,2	100,0
Diciembre	27,2	18,2	36,1	0	219,2	111,8
Enero	29,0	20,2	37,8	8	218,8	111,6
Febrero	27,1	19,2	35,0	7	175,2	89,4
Marzo	24,5	15,5	33,5	0	167,6	85,5
Abril	18,1	9,3	26,8	0	107,7	54,9
Mayo	13,8	4,0	23,5	0	72,0	36,7

Figura 11: Temperaturas medias (Tmd), mínimas (Tmin) y máximas (Tmax) diarias (ºC) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (Dpto. San Martín, provincia de San Juan) durante el segundo ciclo de cultivo analizado (2011/12). Las líneas de corte representan el periodo en el que se realizó la toma de muestra de los frutos.



Riego del olivar

En ambos sitios de estudio y teniendo en cuenta el total de precipitación efectiva recibida durante cada ciclo de cultivo (Tablas 3, 4, 6 y 7), se aplicó riego suplementario. La programación del riego se realizó siguiendo la metodología propuesta por Allen et al. (1998) utilizando una simplificación del método del balance hídrico. Para el cálculo de la evapotranspiración del cultivo (ETc) en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan, se utilizó la siguiente ecuación:

$$ETc = ETo \times Kc \times Kr$$

donde ETo es la evapotranspiración de referencia, Kc es el coeficiente de cultivo, y Kr el coeficiente de reducción por superficie sombreada.

La Eto se midió utilizando un tanque de evaporación tipo A colocado a corta distancia del área experimental y el coeficiente de tanque (Kpan) propuesto por Allen et al. (1998). Para el periodo comprendido entre abril y agosto, se utilizaron los Kc sugeridos para el cultivo de olivo en la provincia de La Rioja (Rousseaux et al., 2008). Para el resto del año, se emplearon los valores propuestos por Girona et al. (2002). Los valores de Kr se calcularon utilizando la relación propuesta por Fereres et al. (1981).

En Cruz del Eje, para el primer ciclo de cultivo, se tomaron como referencia los valores de ETc obtenidos por Pierantozzi et al. (2014). Para el segundo ciclo se dispuso de una estación meteorológica que permitió obtener datos de temperatura ambiente, pluviometría, humedad relativa, radiación solar y velocidad del viento, los cuales se emplearon para calcular ETo utilizando la expresión de Penman-FAO (Orgaz y Fereres, 2008).

Diseño de muestreo de frutos

En cada sitio de estudio, se seleccionó una parcela de una superficie aproximada de 2 ha. Dentro de la misma se escogieron aleatoriamente 10 árboles de cada uno de los cultivares, de los cuales se seleccionaron finalmente 5 por cada cultivar (unidades experimentales), en base a las semejanzas que presentaban en sus niveles de carga. Éstas se estimaron visualmente, adjudicando a cada árbol un índice numérico en función del porcentaje de superficie de copa ocupado por la fruta (COI, 2011).

A partir del inicio de la fase I de crecimiento de frutos (entre 20 y 40 días después de plena floración, DDPF), a intervalos quincenales y durante el transcurso de la mañana (entre las 8 y las 10 horas) se tomaron muestras de frutos (aproximadamente 300 g) provenientes de las cuatro orientaciones de cada uno de los árboles seleccionados, a una altura de copa comprendida entre los 1,5 y los 2,5 m de altura.

Índice de madurez, estudios morfométricos, histoquímicos y de microscopía

A partir de alícuotas de 100 frutos por árbol se evaluaron diferentes índices morfométricos (peso, diámetro longitudinal y transversal) mediante el empleo de una balanza de precisión y un calibre digital.

Para determinar el índice de madurez se utilizó la metodología propuesta por Beltrán et al. (2008). Los frutos se clasificaron en las 8 clases o categorías que se detallan a continuación:

Clase 0: Piel verde intenso.
Clase 1: Piel verde-amarillento.
Clase 2: Piel verde con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto. Inicio de envero.
Clase 3: Piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto. Final de envero.
Clase 4: Piel negra y pulpa blanca.
Clase 5: Piel negra y pulpa morada sin llegar a la mitad de la pulpa.
Clase 6: Piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso.
Clase 7: Piel negra y pulpa morada totalmente hasta el hueso.

El índice de madurez (IM) se obtuvo en base a la siguiente fórmula:

$$IM = (A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4 + F \times 5 + G \times 6 + H \times 7) / 100$$

siendo A, B, C, D, E, F, G y H, el número de frutos de las clases 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente.

Para los estudios de microscopía se seleccionaron aleatoriamente 10 frutos por árbol. En la sección media de los mismos y siguiendo el eje transversal, se cortaron porciones de mesocarpo de 3 - 4 mm de espesor. Las mismas se fijaron en FAA (50 % etanol 95º, 35 % agua destilada, 10 % formaldehído, 5 % ácido acético glacial) y posteriormente se sometieron a cortes semifinos a mano alzada (30 µm de espesor aprox.). Los mismos se lavaron sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio comercial (100 g de Cloro activo/L) en agua (30 : 70 % v/v). A continuación fueron teñidos con Oil Red y Astra Blue (0,2 %), y finalmente se montaron en preparados semipermanentes con gelatina glicerinada. Estos cortes se analizaron mediante un fotomicroscopio Axiophot de luz transmitida y epifluorescencia (20X). Las imágenes obtenidas fueron tomadas con una cámara digital y procesadas con un software analizador de imágenes (MacBiophotonics ImageJ).

Contenido de aceite

De cada lote de frutos se seleccionó aleatoriamente una muestra de 100 g la cual se trituró en molino de cuchillas de acero inoxidable. A partir de 10 g de este material se determinó el porcentaje de humedad (estufa, 100 ºC, peso seco constante). El resto se liofilizó y conservó a -20 ºC. Una parte del material liofilizado (20 g) se utilizó para la obtención de aceite, mediante extracción continua sólido-líquido en equipo Soxhlet, durante 10 horas, empleando n-hexano como disolvente. El contenido de aceite se cuantificó por diferencia de pesos previo y posterior a la extracción (AOCS, 1998) y se expresó como porcentaje según base seca (% SBS).

Composición de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos de los aceites se determinó por cromatografía gaseosa (CG). Los aceites crudos (0,5 g) se saponificaron con 5 mL de solución de hidróxido de potasio 0,5 N en metanol mediante reflujo durante 5 min. A la mezcla de reacción se le adicionaron 15 mL de solución de cloruro de amonio/ácido sulfúrico en metanol y se llevó a reflujo durante 5 min. adicionales. Se dejó enfriar y se particionó con 10 mL de n-hexano. Se recuperó esta última fase, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró (papel Whatman Nº 1) y concentró en evaporador rotatorio a 40 °C. La mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos se analizó en una columna de fase Supelcowax, de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µ

de espesor de fase. Se empleó nitrógeno como gas portador (1 mL/min); temperatura de horno programada desde 180 hasta 220 °C (2°C/min); temperaturas de inyector y detector (FID), 250 °C. Los ácidos grasos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos con respecto a patrones corridos bajo idénticas condiciones y datos tomados de bibliografía (Torres et al., 2009). El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos.

En los primeros estadios de desarrollo evaluados, se utilizó una muestra de 30 g de frutos a los fines de analizar la contribución relativa de los distintos tejidos formadores de aceite (semilla y pulpa, considerando en esta última mesocarpo y epicarpo) a la composición de ácidos grasos. Los tejidos mencionados se separaron manualmente, se liofilizaron hasta deshidratación completa y se extrajeron con n-hexano (Soxhlet, 8 h). Los aceites obtenidos se analizaron en su composición de ácidos grasos de acuerdo a la metodología ya señalada.

Estudio de la dinámica de los cambios en la composición de glicéridos

Este objetivo se llevó a cabo con muestras de frutos del cv. Arauco recolectadas en la EEA – INTA San Juan durante el ciclo de cultivo 2013/14. La toma de muestras se realizó según lo indicado en el apartado "Diseño de muestreo de frutos".

A partir de cada lote de frutos se seleccionó aleatoriamente una muestra de aproximadamente 50 g. La misma se utilizó para separar la pulpa (mesocarpo + epicarpo) y triturarla en molino de cuchillas de acero inoxidable, se liofilizó hasta obtener peso seco constante y se conservó a -20 ºC. El material liofilizado se empleó para la extracción de aceite (Soxhlet, n-hexano, 10 h). A partir de los aceites obtenidos, se analizó la composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones de glicéridos. Estas últimas se separaron mediante cromatografía en cada delgada (CCD), empleando sílica gel (0,5 mm de espesor) como fase estacionaria y n-hexano : éter dietílico : ácido acético (90 : 10 : 1 v/v) como fase móvil. Una vez finalizado el desarrollo de las placas cromatográficas, se retiraron de las cubas y se colocaron bajo campana hasta completa evaporación del disolvente. Posteriormente, las placas se revelaron con vapores de yodo. La fracciones de interés (diglicéridos, triglicéridos y una fracción

polar conteniendo lisofosfoglicéridos) se identificaron empleando 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina como estándar para la identificación de la fracción de lisofosfoglicéridos y posteriormente se removieron de las placas y se resuspendieron en cloroformo : metanol (2 : 1, v/v) (fracción polar) o en n-hexano (di y triglicéridos). La fracción polar se purificó nuevamente mediante CCD utilizando sílica gel como fase estacionaria y cloroformo : metanol : agua (65 : 32.5 : 2.5 v/v) como fase móvil. Una vez realizado el desarrollo cromatográfico, esta última fracción se resuspendió en cloroformo : metanol (2 : 1, v/v). Finalmente, luego de la evaporación del disolvente, se analizó la composición de ácidos grasos del extracto de cada una de las fracciones purificadas (lisofosfoglicéridos, di y triglicéridos), mediante cromatografía gaseosa, previa saponificación y esterificación de las muestras, de acuerdo a las condiciones empleadas para el análisis de los ácidos grasos totales de los aceites que fue descripta anteriormente.

Componentes menores

Tocoferoles

La composición de tocoferoles se analizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). A partir de cada una de las muestras de frutos molidos y liofilizados (10 g), se procedió a la extracción del aceite mediante disolución con n-hexano (40 mL), a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación durante 10 min. La mezcla se filtró (papel Whatman Nº 1) y la micela aceite/hexano se concentró en evaporador rotatorio a 35 ºC. Inmediatamente se pesó una alícuota de aceite de 1 g (con una aproximación de 0,01 g) y se colocó en un matraz aforado de 10 ml. Esta muestra de aceite se disolvió y llevó a volumen final (10 mL) con n-hexano calidad HPLC. Una alícuota de 20 µL de la solución previamente filtrada (filtro de nylon, poro 0,45 µm) se inyectó en una columna de sílica de fase normal (Supelcosil LC-NH_2-NP, 250 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm). Como fase móvil se utilizó n-hexano : acetato de etilo (70 : 30 v/v) con un caudal de 1 mL/min. Se empleó un detector UV a una longitud de onda de 295 nm. Los componentes de la mezcla se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos con respecto a patrones (α-, γ- y β-tocoferol) corridos bajo idénticas condiciones. Para la cuantificación de los componentes individuales se valoró la respuesta del detector (como

porcentaje de área) a diferentes diluciones de cada uno de los patrones puros. La concentración se expresó como mg de tocoferol/kg de aceite.

Escualeno

A partir de alícuotas de 200 mg de aceite obtenidas como se indicó para la cuantificación de tocoferoles, se determinó el contenido de escualeno de acuerdo al protocolo propuesto por Lanzón et al. (1995) con algunas modificaciones. La muestra de aceite se mezcló con 1 mL de solución de hidróxido de potasio 2 N en metanol, 0,5 mL de n-hexano y 1 mL de solución de escualano en n-hexano (1 mg/mL). La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 min. y posteriormente se dejó en reposo hasta permitir la separación completa de fases. La fase superior (n-hexano) se sometió a lavados sucesivos (3 x 5 mL) con etanol : agua (50 : 50 v/v). Finalmente se tomó una alícuota de la misma para su análisis mediante cromatografía gaseosa (CG) y CG – espectrometría de masas (CG – EM). Se utilizó una columna capilar HP-5 (12 m x 0,2 mm x 0,33 µm). Se llevó a cabo análisis isotérmico (270 °C), con temperaturas de inyector y detector a 290 ºC. La identificación de escualeno se realizó por comparación de su espectro de masa con el registrado en la base de datos Nist versión 08. Su concentración se calculó en base a la del estándar interno (escualano).

Contenido total y composición de sustancias fenólicas

Una alícuota de 1 g de material (frutos) liofilizado se sometió a agitación continua durante 30 minutos en oscuridad, con 80 mL de metanol : agua (80 : 20 v/v). La fase líquida se filtró (papel Whatman Nº 1) y se sometió a lavados sucesivos (40 mL x 3) con n-hexano. Se recuperó la fase hidro-metanólica, se filtró a través de filtro de nylon de 0,45 µm y se concentró hasta sequedad en evaporador rotatorio a una temperatura inferior a los 40 ºC. El residuo se disolvió en metanol. La cuantificación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo con el reactivo de Folin-Ciocalteau mediante lectura espectrofotométrica a 725 nm (Vázquez-Roncero et al., 1973). La concentración se calculó a partir de una curva de calibración construida con concentraciones conocidas de ácido gálico.

Para el análisis de la composición de sustancias fenólicas, se siguió básicamente la metodología sugerida por Taticchi et al. (2013). Se pesaron 5 g de cada muestra de frutos liofilizados y se homogeneizaron con 50 mL de solución de metanol : agua (80 : 20 v/v) que contenía 20 mg/L de 2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT). Luego de filtrar, el residuo sólido se extrajo dos veces más con el mismo volumen y solución del disolvente. Se reunieron las fases líquidas obtenidas y la mezcla resultante se concentró en evaporador rotatorio (40 ºC) hasta evaporación del metanol. El extracto acuoso (1 mL) se purificó mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos de sílica (Bond Elut Jr-C18 cartridge, Agilent Technologies, USA) y metanol (50 mL) como eluyente. Luego de la remoción del disolvente (rotavapor, 40 ºC), se recuperó el extracto, se disolvió en 1 mL de metanol y se analizó por HPLC, empleando una columna de fase reversa (Spherisorb ODS-1, 250 mm x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm) a 25 ºC. El volumen de inyección fue de 20 µL y la programación de la fase móvil como se indica a continuación: solución de ácido acético en agua (0,2 % v/v) (disolvente A) / metanol (disolvente B); caudal 1 mL/min con el siguiente gradiente: 95 % A / 5 % B (2 min), 75 % A / 25 % B (8 min), 60 % A / 40 % B (10 min), 50 % A / 50 % B (16 min), 0 % A / 100 % B (14 min). La detección se llevó a cabo mediante detector de fluorescencia a 280 nm (lignanos) y detector de arreglo de diodos a 278 nm (el resto de los componentes). La concentración de cada uno de los compuestos fenólicos identificados se calculó a partir de curvas de calibración construidas con concentraciones conocidas de estándares puros.

Análisis estadístico de los resultados

La base informática utilizada fue el programa INFOSTAT versión 2014. Se ajustaron modelos lineales mixtos para estimar, mediante máxima verosimilitud restringida (REML) (West et al. 2007), los coeficientes de regresión de cada una de las variables analizadas en relación al tiempo de medición. El modelo general fue el siguiente:

$$y(ijk) = \mu + V(i) + A(j) + T(k)*b^1 + V*A(ij) + V*T(ik)*b^2(i) + \varepsilon(ijk)$$

Donde V es el efecto fijo de la i combinación ambiente-cultivar (hipótesis 2), A es el efecto fijo del j año, T es el efecto fijo del k tiempo térmico y b^1 su coeficiente de regresión, V*A es la interacción de la i combinación ambiente-cultivar en el j año, V*T es la interacción de la i

combinación ambiente-cultivar en el k tiempo térmico, b^2 es el coeficiente de regresión para la i combinación ambiente-cultivar y ε es el término de error. Para la comparación de cultivares (hipótesis 1) se ajustó un modelo lineal mixto similar al mencionado anteriormente, pero con efecto V(i) como efecto de cultivar (sin ambiente). El tiempo térmico fue expresado en grados/dias (ºCd) usando la metodología propuesta por Cherbiy-Hoffmann et al. (2013).

Los errores fueron modelados con correlación temporal de tipo autorregresiva continua de orden 1, considerando las mediciones tomadas en un mismo árbol correlacionadas temporalmente en cada ambiente (medidas repetidas en el tiempo). Un modelo autorregresivo es una representación de un tipo de proceso aleatorio, que como tal, describe ciertos procesos variables en el tiempo y especifica que la variable de salida depende linealmente de sus propios valores anteriores.

El comportamiento de la evolución en el tiempo de algunas variables químicas (ácidos grasos, tocoferoles totales y escualeno) obliga a modelarlas como regresiones lineales a dos tramos:

$y = \alpha + \beta_1 * x$ cuando $x < \gamma$

$y = \alpha + \beta_2 + (x-\gamma)$ cuando $x \geq \gamma$

Donde "y" es la variable dependiente, "α" la ordenada al origen, "β" las pendientes de cada sección líneal e "γ" el momento en el cual la variable tiene un cambio de tendencia (*break-point*). Esto permite la identificación de puntos de quiebre. Por consiguiente, los modelos lineales mixtos mencionados anteriormente fueron ajustados para cada tramo por separado según el *break-point* temporal de cada variable en cuestión.

En todos los casos se utilizó un nivel de significancia $p \leq 0,05$ y para las comparaciones de medias los p-valores fueron corregidos con el criterio de corrección de Bonferroni.

Asimismo se realizó un ANOVA con interacción entre las fuentes de variación cultivar, ambiente y época de cosecha. Para establecer correlaciones entre las variables analizadas se empleó el test de Pearson. En estos casos la significancia estadística fue $p \leq 0,01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pautas de crecimiento y desarrollo de los frutos y dinámica de la acumulación y composición del aceite en los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco

Estudios morfométricos, histoquímicos y de microscopía

El tamaño y el peso del fruto del olivo son características determinadas genéticamente, pero pueden ser afectadas considerablemente por prácticas agronómicas (riego, poda, raleo) y factores agro-ecológicos propios de la región de cultivo. Por sus efectos directos sobre la producción de foto-asimilados, el estado hídrico y la proporción de superficie foliar que intercepta radiación solar representan las causas más importantes que afectan la productividad del olivar (Rallo y Cuevas, 2008).

Los resultados expuestos en este apartado se obtuvieron a partir de plantaciones localizadas en la EEA – INTA San Juan, bajo las mismas condiciones de cultivo, durante dos ciclos consecutivos. En ambos ciclos evaluados (2010-11 y 2011-12), se seleccionaron árboles con niveles de carga frutal semejante, los cuales se estimaron en la categoría "Alta" (60 – 80 % de superficie de copa). Al inicio de las actividades (toma de muestras) en el primer ciclo de cultivo, los árboles del cv. Arbequina tenían un volumen de copa promedio de 74,4 ± 3,54 m^3, los del cv. Manzanilla 71,7 ± 3,20 m^3, y los del cv. Arauco 29,4 ± 0,92 m^3 y una altura de 4,23 ± 0,15; 4,08 ± 0,15 y 4,73 ± 0,05 m respectivamente.

La evolución del peso de los frutos en los tres cultivares muestra dos tendencias diferentes (Fig. 12). En el cv. Arauco, a partir de los 30 días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), el peso de las drupas comienza a incrementarse rápidamente, en forma casi lineal, hasta alcanzar 4,5 g/fruto hacia los 110 DDPF. Luego de un corto periodo (aproximadamente entre 110 y 140 DDPF) durante el cual el peso no varía significativamente, tiene lugar una segunda fase de crecimiento. Al cabo de la misma, el fruto alcanza un peso final promedio cercano a los 7 g. De esta manera, en este cultivar, la evolución del peso del fruto se adapta aproximadamente a una curva de tipo sigmoidal, con tres fases principales. De acuerdo a Beltrán et. al (2008), las mismas podrían corresponder predominantemente, aunque no en forma excluyente, a los siguientes eventos: a) un primer periodo de crecimiento rápido del fruto debido a la intensa división y expansión celular que tienen lugar durante el crecimiento y

desarrollo del endocarpo; b) el endurecimiento del endocarpo, durante el cual la división celular prácticamente se detiene y el crecimiento del fruto se ralentiza; c) el desarrollo del mesocarpo debido fundamentalmente a la expansión de células pre-existentes. Sin embargo, en el cv. Arauco el endurecimiento del carozo se da aproximadamente entre los 60 - 80 DDPF (Tabla 1), lo que no coincide con la fase de ralentización de ganancia en el peso fresco del fruto (110 - 140 DDPF). Otros factores, como las variaciones en la disponibilidad de agua en el suelo, podrían estar afectando estos procesos. En los cultivares Arbequina y Manzanilla, la delimitación de estas fases de crecimiento es menos evidente. En el primero, el peso de los frutos se incrementa de manera prácticamente lineal hasta un valor próximo a 1,5 g/fruto a los 140 DDPF. Posteriormente, se mantiene constante hasta el final del periodo de muestreo evaluado. En el cv. Manzanilla, el peso de las drupas experimenta un incremento casi lineal hasta alcanzar un valor aproximado a los 4 g/fruto hacia los 160 DDPF. A continuación, el crecimiento se ralentiza y el peso registra un valor constante promedio cercano a los 4,3 g/fruto. En consecuencia, en estos dos últimos cultivares, los frutos muestran un patrón de crecimiento prácticamente continuo, sin una detención marcada durante el endurecimiento del endocarpo. Este comportameinto ya ha sido observado en los cultivares Arbequina (Trentacoste et al., 2010) y Morisca (Martín-Vertedor et al., 2011) en plantaciones de alta densidad.

Al analizar la dinámica de acumulación de materia seca (Fig. 13), se observan las tendencias descriptas anteriormente. Cuando se evalúan las tasas promedio de acumulación en función del tiempo térmico acumulado (TTA, Tabla 8), los cultivares Arbequina y Manzanilla no presentan variaciones estadísticamente significativas. Sus valores resultan, asimismo, significativamente inferiores al registrado en el cv. Arauco. La correlación entre el TTA y el contenido de materia seca es positiva y estadísticamente significativa con valores de r comprendidos entre 0,61 y 0,87 (Tabla 9).

Estudios realizados en las provincias de Mendoza y La Rioja han puesto en evidencia distintos comportamientos en relación a la dinámica de crecimiento de los frutos de diversos cultivares de olivo (Trentacoste et al., 2012; Rondanini et al., 2014), encontrándose diferencias tanto en las tasas como en la duración del periodo de llenado del fruto. En principio, los valores encontrados en este trabajo para las tasas de acumulación de materia seca en los cultivares

Arbequina (0,025 g/100 ºCd) y Arauco (0,10 g/100 ºCd) se asemejan a las tasas máximas informadas por Rondanini et al. (2014) para estos cultivares. La tasa observada en el cv. Manzanilla (0,065 g/100 ºCd), en tanto, es marcadamente inferior a la obtenida por estos autores para el cv. Manzanilla Fina.

En los cultivares Arbequina y Manzanilla los frutos alcanzan el peso seco (Fig. 13) constante a los 185 y 200 DDPF, respectivamente. En el primer caso, la acumulación de materia seca se estabiliza en un valor cercano a 0,90 g/fruto, el cual resulta muy similar al valor máximo promedio (0,92 g/fruto) reportado por Rondanini et al. (2014) para esta misma variedad. Para el cv. Manzanilla se alcanza un valor (1,70 g/fruto) menor que el peso seco máximo (1,96 g/fruto) registrado por estos investigadores para el cv. Manzanilla Fina. En el cv. Arauco, la máxima acumulación de materia seca (3,40 g/fruto) se logra aproximadamente a los 200 DDPF, y resulta superior al valor promedio (2,98 g/fruto) obtenido por los mismos investigadores en distintos ambientes de cultivo en la provincia de La Rioja. Si se considera el periodo de acumulación en función del TTA desde el inicio de la fase fenológica de plena floración y hasta la fecha de máxima acumulación de materia seca o bien hasta el momento a partir del cual los frutos alcanzan el peso seco constante, la duración de aquél asume valores próximos a 3225 ºCd (Arbequina), 3467 ºCd (Manzanilla) y 3492 ºCd (Arauco).

En los cultivares Arbequina y Manzanilla los primeros cambios en la pigmentación de la epidermis de los frutos, que marcan el inicio del periodo de maduración, tienen lugar en forma casi simultánea, aproximadamente entre los 110 y 120 DDPF, correspondientes a 2090 - 2145 °Cd (Fig. 14). El progreso de la maduración sigue patrones similares, con dos fases de incremento rápido interrumpidas por un breve periodo de menor intensidad. En ambos cultivares, la madurez fisiológica (considerada como el peso seco máximo acumulado) se alcanza antes del inicio del envero (IM comprendido entre 2 y 3). En el cv. Arauco, el inicio de la maduración se produce aproximadamente a los 140 DDPF (2670 °Cd), lográndose la madurez fisiológica en frutos en envero.

Figura 12: Evolución del peso fresco de los frutos (g/fruto) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y las mediciones se realizaron en 50 frutos/árbol.

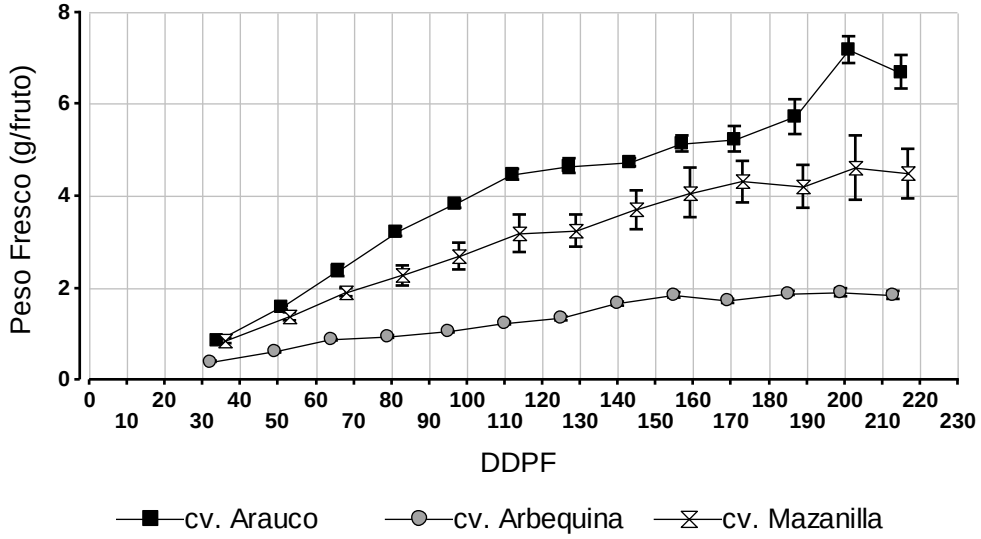


Figura 13: Dinámica de la acumulación de materia seca (g/fruto) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

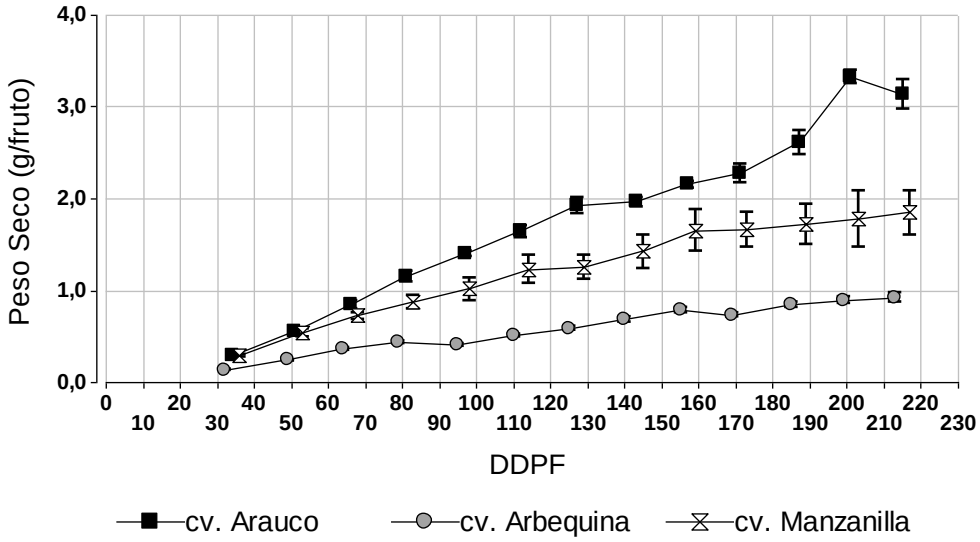


Tabla 8: Aplicación de modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para componentes de rendimiento y parámetros celulares de frutos de los cultivares Arbequina, Manzanilla y Arauco cultivados en EEA-INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración. Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Para cada parámetro analizado, las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cultivares ($p \leq 0,05$).

Parámetro	**Cultivar**	**Tasa de cambio**	**R^2**
Peso seco (g/100 °Cd)	Arbequina	$0,025^{b}$	0,81
	Arauco	$0,10^{a}$	0,81
	Manzanilla	$0,065^{b}$	0,81
Área celular (μm^2/100 °Cd)	Arbequina	120^{b}	0,67
	Arauco	156^{a}	0,67
	Manzanilla	115^{b}	0,67
Área oleosomas (μm^2/100 °Cd)	Arbequina	$40,3^{b}$	0,54
	Arauco	$51,9^{a}$	0,54
	Manzanilla	$41,3^{b}$	0,54
Contenido de aceite (SBS) (%/100 °Cd)	Arbequina	$1,80^{a}$	0,90
	Arauco	$1,80^{a}$	0,90
	Manzanilla	$1,60^{a}$	0,90

Tabla 9: Coeficientes de correlación de Pearson entre el tiempo térmico acumulado y parámetros de rendimiento, histo-químicos y químicos de frutos y aceites de los cultivares Arauco, Arbequina y Manzanilla cultivados en EEA-INTA San Juan. Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. * Valores significativos ($p \leq 0,05$); ** valores altamente significativos ($p \leq 0,01$).

	Cultivar		
Parámetro	**Arauco**	**Arbequina**	**Manzanilla**
Materia seca	0,87**	0,81**	0,61**
Área celular	0,85**	0,78**	0,81**
Área de oleosomas	0,76**	0,66**	0,70**
Contenido de aceite	0,93**	0,94**	0,88**
Ácido palmítico	- 0,37*	- 0,37*	- 0,73**
Ácido palmitoleico	0,86**	0,84**	0,29*
Ácido esteárico	- 0,16	- 0,63**	0,20
Ácido oleico	0,37*	0,15	0,63**
Ácido linoleico	0,02	0,38*	0,38*
Ácido linolénico	- 0,70**	- 0,66**	- 0,69**
α-Tocoferol	- 0,82**	- 0,78**	- 0,73**
β-Tocoferol	- 0,24	- 0,53*	- 0,54*
γ-Tocoferol	- 0,65**	- 0,50*	- 0,57*
Tocoferoles totales	- 0,83**	- 0,78**	- 0,69**
Escualeno	0,06	- 0,42*	- 0,11
Fenoles totales	- 0,63**	- 0,54*	- 0,78**

Estudios realizados en las primeras semanas del desarrollo han demostrado la influencia tanto de la expansión como de la división celular sobre el crecimiento del fruto del olivo (Rallo y Rapoport 2001). Manrique et al. (1999) establecieron una pauta general de crecimiento del fruto en el cv. Picual y la contribución de la expansión celular y número de células al crecimiento del mesocarpo con posterioridad a la octava semana de crecimiento, encontrando un incremento en el tamaño celular superior al 60 % y cercano al 15 % en el número de células. La Figura 15 muestra la evolución del tamaño de las células en cortes transversales de la sección media del

mesocarpo. En los cultivares Arbequina y Manzanilla, los patrones observados resultan similares. Desde etapas tempranas del desarrollo, el área celular experimenta un incremento sostenido hasta llegar a valores constantes comprendidos entre 4300 y 4500 μm^2, a los 150 - 160 DDPF (2800 - 2900 ºCd). En el cv. Arauco, la expansión del tamaño de las células abarca un periodo más dilatado llegando a valores próximos a 5500 μm^2 en frutos cosechados luego de 200 DDPF (3492 ºCd). Estos resultados coinciden parcialmente con datos obtenidos por Hammani et al. (2011) quienes han registrado valores de área celular que varían entre 4500 y 5000 μm^2 en cultivares cuyos frutos difieren ampliamente en el tamaño, cosechados a las 32 semanas posteriores a la plena floración. Estos autores sostienen que independientemente de las dimensiones del fruto, el área celular presenta escasas variaciones entre cultivares, siendo las diferencias de tamaño debidas principalmente al número de células. En relación a la dinámica que sigue el aumento del tamaño celular, los mismos autores observan una marcada aceleración entre las 8 y las 20 - 24 semanas después de plena floración (equivalentes a 56 y 140 - 168 DDPF, respectivamente). Esto coincide con los datos obtenidos en los tres cultivares analizados en esta tesis, en los cuales el incremento es mayor entre los 50 y 150 DDPF.

Los datos obtenidos en el presente trabajo muestran una correlación positiva entre el área promedio de las células del mesocarpo y el peso de los frutos (Arbequina, r = 0,69; Manzanilla r = 0,53; Arauco, r = 0,79) y entre dicha área y las dimensiones de los frutos (diámetro longitudinal y transversal) (Arbequina, r = 0,63; Manzanilla, r = 0,55; Arauco, r = 0,69). Estos datos sugieren también un papel significativo de la expansión celular en la evolución del tamaño de los frutos. En este sentido, Rallo y Rapoport (2001) han observado que si bien el crecimiento inicial del fruto es determinado principalmente por la división celular, a partir de las seis semanas posteriores a la plena floración el aumento de tamaño del fruto se debe exclusivamente al aumento de las dimensiones de las células del mesocarpo.

Figura 14: Evolución del índice de madurez de los frutos en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles y las mediciones se realizaron en 100 frutos/árbol.

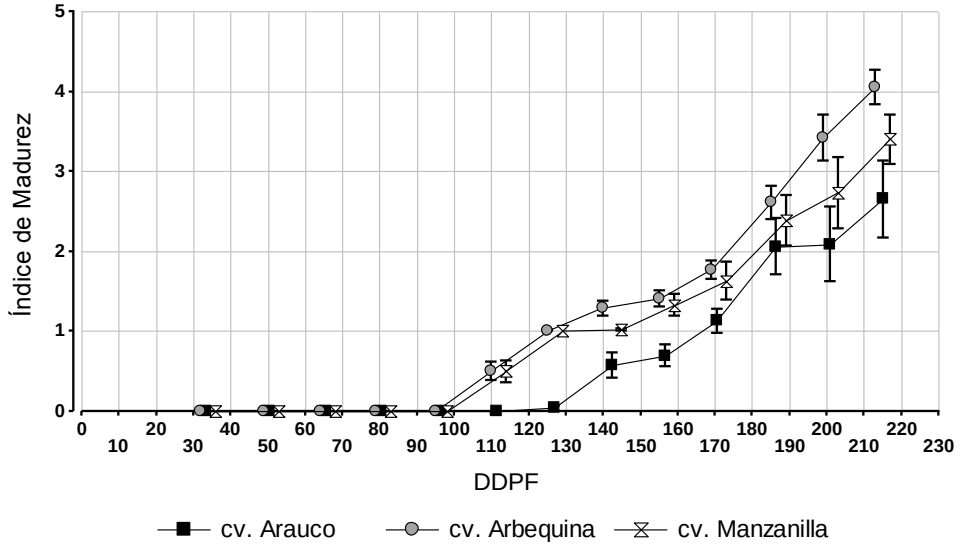
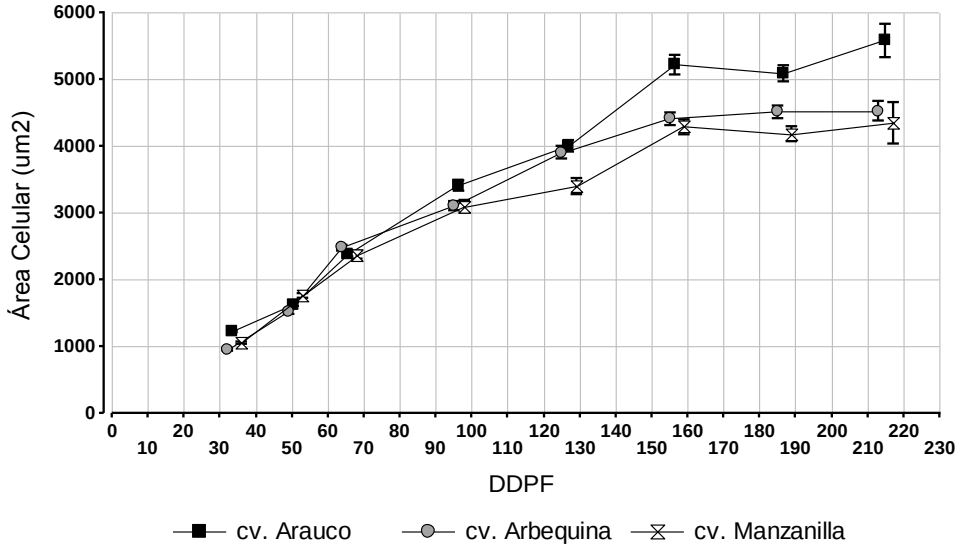


Figura 15: Evolución del tamaño de células (μm^2) en la sección media del mesocarpo de los frutos en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles y las mediciones se realizaron en 10 frutos/árbol.

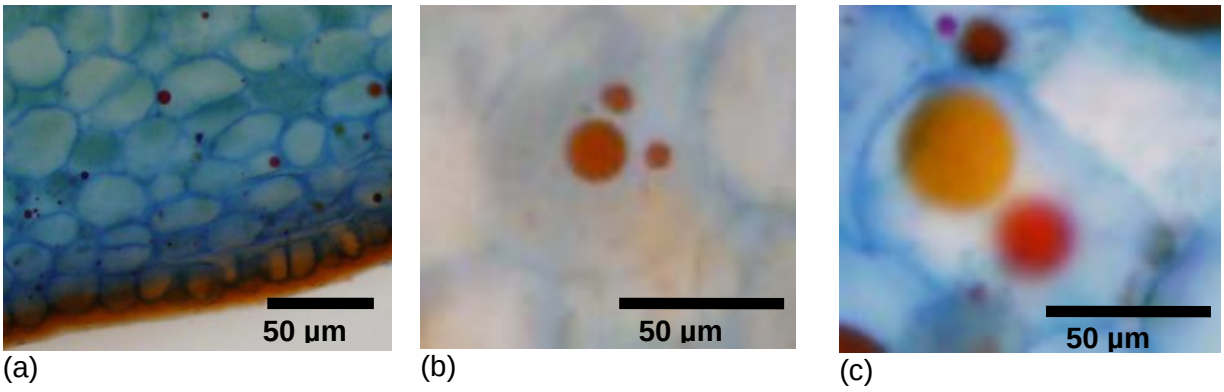


En la Figura 16 se presenta la evolución de la acumulación de aceite a través de la formación de oleosomas, mediante la observación al microscopio óptico de cortes transversales del mesocarpo. La sucesión temporal y duración de los eventos que se detallan ocurrieron de manera similar en los tres cultivares, observándose diferencias sólo en el tamaño final de los glóbulos de aceite (Figs. 16 y 17).

La acumulación de aceite se observa a partir de fases muy tempranas: en drupas cosechadas a los 33 DDPF (carga térmica acumulada de 530 ºCd), la biogénesis del aceite se evidencia por la aparición de uno o dos pequeños oleosomas por célula (Fig. 16 a). En drupas jóvenes (hasta aprox. 50 DDPF), la formación de oleosomas se visualiza principalmente en células del exocarpo (tejido subyacente a la epidermis). Este hecho sugiere que en estadios tempranos del crecimiento del fruto, este tejido muestra mayor actividad que el mesocarpo en la biogénesis del aceite. Estas observaciones se sustentan, a su vez, en estudios realizados por Salas et al. (2000) quienes han observado que las células del exocarpo son capaces de sintetizar diferentes glicerolípidos mediante la fijación del CO_2 atmosférico en sus propios cloroplastos. La formación de pequeños oleosomas ocurre continuamente durante el crecimiento del fruto y su fusión origina glóbulos de mayor tamaño (Figs. 16 b-d). Se ha sugerido que la ausencia de oleosinas en el mesocarpo del fruto del olivo (Murphy, 1993; Ross et al., 1993) favorece la coalescencia de la fase oleosa resultando a la madurez, en la formación de una gota de gran volumen rodeada a veces de cuerpos oleosos pequeños (Rangel et al., 1997; Romano et al., 2004; Matteucci et al., 2011). A medida que el diámetro de los glóbulos se incrementa, el citoplasma circundante se torna más delgado hasta que la interfase que los separa desaparece, produciéndose la fusión por coalescencia (Fig. 16 d). A partir de 150 DDPF (2880 ºCd) el aceite se acumula principalmente como una única gota casi esférica, de hasta 45 µm de diámetro, que ocupa gran parte del volumen de la célula (Fig. 16 e).

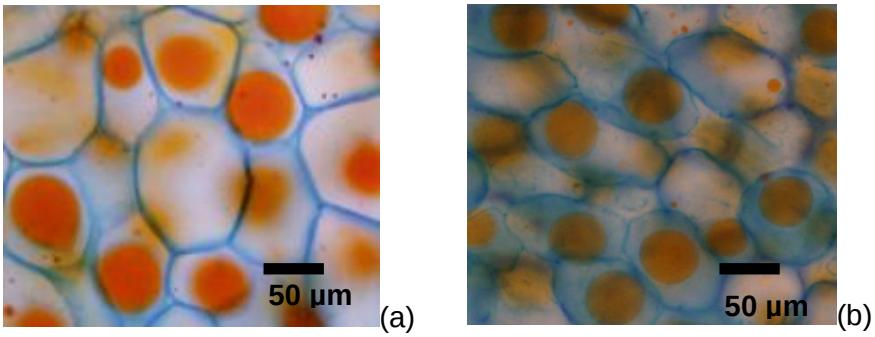
Los cultivares Arbequina y Manzanilla no presentan diferencias en las tasas de incremento del tamaño de oleosomas, las cuales resultan significativamente menores a las del cv. Arauco (Tabla 8). En los dos primeros cultivares, las células del mesocarpo de frutos de más de 150 DDPF presentan glóbulos de aceite que alcanzan un diámetro comprendido entre 30 y 40 µm (Fig. 17). En los tres cultivares el área de los oleosomas presenta correlación positiva, altamente significativa, con la carga térmica acumulada (Tabla 9).

Figura 16: Formación de oleosomas en células del mesocarpo de frutos (cv. Arauco) en distintos estadios de desarrollo. a) 33 DDPF, b) 65 DDPF: la formación del aceite se visualiza por la presencia de uno, a veces dos o tres pequeños oleosomas por célula. c) 80 DDPF, d) 96 DDPF: Formación de glóbulos de aceite por coalescencia y fusión de oleosomas. e) 156 DDPF: detalle de una célula del mesocarpo con un único glóbulo de aceite, de forma casi esférica y de aproximadamente 45 µm de diámetro.



(a) (b) (c) (d) (e)

Figura 17: Células del mesocarpo, conteniendo un único glóbulo de aceite, de frutos obtenidos luego de 150 DDPF. a) cv. Arbequina, b) cv. Manzanilla.



(a) (b)

Contenido de aceite

La biogénesis del aceite en el fruto del olivo involucra un proceso de larga duración. En general se asume que la dinámica de acumulación sigue un patrón de tipo sigmoide, con un periodo de síntesis intensa posterior a la fase de endurecimiento del endocarpo y una contribución de menor cuantía durante la maduración (Conde et al., 2008). La mayor parte de la información disponible a este respecto ha sido generada por estudios llevados a cabo en las distintas regiones productoras de olivo del hemisferio norte, ubicadas casi exclusivamente en los países ribereños de la cuenca del mar Mediterráneo, donde la fenología del cultivo es diferente respecto de la observada en las principales zonas de producción de Argentina (Searles et al., 2011).

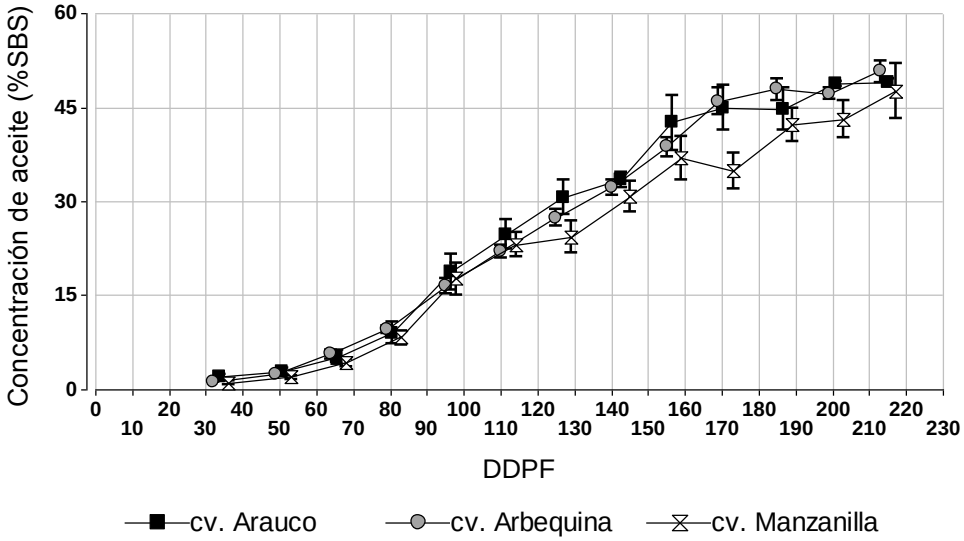
En los últimos años, investigaciones realizadas en la regiones NOA y Cuyo (Trentacoste et al., 2010, 2012; Rondanini et al., 2011, 2014; García-Inza et al., 2014) han revelado una amplia diversidad entre cultivares en sus patrones de comportamiento en lo que hace al crecimiento de frutos y su relación con el contenido y composición de los aceites.

En el ambiente y bajo las condiciones de cultivo empleadas en el presente estudio, la dinámica de acumulación de aceite en los tres cultivares evaluados (Tabla 8), muestra que en frutos obtenidos hasta los 110 DDPF (aproximadamente 2100 ºCd), la evolución del contenido de aceite (Fig. 18) no presenta diferencias estadísticamente significativas entre los cultivares. En los primeros estadios de desarrollo, hasta los 60 – 70 DDPF (TTA entre 1138 - 1187 ºCd), se registra una baja tasa de síntesis. La etapa de mayor acumulación tiene lugar luego de la finalización de la fase de endurecimiento del endocarpo, en el periodo comprendido entre 80 y 160 - 170 DDPF (1480 - 3100 ºCd). Posteriormente, la biogénesis de aceite se ralentiza y su concentración se estabiliza (no registra diferencias significativas) en valores comprendidos entre 48 - 51 g/100 g fruto SBS (cv. Arbequina) y entre 42 - 46 g/100 g fruto SBS (cv. Arauco). En el cv. Manzanilla se logran valores entre 44 – 47 g/100 g fruto SBS, sin diferencias significativas a partir de los 190 DDPF (3274 ºCd). Al contrastar estos datos con el estado de madurez de los frutos (Fig.14), se observa que el contenido máximo de aceite se alcanza con IM comprendidos entre 1 y 2 (cultivares Arbequina y Arauco) y entre 2 y 3 (cv. Manzanilla). La correlación entre la concentración de aceite y el TTA resulta positiva y altamente significativa (Tabla 9).

Al analizar las tasas de acumulación de aceite en función del TTA (% SBS/100 ºCd), se obtienen valores de 1,6 (Manzanilla) y 1,8 (Arbequina y Arauco) sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8). Vistos en su conjunto, estos valores están comprendidos dentro del rango (1 - 2 % SBS/100 ºCd) informado por Rondanini et al. (2014) en diversos genotipos y ambientes de la provincia de La Rioja. En particular, la tasa observada en los cultivares Arbequina y Arauco (1,8 % SBS/100 ºCd) resulta más elevada que las tasas máximas de acumulación (promedio de dos ciclos de cultivo) registradas por estos autores (1,4 % SBS/100 ºCd, Arbequina; 1,65 % SBS/100 ºCd, Arauco). Por otra parte, la tasa obtenida en el cv. Manzanilla (1,6 % SBS/100 ºCd) coincide con la registrada en frutos de ´Manzanilla Fina´.

Rondanini et al. (2014) determinaron, asimismo, que la tasa tiene mayor importancia que la duración del periodo de acumulación a los fines de explicar las diferencias en la concentración de aceite de los frutos de distintos genotipos. Por el contrario, Trentacoste et al. (2012) han observado que las variaciones en el contenido máximo de aceite durante la ontogenia del fruto se deben principalmente a la duración del periodo de síntesis. Al considerar éste último en función del TTA a partir de DDPF hasta concentración de aceite constante, se observa que el cv. Manzanilla presenta un valor significativamente mayor (3274 ºCd) que aquellos de los cultivares Arbequina (3072 ºCd) y Arauco (2885 ºCd). En su conjunto, estos valores están por encima del rango (2425 – 2866 ºCd) observado por Trentacoste et al. (2012) en numerosas variedades de olivo cultivadas en la provincia de Mendoza, pero, por el contrario, resultan inferiores a los encontrados por Rondanini et al. (2014) en la provincia de La Rioja. En particular, estos últimos investigadores han informado periodos de acumulación de aceite superiores a 3500 ºCd en los cultivares Arauco y Arbequina.

Figura 18: Dinámica de la acumulación de aceite (g/100 fruto, según base seca) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles.



Composición de ácidos grasos

Con el objetivo de analizar el aporte relativo de la semilla y la pulpa a la biogénesis del aceite en drupas jóvenes, se analizó la composición de ácidos grasos en ambos tejidos comparándola con la del fruto completo (Tabla 10). Los datos obtenidos no muestran diferencias cualitativas entre los tejidos mencionados. Aunque existen algunas diferencias cuantitativas entre cultivares, en general se observa que la composición presente en la pulpa se asemeja a la encontrada en el fruto completo. A los 50 DDPF (equivalentes a 820 - 870 ºCd) la composición de ácidos grasos no registra variaciones estadísticamente significativas entre estas dos matrices. No hay registros de antecedentes bibliográficos sobre composición del aceite de los distintos componentes del fruto en fases inmaduras. Un estudio realizado por Moghaddam et al. (2012) en seis cultivares de olivo, con frutos de IM comprendidos entre 2 y 3, registra escasas variaciones entre aceites obtenidos de pulpa y semilla. Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que antes del inicio del periodo de endurecimiento del endocarpo, la composición de ácidos grasos del fruto refleja la observada en la pulpa. Este hecho indica una contribución mayoritaria de este último tejido a la biogénesis del aceite desde fases tempranas del desarrollo de los frutos.

Sobre la base de los resultados señalados en el párrafo precedente, se llevó a cabo el estudio de la evolución de la composición acídica de los aceites extraídos a partir de los frutos completos. Esta determinación responde también a la finalidad de comparar los resultados con datos bibliográficos y emular las condiciones, en cuanto a materia prima se refiere, empleadas en la industria oleícola. Las figuras 19 - 24 muestran la evolución del contenido de los ácidos grasos (AG) principales de los aceites analizados.

Tabla 10: Composición de ácidos grasos (% respecto del total de ácidos grasos) de semilla, pulpa (mesocarpo + epicarpo) y fruto completo en estadios tempranos del desarrollo de tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Las muestras de frutos fueron recolectadas durante el ciclo de cultivo 2010/11.

Ácidos grasos (%)	**33 DDPF**			**50 DDPF**		
cv. Arauco	**Semilla**	**Pulpa**	**Fruto entero**	**Semilla**	**Pulpa**	**Fruto entero**
Palmítico	$21,5^{a} \pm 0,34$	$24,6^{b} \pm 0,45$	$25,8^{b} \pm 0,39$	$19,2^{b} \pm 0,19$	$16,8^{a} \pm 0,24$	$17,6^{a} \pm 0,22$
Palmitoleico	$0,57^{b} \pm 0,10$	$0,31^{a} \pm 0,07$	$0,43^{b} \pm 0,09$	$2,87^{b} \pm 0,14$	$0,46^{a} \pm 0,08$	$0,51^{a} \pm 0,09$
Esteárico	$7,78^{b} \pm 0,25$	$3,89^{a} \pm 0,23$	$3,55^{a} \pm 0,16$	$4,74^{b} \pm 0,19$	$2,71^{a} \pm 0,16$	$2,51^{a} \pm 0,16$
Oleico	$22,3^{a} \pm 0,28$	$24,3^{b} \pm 0,31$	$28,1^{c} \pm 0,36$	$28,6^{a} \pm 0,42$	$69,6^{b} \pm 1,23$	$67,1^{b} \pm 1,02$
Linoleico	$37,0^{b} \pm 0,77$	$23,8^{a} \pm 0,58$	$23,2^{a} \pm 0,54$	$39,2^{a} \pm 0,87$	$6,33^{b} \pm 0,21$	$7,35^{b} \pm 0,37$
Linolénico	$10,8^{a} \pm 0,51$	$23,1^{c} \pm 0,86$	$18,0^{b} \pm 0,53$	$4,77^{a} \pm 0,27$	$3,32^{a} \pm 0,14$	$4,30^{a} \pm 0,22$
cv. Manzanilla						
Palmítico	$26,3^{b} \pm 0,80$	$23,4^{a} \pm 3,06$	$22,7^{a} \pm 2,41$	$21,5^{b} \pm 3,96$	$17,0^{a} \pm 1,24$	$18,2^{a} \pm 3,34$
Palmitoleico	$2,95^{b} \pm 0,76$	$0,85^{a} \pm 0,08$	$1,09^{a} \pm 0,29$	$2,3^{b} \pm 0,02$	$0,71^{a} \pm 0,10$	$0,60^{a} \pm 0,16$
Esteárico	$8,39^{b} \pm 0,51$	$4,59^{a} \pm 2,18$	$3,09^{a} \pm 0,26$	$5,91^{b} \pm 2,89$	$1,90^{a} \pm 0,10$	$2,43^{a} \pm 0,73$
Oleico	$47,9^{b} \pm 2,50$	$36,2^{a} \pm 2,30$	$34,3^{a} \pm 1,30$	$29,5^{a} \pm 2,8$	$69,7^{b} \pm 2,15$	$63,7^{b} \pm 7,48$
Linoleico	$12,6^{a} \pm 2,90$	$24,9^{b} \pm 8,20$	$20,6^{b} \pm 0,04$	$35,4^{b} \pm 6,15$	$6,95^{a} \pm 0,91$	$8,95^{a} \pm 2,86$
Linolénico	$1,76^{a} \pm 0,06$	$9,52^{b} \pm 3,53$	$16,9^{c} \pm 0,49$	$4,62^{a} \pm 2,13$	$3,10^{a} \pm 0,10$	$5,39^{a} \pm 2,83$
cv. Arbequina						
Palmítico	$34,3^{c} \pm 1,50$	$21,7^{a} \pm 2,34$	$27,0^{b} \pm 3,45$	$21,9^{b} \pm 3,98$	$17,5^{a} \pm 0,63$	$17,6^{a} \pm 0,35$
Palmitoleico	$4,54^{b} \pm 1,17$	$0,98^{a} \pm 0,21$	$0,97^{a} \pm 0,58$	$1,93^{b} \pm 0,18$	$0,68^{a} \pm 0,07$	$0,80^{a} \pm 0,07$
Esteárico	$12,4^{b} \pm 2,01$	$3,56^{a} \pm 1,02$	$4,58^{a} \pm 2,26$	$5,62^{b} \pm 1,32$	$2,07^{a} \pm 0,14$	$1,86^{a} \pm 0,09$
Oleico	$23,3^{a} \pm 4,20$	$22,7^{a} \pm 2,53$	$33,9^{b} \pm 6,36$	$28,9^{b} \pm 2,90$	$69,2^{a} \pm 0,05$	$68,5^{a} \pm 1,82$
Linoleico	$20,3^{a} \pm 3,60$	$22,2^{a} \pm 2,72$	$19,7^{a} \pm 1,62$	$34,5^{b} \pm 3,64$	$7,02^{a} \pm 0,15$	$7,56^{a} \pm 1,11$
Linolénico	$5,09^{a} \pm 1,25$	$28,0^{c} \pm 1,90$	$12,8^{b} \pm 0,60$	$6,36^{b} \pm 1,30$	$2,96^{a} \pm 0,48$	$3,02^{a} \pm 0,31$

Referencias: DDPF, días posteriores a la fase fenológica de plena floración. Valores medios (n = 5) ± desvío estandar. Para cada fecha (DDPF) analizada los valores medios de cada ácido graso seguidos de letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

El patrón general de variación de la concentración de los AG saturados presenta tendencias similares en los tres cultivares (Figs. 19 y 20). En etapas tempranas del desarrollo de los frutos y hasta aproximadamente 60 – 70 DDPF (equivalentes a 1140 - 1190 ºCd) se observa una disminución rápida de sus concentraciones. En este periodo, el contenido de ácido palmítico se reduce desde valores comprendidos entre 27 – 30 % a concentraciones próximas al 18 %. Posteriormente, su contenido no registra variaciones significativas (cultivares Arbequina y Arauco) o disminuye gradualmente hasta valores cercanos al 12 % (cv. Manzanilla). Para el ácido esteárico (Fig. 20) se observan reducciones que van de 3,8 a 2,3 % (cv. Arauco, 60 – 70 DDPF), de 3,6 a 1,6 % (cv. Arbequina) y de 3,4 a 1,8 % (cv. Manzanilla); en estos dos últimos casos el menor valor se alcanza aproximadamente a los 80 DDPF (aprox. 1500 ºCd). En el cv. Arbequina, en etapas posteriores del desarrollo y hasta las fases de maduración evaluadas, no se observan diferencias estadísticamente significativas en sus concentraciones. Por el contrario, en los cultivares Arauco y Manzanilla, se registran aumentos significativos que resultan en concentraciones próximas al 3 % (Arauco) y 2,5 % (Manzanilla) a los 215 DDPF, con TTA entre 3500 y 3600 ºCd. Al relacionar el TTA con el contenido de cada uno de los ácidos grasos saturados, se obtienen correlaciones negativas, estadísticamente significativas, para el ácido palmítico en los tres cultivares, y para el ácido esteárico sólo en el cv. Arbequina (Tabla 9).

Al considerar las concentraciones de cada uno de los ácidos saturados desde el inicio de la madurez, se observa que las mismas se mantienen dentro de los rangos establecidos por el COI (7,5 – 20 % para el ácido palmítico, 0,5 – 5 % para el ácido esteárico) para aceites de oliva extra virgen.

En general, las tendencias mencionadas anteriormente difieren parcialmente de aquellas descriptas para cultivares como Chétoui, Chemlali, Gordal sevillana (Baccouri et al., 2008; Menz y Vriesekoop, 2010), en los cuales los niveles de los dos ácidos saturados disminuyen durante la maduración de los frutos. Gómez-González et al. (2011) han observado asimismo que, en los cultivares Arbequina y Manzanilla, la suma de las concentraciones de ambos ácidos saturados muestra una tendencia decreciente durante la maduración. Por su parte, Rondanini et al. (2014) detectaron un leve aumento (del 15 al 20 %) en el contenido de ácido palmítico del aceite de los

cultivares Arbequina y Arauco; el mismo tuvo lugar a partir de los 1000 ºCd y hasta los 3500 °Cd, momento a partir del cual se mantuvo constante.

En relación a la evolución del contenido de ácido palmitoleico (Fig. 21), el cual se forma a expensas del ácido palmítico, en los cultivares Arauco y Arbequina se presentan tendencias crecientes, prácticamente lineales, hasta los 200 DDPF. En el cv. Manzanilla se observa un patrón errátil con variaciones que oscilan entre 0,9 y 1,4 %. En todos los casos, la concentración de ácido palmítico se correlaciona significativamente, en forma positiva, con la carga térmica acumulada, alcanzándose los máximos valores (2,3 %, Arbequina; 1,7 %, Arauco; 1,4 %, Manzanilla) con TTA comprendidos entre 3400 y 3500 ºCd.

La dinámica de acumulación del ácido oleico (Fig. 22) se ajusta satisfactoriamente a un modelo de regresión bi-lineal con dos fases netamente definidas (Tabla 11). Cuando la concentración se analiza en función del TTA, se registran elevadas tasas de incremento (5,9 – 6,4 %/100 ºCd), sin diferencias significativas entre cultivares, resultando en porcentajes cercanos al 70 % antes del inicio del inicio del período de maduración de los frutos, aproximadamente a los 80 – 85 DDPF (Tabla 12). En los tres cultivares, la máxima concentración se alcanza con valores muy similares de carga térmica acumulada (1453 ºCd, Arbequina; 1470 ºCd, Arauco; 1502 ºCd, Manzanilla). En consecuencia, tomando en consideración los datos de esta primer fase de incremento, la evolución del contenido de ácido oleico fueron similares entre cultivares. Posteriormente, se observan dos tendencias disímiles: mientras en el cv. Manzanilla la concentración se mantiene prácticamente constante (entre 70 - 72 %), en los cultivares Arbequina y Arauco disminuye gradualmente y se estabiliza en valores próximos al 60 % luego de 185 DDPF (3200 ºCd). Analizada en su conjunto, la evolución del contenido de ácido oleico en cada uno de los cultivares se correlaciona positivamente con el TTA, aunque la correlación sólo es significativa en los cultivares Arauco y Manzanilla (Tabla 9).

En general, los resultados mencionados en el párrafo anterior coinciden con datos obtenidos por Rondanini et al. (2014) en diversas variedades de olivo cultivadas en la provincia de La Rioja. Estos investigadores observaron que durante el desarrollo del fruto el ácido oleico alcanza valores similares, cercanos al 70 %, en el aceite de todas las variedades evaluadas. Sin embargo, su contenido se reduce marcadamente en los cultivares Arbequina y Arauco,

hasta valores por debajo del 50 %. Cuando estos cambios fueron modelados en función del tiempo térmico acumulado, las tasas de disminución obtenidas fueron -0,86 %/100 ºCd (Arauco) y -0,67 %/100 ºCd (Arbequina). Estos valores absolutos son superiores a los encontrados en el presente trabajo (-0,50 %/100 ºCd, Arauco; -0,60 %/100 ºCd, Arbequina; sin diferencias significativas entre sí) (Tabla 12).

Entre los 60 - 70 DDPF y hasta el final del periodo de muestreo evaluado, las concentraciones de ácido oleico en los tres cultivares se mantienen dentro del rango establecido por el COI (55 - 83 %) para aceites de oliva extra virgen.

Beltrán et al. (2008) y Hernández et al. (2009) han observado que durante la primer fase del crecimiento (antes del endurecimiento del endocarpo) los frutos jóvenes se comportan como órganos fotosintéticos, teniendo la capacidad de metabolizar foto-asimilados fijados tanto en hojas como en cloroplastos de los propios frutos (Salas et al., 2000). Se ha sugerido que dicha actividad se produce principalmente en el tejido subyacente a la epidermis, el cual es más activo que el mesocarpo en la síntesis de ácidos grasos poli-insaturados (Hernández et al., 2009). En drupas muy jóvenes (30 - 35 DDPF, 515 - 565 ºCd), las proporciones de los dos ácidos poli-insaturados es relativamente alta (20 – 22 % para ácido linoleico, 14 – 17 % para ácido linolénico, Figs. 23 y 24, respectivamente). A continuación, experimentan una disminución rápida y abrupta hasta llegar a valores entre 6 – 8 % (ácido linoleico) y entre 1,2 – 1,5 % (ácido linolénico), aproximadamente a los 80 DDPF. Posteriormente, la concentración del ácido linoleico se incrementa de manera casi lineal, aunque con tasas de acumulación que difieren sinificativamente entre los cultivares. De esta manera, la evolución que experimenta el contenido de este ácido graso sigue una curva en forma de V con mínimos que coinciden con la finalización de la fase de endurecimiento del endocarpo. En el caso del ácido linolénico, en el lapso comprendido entre 80 y 130 DDPF, tiene lugar una disminución leve pero estadísticamente significativa. Posteriormente, las concentraciones se mantienen estables con valores por debajo del 1 %. La correlación entre el contenido de ácido linoleico y el TTA resulta positiva y estadísticamente significativa en los cultivares Arbequina y Manzanilla. En el caso del ácido linolénico se obtiene una correlación negativa, altamente significativa, en los tres cultivares (Tabla 9).

Al modelar la dinámica de los cambios en el contenido de ambos ácidos grasos poli-insaturados en función del TTA, el mejor ajuste se logra utilizando regresiones bi-lineales (R^2 = 0,74 para el ácido linoleico, R^2 = 0,77 para el ácido linolénico) (Tablas 11 y 12). En el primer caso, la tasa de disminución registra valores entre -2,10 y -2,30 %/100 ºCd), sin diferencias estadísticamente significativas entre cultivares. Por el contrario, la tasa de incremento es significativamente mayor en los cultivares Arbequina y Arauco (0,40 – 0,50 %/100 ºCd) con respecto a la observada en el cv. Manzanilla (0,10 %/100 ºCd). En consecuencia, la evolución de los cambios en la concentración del ácido linoleico es afectada fundamentalmente por su tasa de acumulación a partir de la fase fenológica posterior al endurecimeinto del endocarpo. Este comportamiento, a su vez, es dependiente de la tasa de conversión de oleato en linoleato, si se asume que la misma corresponde a la tasa de disminución del ácido oleico (segunda fase de la curva, Tabla 11), la cual muestra un valor significativamente menor en el cv. Manzanilla.

Por otra parte, para el ácido linolénico, en cada una de las fases del modelo se obtienen tasas de cambio que no difieren significativamente entre cultivares.

La tendencia opuesta entre las concentraciones de los ácidos oleico y linoleico, está ampliamente documentada en lípidos de reserva de semillas (Maestri et al., 1998; Martínez y Maestri, 2008; Werteker et al., 2010), también se observa claramente en el fruto del olivo (De la Rosa et al., 2013; Rondanini et al., 2014). Al considerar los datos en cada uno de los tres cultivares analizados, la evolución de las concentraciones de ambos ácidos grasos se ajusta a regresiones lineales con valores de R^2 comprendidos entre 0,69 y 0,78 (Fig. 25). Cuando se relacionan las concentraciones obtenidas en cada uno de los cultivares, se obtienen coeficientes de correlación negativos, altamente significativos ($p \leq 0,01$), comprendidos entre -0,85 y - 0,89.

La relación entre la concentración de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) se presenta en la Figura 26. En los cultivares Arbequina y Arauco se presenta un patrón en forma de V invertida con un máximo cercano a los 80 DDPF. En el cv. Manzanilla, al cabo de este tiempo continúa un periodo breve de menor incremento, seguido de una reducción más o menos gradual conforme avanza la madurez. La evolución de esta relación en función de la maduración ha sido analizada recientemente por Dag et al. (2014) en

los cultivares Barnea, Coratina y Picual. Estos autores informan una reducción significativa de la relación AGMI/AGPI en frutos cuyo IM está comprendido entre 1 y 5. Es importante mencionar que un mayor contenido de AGPI puede resultar en aceites con menor estabilidad oxidativa (Gutierrez et al., 1999; Tura et al., 2007) aunque esta característica depende también de la concentración de compuestos con capacidad antioxidante presentes en el fruto.

Figura 19: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmítico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (7,5 – 20 %).

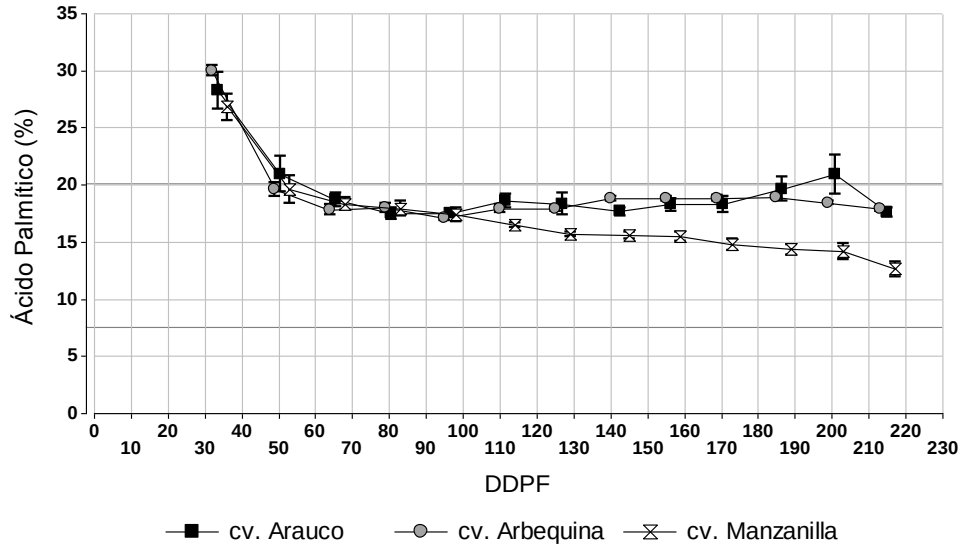


Figura 20: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido esteárico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (0,5 – 5 %).

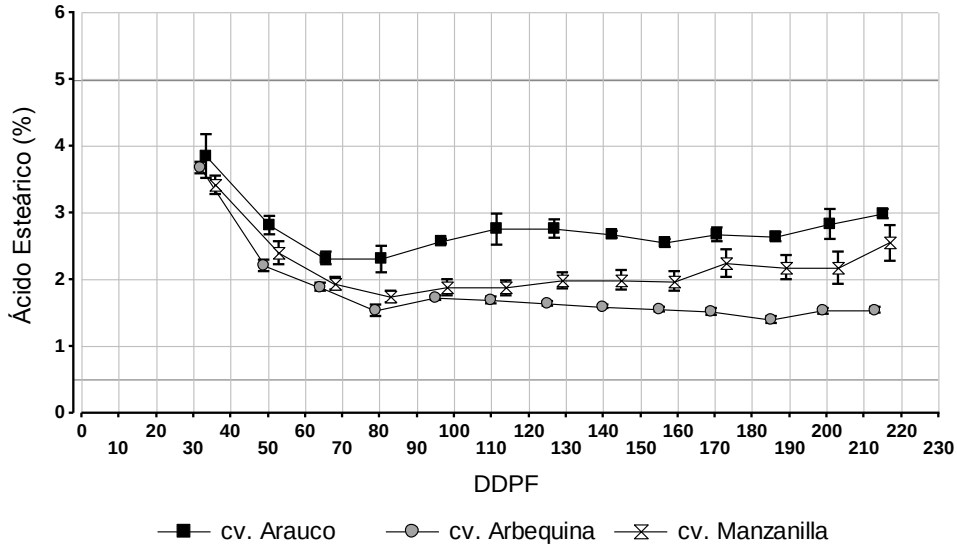


Figura 21: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmitoleico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (0,3 - 3,5 %).

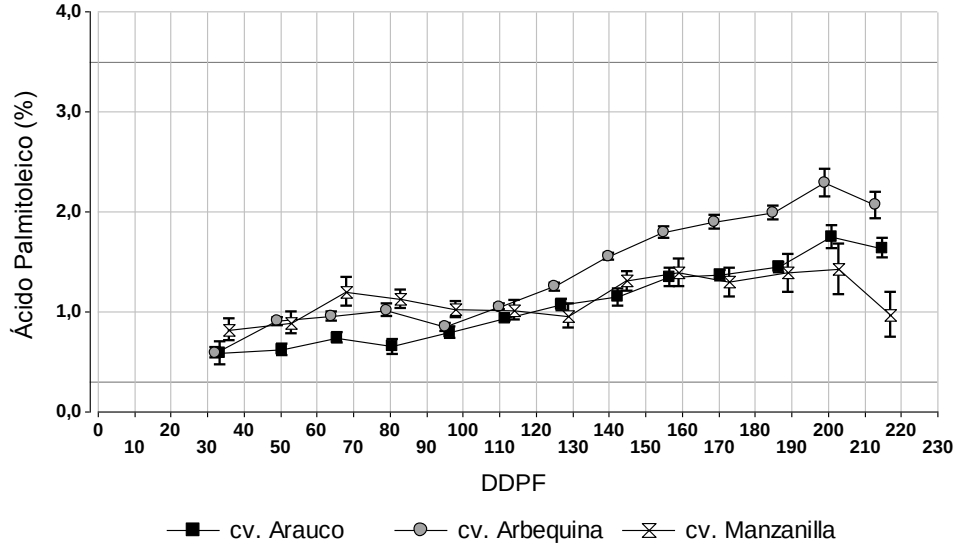


Figura 22: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido oleico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (55 – 83 %).

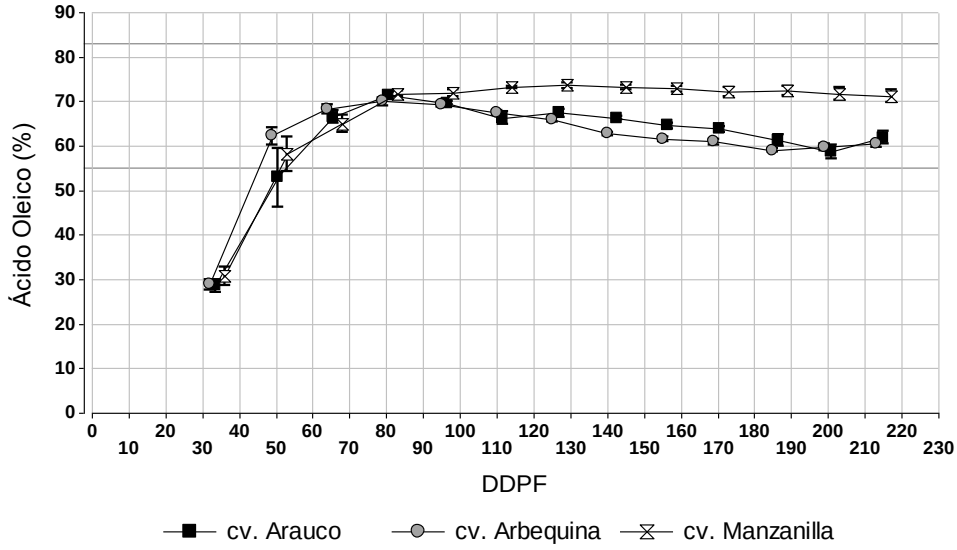


Tabla 11: Análisis de regresión no lineal a dos tramos para algunos componentes químicos del aceite en los cultivares Arbequina, Arauco y Manzanilla cultivados en la EEA-INTA San Juan, en función los días después de plena floración (DDPF). Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Ecuaciones de regresión: *"y= α + $\beta_1 x$* (cuando x < γ); *y= α + β_2 * (x-γ)* (cuando x ≥ γ), siendo: "*y*" la variable dependiente, *α* la constante que indica el valor esperado de *"y"* cuando "*x"*=0, "β_1" es la pendiente en el primer tramo de la curva de acumulación, "β_2" es la pendiente en el segundo tramo de la curva, "γ" es el valor en DDPF del momento de quiebre o "break point", *"x"* es la variable independiente o regresora (DDPF).

Parámetro	Cultivar	α	β1	γ ("Break point")	β2	Valor en el "Break point"(x = γ)
Ácido Palmítico (%)	Arbequina	51,7	-0,66	52,26	8,40E-03	17,55
	Arauco	48,2	-0,55	55,32	9,19E-03	17,64
	Manzanilla	44,4	-0,47	56,00	-2,97E-02	18,25
Ácido Palmitoleico (%)	Arbequina	0,71	2,62E-03	95,00	1,18E-02	0,96
	Arauco	0,61	7,74E-04	78,00	7,72E-03	0,67
Ácido Esteárico (%)	Arbequina	6,71	-9,14E-02	53,92	-2,16E-03	1,78
	Arauco	6,39	-7,18E-02	55,90	2,92E-03	2,38
	Manzanilla	5,31	-5,31E-02	68,03	4,21E-03	1,70
Ácido Oleico (%)	Arbequina	-41,2	2,11	53,36	-8,40E-02	71,19
	Arauco	-16,5	1,32	66,68	-7,72E-02	71,38
	Manzanilla	-10,5	1,20	69,54	-1,92E-03	72,63
Ácido Linoleico (%)	Arbequina	48,2	-0,78	53,64	7,85E-02	6,37
	Arauco	36,3	-0,44	70,33	6,87E-02	5,48
	Manzanilla	35,6	-0,42	73,83	3,26E-02	4,67
Ácido Linolénico (%)	Arbequina	33,4	-0,58	54,15	-1,08E-02	1,87
	Arauco	30,6	-0,41	69,94	-8,07E-03	1,67
	Manzanilla	30,2	-0,40	71,59	-4,23E-03	1,29
Tocoferoles Totales (mg/kg)	Arbequina	11417,0	-146,9	69,03	-7,35E+00	1272,63
	Arauco	5916,3	-55,2	84,70	-6,77E+00	1233,35
	Manzanilla	8268,1	-93,0	79,34	-5,01E+00	883,89
Escualeno (mg/kg)	Arbequina	3896,9	-11,4	138,00	-1,78E+01	2312,68
	Arauco	-7373,6	221,4	91,80	-4,74E+01	12952,03
	Manzanilla	-8719,6	197,1	79,48	-2,23E+01	6949,08

Tabla 12: Aplicación de modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para cada uno de los tramos de la curva para algunos componentes químicos del aceite en los cultivares Arbequina, Arauco y Manzanilla cultivados en la EEA-INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración (DDPF). Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0,05) entre cultivares.

Parámetro	**Cultivar**	**Tasa de cambio** (Primer tramo)	**R^2**	**Tasa de cambio** (Segundo tramo)	**R^2**
Ácido Palmítico	Arbequina	-3,75[b]	0,91	-0,02[b]	0,40
(%/100 °Cd)	Arauco	-2,82[a]	0,91	-0,01[b]	0,40
	Manzanilla	-2,85[a]	0,91	-0,20[a]	0,40
Ácido Palmitoleico	Arbequina	0,01[a]	0,50	0,09[a]	0,73
(%/100 °Cd)	Arauco	0,01[a]	0,50	0,05[a]	0,73
Ácido Esteárico	Arbequina	-0,28[b]	0,74	-0,009[b]	0,60
(%/100 °Cd)	Arauco	-0,25[a]	0,74	0,01[a]	0,60
	Manzanilla	-0,25[a]	0,74	0,03[a]	0,60
Ácido Oleico	Arbequina	6,42[a]	0,78	-0,60[b]	0,80
(%/100 °Cd)	Arauco	6,31[a]	0,78	-0,50[b]	0,80
	Manzanilla	5,91[a]	0,78	0,00001[a]	0,80
Ácido Linoleico	Arbequina	-2,32[a]	0,74	0,53[a]	0,77
(%/100 °Cd)	Arauco	-2,31[a]	0,74	0,42[a]	0,77
	Manzanilla	-2,19[a]	0,74	0,12[b]	0,77
Ácido Linolénico	Arbequina	-1,69[a]	0,77	-0,04[a]	0,60
(%/100 °Cd)	Arauco	-1,99[a]	0,77	-0,04[a]	0,60
	Manzanilla	-1,90[a]	0,77	-0,03[a]	0,60
Tocoferoles Totales	Arbequina	-687[b]	0,80	-46[a]	0,82
(mg/kg/100 °Cd)	Arauco	-418[b]	0,80	-48[a]	0,82
	Manzanilla	-201[a]	0,80	-32[b]	0,82
Escualeno	Arbequina	97[c]	0,86	-90[a]	0,94
(mg/kg/100 °Cd)	Arauco	879[a]	0,86	-256[c]	0,94
	Manzanilla	359[b]	0,86	-175[b]	0,94

Figura 23: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linoleico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (3,5 – 21 %).

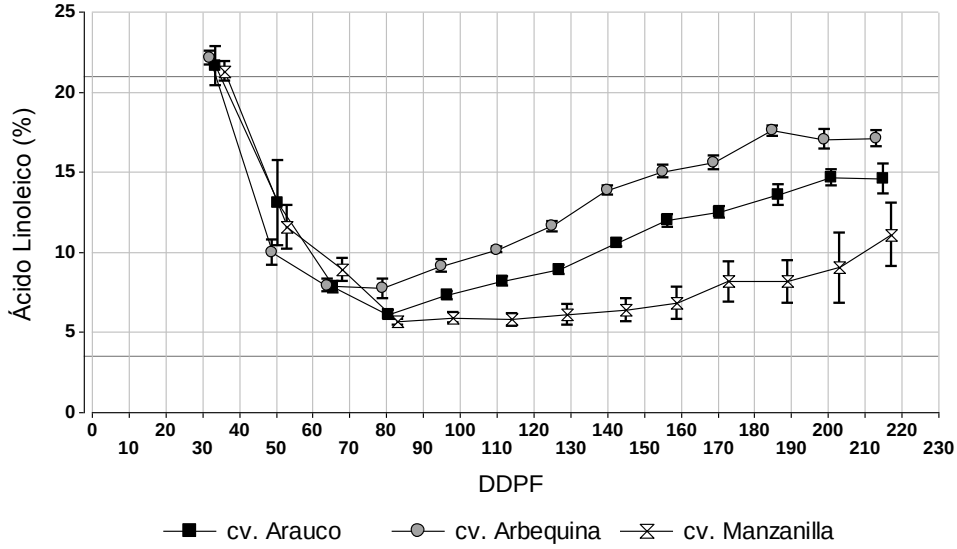


Figura 24: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linolénico en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. La línea horizontal oscura marca el límite establecido por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (≤ 1 %).

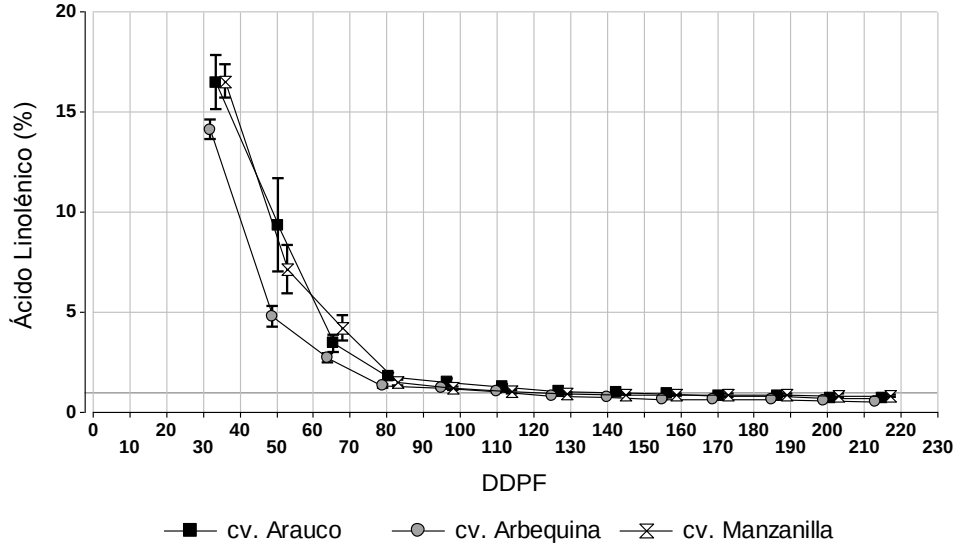


Figura 25: Análisis de regresión lineal entre las concentraciones (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de los ácidos oleico y linoleico en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan ($p \leq 0,05$). Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

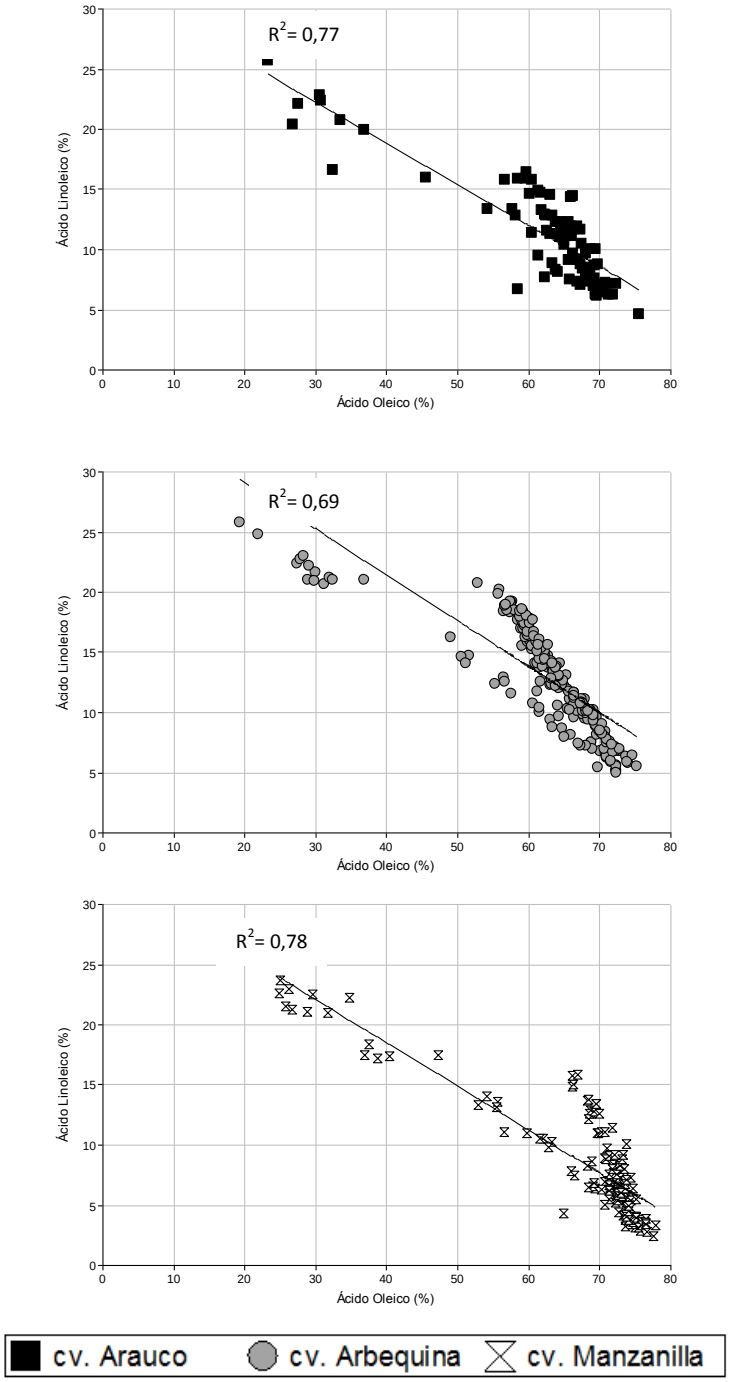
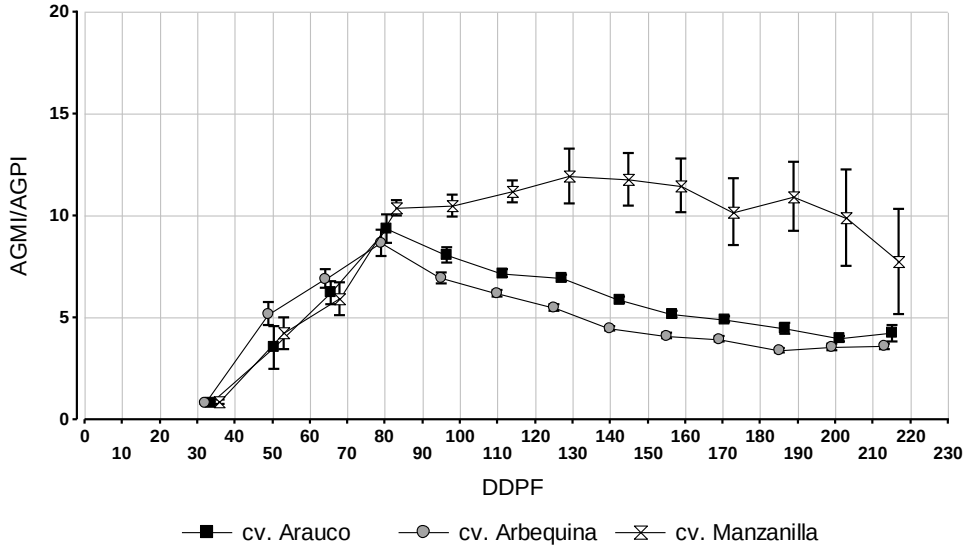


Figura 26: Evolución de la relación entre la concentración de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI), en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF) en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.



Dinámica de los cambios en la composición de glicéridos

Con el objetivo de obtener mayor información sobre el patrón de síntesis y composición del aceite durante la ontogenia del fruto y realizar inferencias acerca de la selectividad de las enzimas (aciltransferasas) que participan, se analizó la dinámica de los cambios en la composición de ácidos grasos de los glicéridos parciales y triglicéridos en el cv Arauco. Para evitar el posible efecto de la actividad de desaturasas y lipasas presentes en la semilla del olivo (Hernández et al., 2005; Panzanaro et al., 2010) el estudio se llevó a cabo con aceites extraídos a partir muestras de la pulpa (mesocarpo + epicarpo).

De acuerdo a Salas et al. (2000), la síntesis de glicéridos, que culmina con la acumulación de oleosomas en las células del mesocarpo, ocurre a través de una serie de cuatro reacciones principales. En la primera de ellas, la acilación del glicerol-3-fosfato da lugar a la formación del ácido lisofosfatídico correspondiente. Esta reacción es mediada por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (G3PAT). Los datos analíticos obtenidos luego del fraccionamiento de las muestras de aceite provenientes de los primeros estadios de desarrollo de los frutos, muestran que la fracción de lisofosfatidato se encuentra marcadamente enriquecida en ácido palmítico (Tabla 13). Esta característica se mantiene en las drupas cosechadas aproximadamente hasta los 50 DDPF (TTA 836 ºCd). Posteriormente, la composición de esta fracción refleja un aumento progresivo del contenido de ácido oleico, el cual sobrepasa al del ácido palmítico antes del comienzo de la fase de endurecimiento del endocarpo, aproximadamente 80 DDPF (1470 ºCd). La enzima G3PAT ha sido aislada y purificada a partir de células del mesocarpo de algunos frutos con alto contenido de aceite (palma, palta) (Eccleston y Harwood, 1995; Chen et al., 2011). El estudio de su actividad ha puesto en evidencia que, si bien es activa frente a una variedad de ácidos grasos, muestra preferencia por palmitato, aunque también puede aceptar oleato, especialmente si éste está presente en concentraciones elevadas (Salas et al., 2000; Conde et al., 2008). Aunque no existen estudios detallados de la especificidad de la enzima G3PAT presente en células del mesocarpo del fruto del olivo, el análisis estereoespecífico de sus glicéridos ha revelado que la posición *sn*-1 (el sitio de actividad de G3PAT) se encuentra esterificado mayoritariamente por estos dos ácidos grasos (Sakohui et al., 2011[a]; Ollivier et al., 2014).

El análisis de la composición de ácidos grasos totales muestra que hasta el inicio de la fase de endurecimiento del endocarpo, la dinámica de acumulación de los ácidos palmítico y oleico presentan tendencias opuestas (Fig. 27). La concentración del primero registra valores próximos al 30 % en drupas obtenidas a los 33 DDPF y disminuye significativamente hasta valores por debajo del 20 % a los 80 DDPF. En este mismo periodo, el contenido de ácido oleico se incrementa casi linealmente hasta alcanzar su máxima concentración (70 %). Si bien las concentraciones iniciales (medidas a los 33 DDPF) de estos ácidos grasos en el aceite total resultan muy similares, la predominancia de ácido palmítico en la fracción de lisofosfatidato constituye una evidencia a favor de la hipótesis que sostiene una mayor selectividad de la enzima G3PAT por el palmitato antes que por el oleato. Sin embargo, a partir de los 80 DDPF, la composición de esta fracción muestra predominio de ácido oleico. Este resultado es concordante con estudios realizados en diversas especies donde se ha observado que G3PAT puede incorporar ácido oleico cuando el mismo alcanza una proporción elevada en el "pool" de ácidos grasos presentes (Harwood, 1998).

Las reacciones que conducen a la formación de diglicéridos involucran la actividad, en forma sucesiva, de las enzimas lisofosfatidato aciltransferasa (LPAAT) y fosfatidato fosfohidrolasa. Mientras la primera de ellas cataliza la incorporación de un nuevo grupo acilo a la posición *sn*-2 del lisofosfatidato, la segunda escinde el enlace éster fosfórico dando lugar a la liberación del correspondiente diacilglicérido. Debido a la especificidad con respecto al ácido graso que incorpora, LPAAT podría tener un papel determinante en la composición del aceite. En la mayor parte de las especies vegetales estudiadas, los estudios cinéticos realizados demuestran que LPAAT presenta una fuerte especificidad por oleil-CoA y es prácticamente inactiva frente a acil-CoAs de ácidos grasos saturados. No hay antecedentes de estudios sobre la actividad de esta enzima en el fruto del olivo. En el presente trabajo se observa que el ácido oleico predomina marcadamente en la composición de la fracción de diglicéridos (Tabla 13) a lo largo de todo el periodo de crecimiento y desarrollo de los frutos. Otros estudios que aportan datos sobre la estereoquímica de los glicéridos del aceite de oliva (Aranda et al., 2004; Galeano Díaz et al., 2005; Sakouhi et al., 2011[a]; Ollivier et al., 2014) dan cuenta de la elevada proporción de ácido oleico en la posición *sn*-2 de los mismos. Estas evidencias sugieren que LPAAT presente en el mesocarpo del fruto del olivo tendría un comportamiento similar al observado en

semillas de varias especies oleaginosas, entre ellas la colza, el cártamo y el ricino (Ichihara et al., 1987; Cao et al., 1990), donde esta enzima es altamente selectiva por oleil-CoA.

La última fase en la biosíntesis de triglicéridos, es decir, el acoplamiento de una unidad de diacilglicerol con una de acil-CoA, es catalizada por la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT). En semillas, esta enzima parece mostrar una baja especificidad con respecto al ácido graso que esterifica (Snyder et al., 2009). De acuerdo a Lung y Weselake (2006) la selectividad de DAGAT depende en gran medida de la concentración y composición del "pool" de ácidos grasos presentes en la célula, por lo cual su especificidad podría variar entre las distintas especies. Así, se ha observado que en semillas de soja y maíz el linoleato es el sustrato preferido, mientras que en maní y en ricino la enzima es más activa frente a palmitato (Cao y Huang, 1986). En semillas de cártamo, en cambio, DAGAT no muestra selectividad en la incorporación de ácidos grasos saturados e insaturados (Ichihara et al., 1988). Por último, en fracciones microsomales de células del mesocarpo del fruto de la palma el orden de especificidad de la enzima es oleato > palmitato > miristato > estearato (Oo y Chew, 1992).

Aunque el análisis realizado no permite conocer específicamente el o los AG que se incorporan en la última fase de la biosíntesis de los glicéridos, se observa que: a) el ácido oleico predomina marcadamente en la fracción de triglicéridos en todos los estadios de desarrollo y maduración evaluados, b) a partir de los 110 DDPF esta fracción experimenta un incremento en las proporciones relativas de los ácidos palmítico y linoleico, c) a los 170 DDPF la composición de triglicéridos refleja aproximadamente la composición del aceite total. Estos resultados se corresponden con estudios realizados por Sakouhi et al. (2011[a]) y Ollivier et al. (2014) en numerosos cultivares de olivo, donde se ha encontrado que la posición *sn*-3 de los triglicéridos está esterificada mayormente por oleato y, en menor proporción, por palmitato y linoleato.

Si bien los datos de composición de los glicéridos parciales permiten inferir cierta selectividad en la secuencia de acilación, ésta parece estar influenciada por la abundancia relativa de los sustratos (los grupos acilo de los diferentes AG) presentes en las distintas fases de la biogénesis del aceite. Esta hipótesis es soportada por resultados obtenidos en experimentos realizados *in vitro* (cultivos de tejidos de mesocarpo de olivo y palma) donde se ha observado que la síntesis de glicéridos y su composición dependen del balance entre la

formación de ácidos grasos (síntesis *de novo*) y su posterior incorporación al glicerol-3-fosfato según la secuencia ya descripta ("Kennedy pathway") (Ramli et al., 2002).

Figura 27: Evolución del contenido de los ácidos grasos mayoritarios (palmítico, 16:0; oleico, 18:1; linoleico, 18:2) del aceite de frutos del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), cultivado en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles.

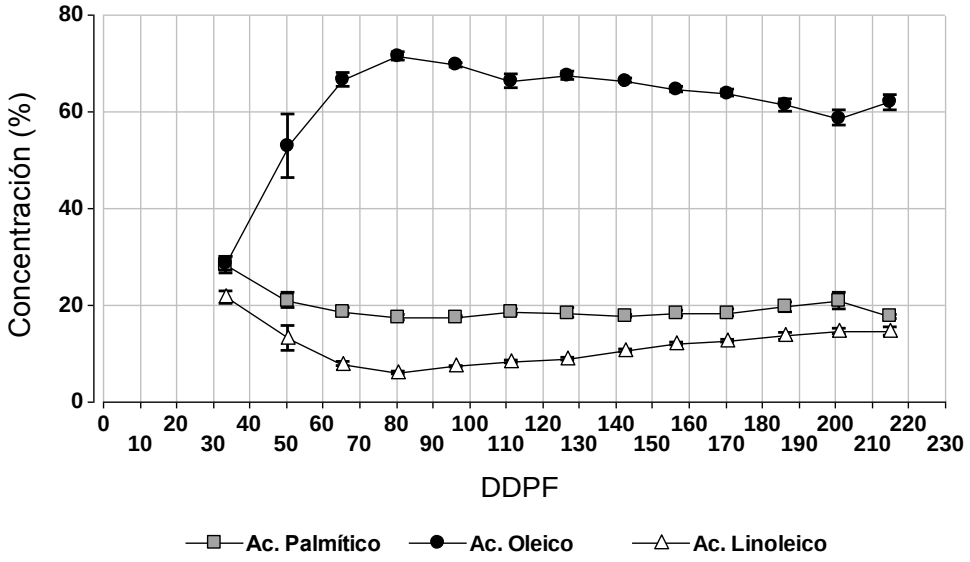


Tabla 13: Variación de la composición de ácidos grasos (% respecto del total de cada fracción) de las fracciones de acilglicéridos en el aceite del cv. Arauco obtenido a partir del mesocarpo de frutos en distintos estadios de desarrollo. Las muestras de frutos fueron recolectadas en la EEA – INTA San Juan durante el ciclo de cultivo 2013/14.

DDPF		Acidos grasos					
(TTA)	Fracción	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
33	1	69,9 ± 16,4	Tr	1,75 ± 1,50	21,7 ± 18,8	5,21 ± 7,21	1,43 ± 1,18
(534)	2	10,2 ± 1,15	Tr	0,60 ± 0,01	89,5 ± 1,01	0,13 ± 0,02	0,55 ± 0,01
	3	5,32 ± 0,50	Tr	0,30 ± 0,01	83,9 ± 1,52	10,6 ± 1,04	0,30 ± 0,01
50	1	79,1 ± 5,5	Tr	0,90 ± 0,62	16,9 ± 3,71	2,70 ± 1,73	0,40 ± 0,19
(836)	2	10,6 ± 0,39	Tr	0,60 ± 0,01	89,2 ± 2,80	0,15 ± 0,07	0,60 ± 0,05
	3	15.0 ± 6.12	Tr	2,08 ± 1,25	75,3 ± 11,0	4,59 ± 0,78	4,02 ± 3,55
65	1	57,4 ± 2,89	Tr	0,13 ± 0,04	42,3 ± 2,91	0,17 ± 0,02	0,60 ± 0,07
(1155)	2	10,4 ± 0,30	Tr	0,14 ± 0,02	88,9 ± 4,40	0,22 ± 0,20	0,17 ± 0,10
	3	16,3 ± 4,32	Tr	2,00 ± 1,20	73,9 ± 7,90	5,15 ± 1,11	1,68 ± 0,64
80	1	37,3 ± 19,6	Tr	7,47 ± 1,12	46,5 ± 4,06	8,30 ± 3,22	0,47 ± 0,71
(1470)	2	10,0 ± 0,26	Tr	0,15 ± 0,11	89,3 ± 0,58	0,23 ± 0,20	0,19 ± 0,11
	3	16.3 ± 5.77	Tr	3,22 ± 1,48	72,5 ± 12,8	6,26 ± 2,14	0,69 ± 0,44
96	1	18,1 ± 2,05	Tr	7,55 ± 0,92	67,6 ± 4,21	5,33 ± 1,13	1,34 ± 0,22
(1803)	2	14,1 ± 3,41	Tr	5,79 ± 1,02	70,1 ± 3,25	6,07 ± 0,80	3,93 ± 1,15
	3	17,9 ± 0,64	Tr	4,43 ± 0,93	70,1 ± 4,60	5,92 ± 1,72	0,41 ± 0,16
111	1	20,3 ± 1,04	Tr	9,05 ± 0,68	64,5 ± 5,76	4,23 ± 0,83	1,92 ± 0,23
(2110)	2	15,3 ± 1,49	Tr	8,12 ± 3,49	71,5 ± 0,38	3,14 ± 0,63	1,98 ± 0,59
	3	22,0 ± 3,83	0,91 ± 0,20	5,20 ± 2,73	64,0 ± 7,09	5,55 ± 1,72	3,19 ± 0,91
127	1 ND						
(2397)	2	1,50 ± 0,23	Tr	0,15 ± 0,08	98,1 ± 0,42	0,23 ± 0,1	0,06 ± 0,02
	3	21,4 ± 1,71	1,01 ± 0,01	4,78 ± 2,14	64,4 ± 6,60	7,59 ± 3,21	1,53 ± 0,96
142	1 ND						
(2670)	2	1,29 ± 0,06	Tr	0,09 ± 0,05	98,4 ± 0,19	0,14 ± 0,07	0,04 ± 0,02
	3	21,3 ± 3,17	1,50 ± 0,77	3,69 ± 0,38	63,0 ± 3,44	9,07 ± 1,27	1,41 ± 0,42
156	1 ND						
(2884)	2 ND						
	3	21,9 ± 1,84	0,97 ± 0,36	2,79 ± 2,16	61,7 ± 1,95	11,7 ± 1,11	1,09 ± 0,41
170	1 ND						
(3089)	2 ND						
	3	20,9 ± 2,57	1,39 ± 0,28	2,03 ± 0,49	61,3 ± 1,12	13,0 ± 1,84	1,06 ± 0,32
186	1 ND						
(3243)	2 ND						
	3	20,4 ± 2,79	1,28 ± 0,88	2,44 ± 1,44	62,0 ± 1,86	13,2 ± 1,04	0,76 ± 0,38

Referencias: DDPF, días posteriores a la fase fenológica de plena floración; TTA, tiempo térmico acumulado (ºCd). Fracción: 1, lisofosfatidato; 2, diacilglicerol; 3, triacilglicerol. Acidos grasos: C16:0, palmitato; C16:1, palmitoleato; C18:0, estearato; C18:1: oleato; C18:2, linoleato; C18:3, linolenato. Valores medios (n = 5) ± desvío estandar. Tr: traza (< 0.1 %); ND: no detectado.

Componentes menores de frutos y aceites

Fracción fenólica

Numerosos estudios han demostrado que la concentración y composición de sustancias fenólicas del fruto del olivo son muy variadas y dependen de múltiples factores, destacando el genotipo y factores agronómicos como el estado de maduración de la oliva y las condiciones agroclimáticas de la zona de producción, especialmente el régimen hídrico (Tovar et al., 2003; Vinha et al., 2005; Tura et al., 2007; Uceda et al., 2008; Torres et al., 2009; Caruso et al., 2014; Pierantozzi et al., 2014). En relación al genotipo y a las concentraciones halladas en los aceites, Uceda et al. (2008) informan variaciones cuantitativas muy marcadas (desde 100 hasta 1200 mg/kg aceite). Se debe notar, sin embargo, que dichas variaciones muchas veces se deben a las condiciones empleadas para la obtención del aceite (Salvador et al., 1998; Torres y Maestri, 2006), por lo que el contenido de fenoles en el mismo no siempre se correlaciona con la concentración presente en el fruto.

Por otra parte, el estudio de los cambios que experimenta la fracción fenólica durante la ontogenia del fruto se ha focalizado, en la gran mayoría de los casos, durante la fase de maduración (Gutierrez et al. 1999; Caponio et al., 2001; Briante et al., 2002; Bonoli et al. 2004; Bouaziz et al., 2004; Morelló et al., 2004; Rotondi et al., 2004; Beltrán et al., 2005; Baccouri et al., 2008; Damak et al., 2008; Gómez-Rico et al., 2008; Jimenez et al. 2013), observándose que, en general, a poco de iniciada la misma, se produce un descenso más o menos marcado del contenido total de sustancias fenólicas. Un estudio realizado por Ortega-García y Peragón (2009) con frutos de los cultivares Picual, Arbequina, Verdial y Frantoio sugiere que la relación entre la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO) es una de las causas principales de la variación en la concentración de fenoles a lo largo de la maduración ya que, conforme avanza esta última, el nivel de actividad de PAL (enzima clave en la biosíntesis de fenilpropanoides) disminuye, a la vez que aumenta el nivel de actividad de PPO, la cual interviene en la degradación oxidativa de los compuestos fenólicos. Son muy escasos los trabajos que evalúan los cambios cuali y cuantitativos que puede experimentar la fracción fenólica en etapas tempranas del desarrollo de los frutos. Un estudio realizado por Morelló et al. (2005) a partir del cuajado de las drupas da cuenta de una correlación positiva entre la actividad de PAL y la concentración de sustancias fenólicas.

En el presente trabajo, el contenido inicial (medido a los 30 – 35 DDPF, 510 – 560 ºCd) de compuestos fenólicos totales (CFT) es significativamente más elevado en el cv. Arauco (111 mg/g fruto) con respecto a los cultivares Arbequina y Manzanilla (68 y 73 mg/g fruto, sin diferencias significativas). En los tres cultivares la concentración decrece marcadamente entre los 30 – 50 DDPF. A continuación, se observan dos tendencias diferentes (Fig. 28). En el cv. Manzanilla ocurre una disminución paulatina (con valor de pendiente = -0,17, R^2 = 0,57), en forma lineal, hasta valores próximos a 25 mg/g fruto al final del periodo de muestreo evaluado. Por el contrario, en los cultivares Arbequina y Arauco el CFT se incrementa significativamente (entre 65 – 95 DDPF), y posteriormente decrece progresivamente a lo largo de la maduración (pendientes de -0,49, R^2 = 0,78, y -0,46, R^2 = 0,70, respectivamente). De este modo, en estos dos cultivares, la dinámica de síntesis de sustancias fenólicas sigue curvas prácticamente paralelas, en las cuales se aprecian dos periodos de máxima acumulación con concentraciones próximas a 110 mg/g fruto (Arauco) y 70 – 75 mg/g fruto (Arbequina). En ambos casos los frutos presentaban un IM de 0. En frutos del cv. Arbequina con IM superior a 1 Gómez-Rico et al. (2008) han reportado contenidos de 4500 mg/kg de fruto fresco. Por su parte, Morelló et al. (2005) informan valores cercanos a 100 mg/g de materia seca en fases de crecimiento cercanas al endurecimiento del carozo, que se reduce a 80 mg/g cuando el fruto aún es verde, y se mantiene luego prácticamente constante hasta que el mismo presenta coloración negra. Por otra parte, Ortega-García y Peragón (2009), en este mismo cultivar, encuentran valores sustancialmente menores a los reportados en el presente estudio y en la literatura anteriormente citada (31,5 mg/g de materia seca a un IM de 0 y 16 mg/g a un IM de 1). En todos los casos, la correlación entre el CFT y el IM resulta negativa (Manzanilla, r = -0,61; Arbequina, r = -0,57; Arauco, r = -0,61) y altamente significativa ($p < 0,01$).

En el cv. Arauco, los valores finales (51 mg/g fruto) duplican a los encontrados en Arbequina y Manzanilla (alrededor de 25 mg/g fruto). Estos resultados podrían explicarse en función del grado de madurez alcanzado por cada uno de los cultivares en el periodo fenológico comprendido entre 200 – 220 DDPF. Sin embargo, la relación entre IM y CFT no es unívoca. Si se compara la CFT en fechas en que los cultivares presentan aproximadamente el mismo IM, se observan variaciones significativas en aquel parámetro. Así por ej. los cultivares alcanzan un IM cercano a 2,8 a los 185 DDPF (Arbequina), 205 DDPF (Manzanilla) y 215 DDPF (Arauco).

En cada una de esas fechas la CFT registra un valor promedio significativamente más elevado en el cv. Arauco (51 mg/g fruto) en comparación con el obtenido en Arbequina y Manzanilla (promedio 27 mg/g fruto, sin diferencia significativa entre estos dos cultivares). En los tres cultivares la CFT presenta correlación negativa, altamente significativa, con el TTA (Tabla 9).

En cuanto a la composición de la fracción fenólica ha sido estudiada en numerosos cultivares de olivo (Morelló et al., 2004, 2005; Andjelkovic et al., 2008; Gómez-Rico et al., 2008; Oliveras-López et al., 2008; Ortega-García y Peragón, 2009). Hasta el momento, no hay registros de estudios realizados en el cv. Arauco. Los frutos de este cultivar contienen diferentes clases de compuestos fenólicos (Tabla 14). Los mismos comprenden alcoholes fenólicos (*p*-hidroxifeniletanol - *p*-HPEA - o tirosol, y 3,4-dihidroxifeniletanol - 3,4-DHPEA o hidroxitirosol), lignanos (1-pinoresinol y 1-acetoxipinoresinol), verbascósido y compuestos secoiridoides. Estos últimos son los componentes más abundantes e incluyen a la oleuropeína (un éster heterosídico del ácido elenólico y el hidroxitirosol), y la forma dialdehídica del ácido decarboximetil-elenólico unida al 3,4-DHPEA o al *p*-HPEA (3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA, respectivamente). De los compuestos derivados del ácido hidroxicinámico, el verbascósido (un éster heterosídico del ácido cafeico y el hidroxitirosol) es el único presente.

A excepción del 1-acetoxipinoresinol, el resto de los compuestos analizados presentan diferencias estadísticamente significativas entre los estadios de desarrollo evaluados. Al considerar ambos ciclos, la concentración promedio de alcoholes fenólicos varía entre 0,44 – 1,56 mg/g fruto (tirosol) y entre 1,35 – 2,91 mg/g fruto (hidroxitirosol). Aunque los datos disponibles no resultan suficientes para conocer la dinámica de los cambios que experimentan a lo largo de la ontogenia completa del fruto, es posible observar las mayores concentraciones de ambos compuestos en fases del desarrollo previas a la maduración y contenidos significativamente más bajos en frutos en envero (aproximadamente 180 - 190 DDPF). Estos datos coinciden con los obtenidos por Morelló et al. (2005) en frutos del cv. Farga (una típica variedad de mesa) donde la concentración máxima de hidroxitirosol se alcanza en la fase final del desarrollo previa al inicio de la maduración. Por otra parte, los resultados mencionados difieren de aquellos informados por Gómez-Rico et al. (2008) quienes compararon la composición de compuestos fenólicos de los frutos de las variedades Arbequina, Picolimón y

Picual en tres estadios de madurez diferentes (verde, envero y negra), observando que la concentración de hidroxitirosol aumenta a medida que avanza la maduración. En cualquier caso, las concentraciones de ambos alcoholes fenólicos en frutos del cv. Arauco resultan siempre marcadamente superiores a los registradas en los otros cultivares mencionados.

Entre los compuestos secoiridoides, el 3,4-DHPEA-EDA y la oleuropeína resultan los más abundantes. En todos los estadios analizados, el primer compuesto prevalece sobre el segundo. Esta característica es inusual en el fruto del olivo (Alagna et al., 2012) ya que, en la mayor parte de los casos, la oleuropeína constituye el compuesto fenólico mayoritario. Las dos sustancias mencionadas presentan las máximas concentraciones en muestras de frutos recogidas en fases tempranas del desarrollo y disminuyen marcadamente cuando los mismos alcanzan el envero (170 – 190 DDPF). En esta fase de la maduración, el contenido de oleuropeína se reduce a valores que representan entre el 11 y el 14 % de los valores encontrados a los 30 - 40 DDPF. De acuerdo a Limiroli et al. (1995) dicha reducción podría ser resultado de la degradación de la oleuropeína, catalizada por β-glucosidasa. En un estudio realizado por Romero-Segura et al. (2009) en frutos maduros del cv. Picual, se ha analizado la actividad de esta enzima frente a diversos sustratos observándose que la oleuropeína es el compuesto glucosilado por el que posee la mayor especificidad. La disminución del contenido de oleuropeína a menudo es acompañada por la acumulación de demetiloleuropeína y ácido elenólico glucosilado (Morelló et al., 2005; Alagna et al., 2012); sin embargo estas dos últimas sustancias no se detectan en ninguno de los estadios de crecimiento y maduración analizados, posiblemente debido a que sus concentraciones se encuentran por debajo del límite de detección del equipo.

Las sustancias del grupo de los lignanos (1-pinoresinol y 1-acetoxipinoresinol) se encuentran en muy bajas concentraciones (< 0,12 mg/g fruto) y muestran mínimas variaciones en todo el periodo evaluado.

Por su parte, el verbascósido no fue detectado en estadios tempranos del crecimiento (hasta 70 DDPF). Posteriormente, registra valores similares en las muestras recogidas antes del inicio de la maduración y en frutos en envero. Este compuesto está casi siempre presente en el fruto del olivo, aunque en proporciones variables. Las cantidades encontradas en el cv. Arauco

(4,50 -11,1 mg/g fruto) son notablemente superiores a las máximas concentraciones halladas en frutos de numerosos cultivares (Arbequina, Morrut, Farga, Morisca, Picual, Cornicabra, Picudo) analizados desde el cuajado hasta fases avanzadas de la maduración (Morelló et al., 2005; Vinha et al., 2005; Gómez-Rico et al., 2008; Andjelkovic et al., 2008).

Finalmente, el *p*-HPEA-EDA muestra una tendencia opuesta a la observada para el verbascósido, es decir, valores más elevados en drupas muy jóvenes y paulatina disminución con el inicio de la maduración.

Figura 28: Evolución del contenido de fenoles totales (mg/g fruto, SBS) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

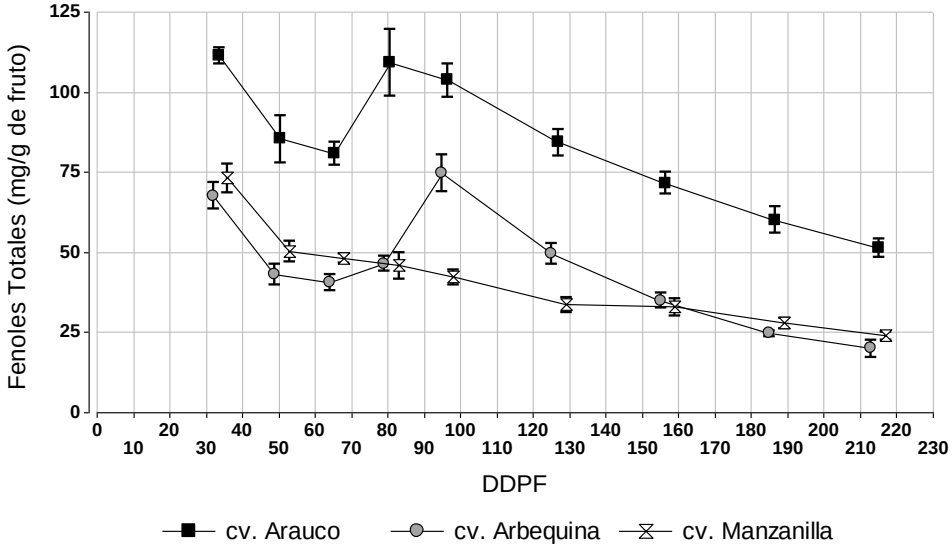


Tabla 14: Concentración de compuestos fenólicos (mg/g fruto, SBS) del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF).

Componente	**DDPF**			
CC 2010/11	**29**	**63**	**126**	**184**
3,4-DHPEA	1,04 ± 0,22 [a]	1,99 ± 0,76 [ab]	2,84 ± 1,03 [b]	0,89 ± 0,22 [a]
p-HPEA	0,44 ± 0,11 [a]	1,46 ± 0,77 [b]	1,55 ± 0,25 [b]	0,38 ± 0,08 [a]
Verbascósido	ND	ND	4,50 ± 0,76 [a]	5,91 ± 0,21 [b]
3,4-DHPEA-EDA	64,4 ± 15,6 [c]	45,1 ± 2,98 [b]	41,3 ± 2,66 [b]	23,8 ± 3,49 [a]
Oleuropeína	43,3 ± 13,1 [c]	7,24 ± 1,90 [b]	2,78 ± 0,18 [a]	4,70 ± 0,84 [a]
p-HPEA-EDA	5,81 ± 0,60 [c]	3,43 ± 0,71 [b]	2,25 ± 1,91 [a]	ND
1-Acetoxipinoresinol	0,10 ± 0,03 [a]	0,09 ± 0,03 [a]	0,08 ± 0,01 [a]	0,08 ± 0,01 [a]
Pinoresinol	0,12 ± 0,03 [c]	0,10 ± 0,03 [bc]	0,05 ± 0,02 [a]	0,05 ± 0,02 [a]
Total	115,3 ± 28,5 [c]	59,4 ± 6,21 [b]	53,4 ± 6,16 [b]	33,8 ± 7,27 [a]
CC 2011/12	**38**	**68**	**128**	**189**
3,4-DHPEA	1,66 ± 0,15 [a]	1,96 ± 0,33 [a]	2,98 ± 1,29 [b]	1,81 ± 0,54 [a]
p-HPEA	1,28 ± 0,22 [b]	1,45 ± 0,31 [b]	1,56 ± 0,32 [b]	0,50 ± 0,18 [a]
Verbascósido	ND	ND	10,2 ± 3,54 [a]	11,1 ± 3,55 [a]
3,4-DHPEA-EDA	74,7 ± 9,73 [c]	52,3 ± 9,42 [b]	43,9 ± 9,80 [a]	36,6 ± 4,37 [a]
Oleuropeína	29,2 ± 4,25 [c]	7,78 ± 1,80 [b]	4,85 ± 0,90 [a]	4,15 ± 0,68 [a]
p-HPEA-EDA	7,42 ± 1,26 [c]	2,85 ± 0,84 [b]	0,75 ± 0,001 [a]	ND
1-Acetoxipinoresinol	0,10 ± 0,001 [a]	0,10 ± 0,001 [a]	0,10 ± 0,001 [a]	0,10 ± 0,001 [a]
Pinoresinol	0,10 ± 0,01 [a]	0,10 ± 0,01 [a]	0,10 ± 0,01 [a]	0,07 ± 0,05 [a]
Total	114,5 ± 11,7 [c]	66,6 ± 2,40 [b]	64,0 ± 1,10 [b]	54,5 ± 3,68 [a]

Valores medios (n = 5) ± desvío estándar. Para cada ciclo de cultivo (CC) se utilizaron muestras de frutos provenientes de 5 árboles. Para cada compuesto analizado, en cada CC, los valores medios seguidos de distintas letras presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$). ND, no detectado.

Tocoferoles

En el olivo, el estudio de esta fracción minoritaria del aceite se ha focalizado principalmente en las variaciones que experimenta durante la maduración del fruto y con especial énfasis en el contenido de α-tocoferol. La variabilidad en la composición de esta fracción parece depender en gran medida del genotipo con un efecto menor del ambiente de cultivo (Cunha et al., 2006; Uceda et al., 2008; Beltrán et al., 2010). No hay registros de estudios de composición de tocoferoles en etapas tempranas del desarrollo de los frutos.

La dinámica de acumulación de tocoferoles totales (Fig. 29) se ajusta a un modelo de regresión bi-lineal, con dos fases de decrecimiento (Tabla 11). En la primera (Tabla 12), las tasas presentan diferencias significativas entre los cultivares, siendo menos en el cv. Manzanilla. En la segunda también, las tasas obtenidas para los cultivares Arbequina y Arauco poseen valores absolutos más elevados que el obtenido en el cv. Manzanilla. En cada uno de los cultivares la concentración de tocoferoles totales no registra variaciones significativas a partir de los 145 – 160 DDPF (2650 - 2900 ºCd). Los valores finales promedio resultan significativamente más altos en Arauco (500 mg/kg aceite) que en Arbequina (366 mg/kg aceite) y Manzanilla (294 mg/kg aceite). En los tres cultivares el contenido de tocoferoles totales presenta correlación negativa, altamente significativa, con el TTA (Tabla 9).

La dinámica de acumulación de α y β-tocoferol presenta las más altas concentraciones en los aceites provenientes de frutos obtenidos aproximadamente a los 50 DDPF y una disminución abrupta, en forma lineal, hasta los 80 - 85 DDPF. A partir de este momento, el β-tocoferol registra valores constantes (sin diferencias significativas) hasta el final del periodo evaluado, mientras que el contenido de α-tocoferol decrece regularmente hasta lograr valores constantes luego de 160 – 180 DDPF (Figs. 30 y 31).

La evolución del contenido de γ-tocoferol también presenta tendencias similares en los tres cultivares, aunque con algunas diferencias temporales (Fig. 32). En los cultivares Arbequina y Manzanilla, y de manera semejante a lo observado para el β-tocoferol, luego de un corto periodo de rápida disminución, se obtienen concentraciones constantes a partir de 80 – 85 DDPF. En el cv. Arauco, en tanto, la estabilidad se observa en fases posteriores del desarrollo, aproximadamente a 130 DDPF.

De acuerdo a los resultados mencionados anteriormente, los tocoferoles minoritarios (β y γ) alcanzan valores estables antes del inicio de la madurez. Para el α-tocoferol, en cambio, ocurre una disminución significativa durante el periodo que abarca los primeros estadios de la maduración (IM inferiores a 2), al cabo del cual se obtienen concentraciones constantes.

Cuando se comparan las concentraciones a valores constantes, el contenido de α-tocoferol resulta significativamente diferente en los tres cultivares. Los valores promedio son 475,3 (Arauco), 403,5 (Arbequina) y 264,4 mg/kg aceite (Manzanilla). Por otra parte, las concentraciones β y γ-tocoferol no presentan diferencias significativas entre los cultivares Arbequina y Manzanilla (promedios 56,8 y 57 mg/kg aceite, respectivamente, para β-tocoferol; 72,6 y 70,8 mg/kg aceite, respectivamente, para γ-tocoferol) y son significativamente mayores en Arauco (promedios 70 y 88,6 mg/kg aceite para β y γ-tocoferol, respectivamente).

Los valores promedio mencionados anteriormente resultan en general más altos que aquellos obtenidos para estas variedades cultivadas en otros ambientes. En relación al cv. Arauco la única referencia disponible corresponde a un estudio realizado por Ceci y Carelli (2007) quienes informan una concentración de tocoferoles totales de 337 mg/kg aceite. Por su parte, Jiménez y Uceda (1995) y Beltrán et al. (2010) determinan valores promedio de α-tocoferol de 223 y 230 mg/kg, respectivamente, en aceites del cv. Arbequina cultivado en Cataluña y Córdoba, España respectivamente. Asimismo, los últimos autores reportan un contenido de 153 mg de α-tocoferol/kg aceite en el cv. Manzanilla.

El análisis de la literatura disponible indica que, en la mayor parte de los cultivares, el α-tocoferol prevalece marcadamente sobre sus homólogos β y γ, alcanzando proporciones de entre 90 y 95 % con respecto al total de tocoferoles presentes, con una participación minoritaria de γ-tocoferol (en general menor al 10 %) y β-tocoferol (2 – 4 %). Los datos obtenidos en este trabajo muestran una distribución diferente en esas proporciones relativas. Considerando las concentraciones promedio constantes, en el cv. Arbequina la distribución en porcentaje relativo de cada compuesto asume valores próximos al 75,7 %, 10,6 % y 13,6 %, en Arauco, 74,9 %, 11,1 % y 14 %, y en Manzanilla, 67,4 %, 14,5 % y 18 %, para α, β y γ-tocoferol, respectivamente. Estas distribuciones se asemejan a las encontradas en algunos cultivares de origen italiano (Muzzalupo et al., 2011) donde se ha observado que la suma de β y γ-tocoferol puede alcanzar concentraciones cercanas al 30 % del total de tocoferoles. En el caso de los

cultivares de origen español analizados por Beltrán et al. (2010), la suma de β y γ-tocoferol varía entre el 2 y el 8 % del total de tocoferoles. Por su parte, Ceci y Carelli (2007) informan que en los cultivares Arbequina, Picual, Barnea, Frantoio, Empeltre, Arauco, Coratina, Manzanilla Criolla y Californiana las concentraciones de β-tocoferol pueden alcanzar un máximo de 27 mg/kg y las de γ-tocoferol hasta 30 mg/kg de aceite, representando la suma de ambos el 15 % como máximo del contenido de tocoferoles totales.

Escualeno

El escualeno es el hidrocarburo mayoritario en el aceite de oliva, pudiendo representar cerca del 90 % de esta fracción (Owen et al. 2000). Son escasos los estudios sobre la dinámica de su síntesis en el fruto del olivo. Los patrones de variación observados en este trabajo (Fig. 33) se ajustan a un modelo de regresión no lineal a dos tramos, con tasas de acumulación que difieren significativamente entre los cultivares (Tabla 12). En los cultivares Arbequina y Manzanilla, la fase de síntesis culmina entre 80 - 90 DDPF con concentraciones máximas próximas a 2650 y 3750 mg/kg aceite. Las tasas de acumulación para este periodo asumen valores de 97 (Arbequina) y 359 mg/kg/100 °Cd (Manzanilla). En el cv. Arauco se observa un periodo de almacenamiento más prolongado, con una elevada tasa de acumulación (879 mg/kg/°Cd), que culmina aproximadamente a los 95 - 100 DDPF con una concentración máxima próxima a 11650 mg/kg aceite. No hay registros en la literatura sobre la dinámica de acumulación de este hidrocarburo en fases previas a la maduración.

Luego de la fase de acumulación, el contenido de escualeno disminuye gradualmente hasta alcanzar valores constantes cercanos a 1000 mg/kg aceite (Arbequina) y 3100 mg/kg aceite (Manzanilla) después de 200 DDPF. En el cv. Arauco la tasa de declinación es más elevada, aunque no se llega a valores constantes al final del periodo de tiempo total evaluado. Esta tendencia de disminución conforme avanza la madurez también fue reportada por Baccouri et al. (2008) en los cultivares Chemlali y Chétoui y por Sakouhi et al. (2011[b]) en el cv. Meski.

En los vegetales, el escualeno provee el esqueleto hidrocarbonado para la síntesis de una amplia gama de compuestos isoprenoides. La declinación de su contenido observada desde antes del inicio del periodo de maduración, podría ser resultado del incremento de la tasa de síntesis de esteroles y triterpenoides no-esteroidales que se observa durante la fase de mayor crecimiento de los frutos del olivo (Stiti et al., 2007; Sakouhi et al., 2011[b]).

Figura 29: Evolución del contenido de tocoferoles totales (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

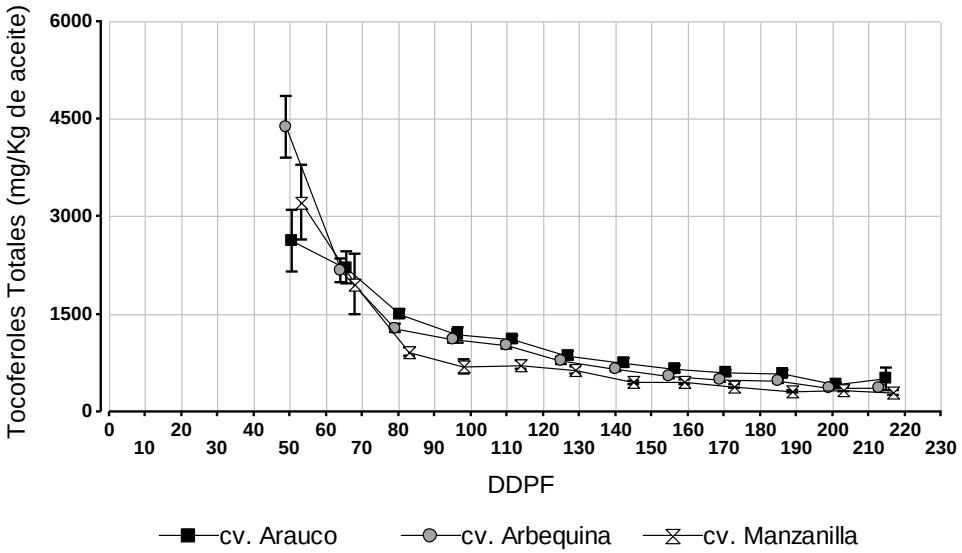


Figura 30: Evolución del contenido de α-tocoferol (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

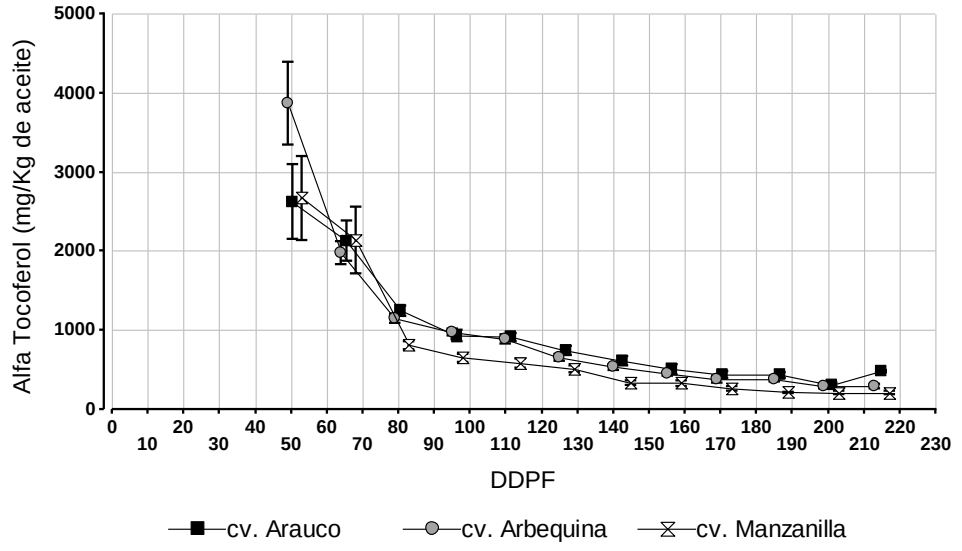


Figura 31: Evolución del contenido de β-tocoferol (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

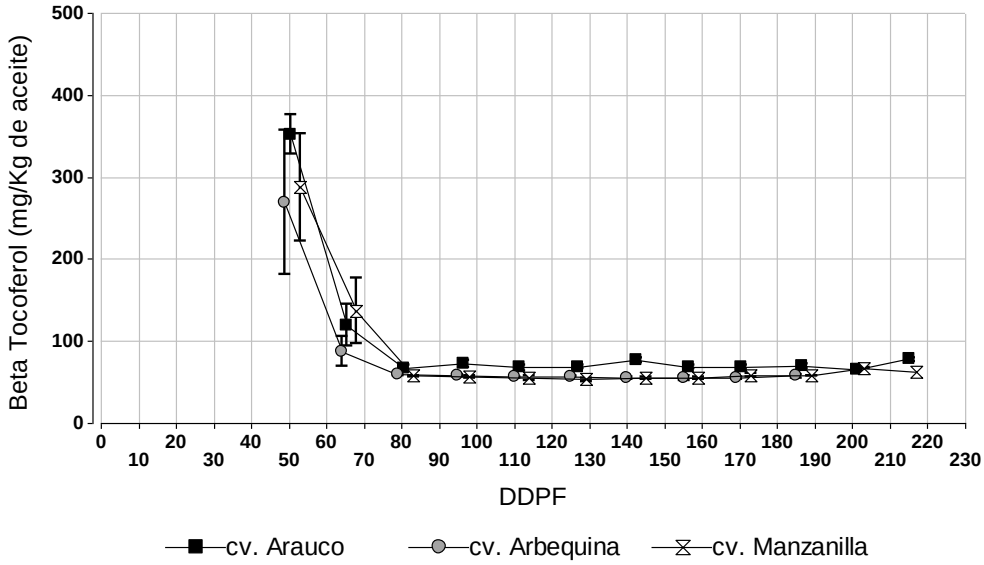


Figura 32: Evolución del contenido de γ-tocoferol (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

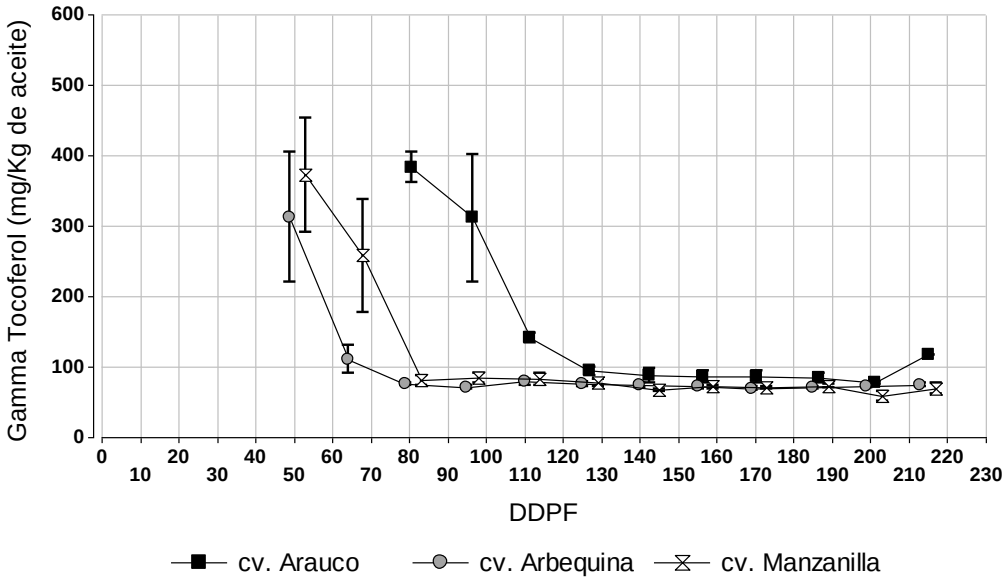
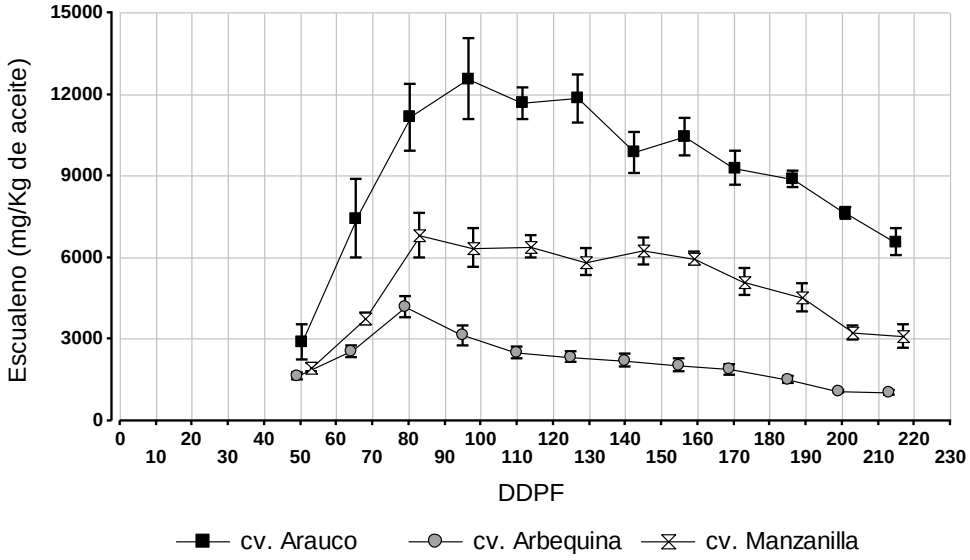


Figura 33: Evolución del contenido de escualeno (mg/kg de aceite) en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), en tres variedades de olivo cultivadas en la EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.



Conclusiones

Los tres cultivares analizados difieren marcadamente en el tamaño y peso de los frutos. En todos los casos, la dinámica de acumulación de materia seca se ajusta a modelos de regresión lineal. El cv. Arauco posee una tasa más elevada y un periodo de acumulación más dilatado. En los cultivares Arbequina y Manzanilla la madurez fisiológica se alcanza al inicio del periodo de maduración de los frutos; en el cv. Arauco se logra durante el envero.

La biogénesis del aceite se registra desde fases muy tempranas (aproximadamente 30 – 35 DDPF) del desarrollo de los frutos. La dinámica de acumulación sigue patrones similares en los tres cultivares. La sucesión temporal y duración de los eventos que llevan a la formación de oleosomas en células del mesocarpo ocurren de manera semejante, observándose diferencias sólo en el tamaño final de los glóbulos de aceite. Independiente del tamaño de los mismos, el proceso que culmina con la acumulación del aceite en una única gota por célula se produce en fases muy tempranas de la maduración, con índices de madurez próximos a la unidad. El cv. Manzanilla presenta una tasa de acumulación menor a la de los cultivares Arbequina y Arauco, pero se compensa con un periodo de síntesis más prolongado.

La evolución del contenido de ácido oleico presenta dos fases bien definidas. En la primera, caracterizada por síntesis activa, no se observan diferencias entre los cultivares en las tasas ni en la duración del periodo de acumulación. La máxima concentración (70 – 72 %) se logra con cargas térmicas similares (1450 – 1500 ºCd). Las diferencias entre cultivares en el contenido final de ácido oleico parecen estar determinadas por su tasa de conversión en ácido linoleico antes que por la declinación de su síntesis. La evolución del contenido de este último muestra una tendencia opuesta a la del ácido oleico: elevadas concentraciones en etapas tempranas del desarrollo de los frutos, disminución pronunciada hasta la fase de endurecimiento del endocarpo y aumento paulatino a partir del inicio de la maduración.

La información que proporciona el estudio de la composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones de glicéridos, junto con el análisis estereoquímico de triglicéridos de diversos aceites de oliva, aportan evidencias sobre la selectividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de estos últimos. En el aceite del cv. Arauco, la secuencia de incorporación de ácidos grasos en los glicéridos parciales parece ocurrir según un patrón donde la transferencia de palmitil-CoA, mediada por G3PAT, prevalece en la primera fase de la biosíntesis (la

formación del ácido lisofosfatítico), en estadios tempranos de desarrollo de los frutos (aproximadamente hasta 80 DDPF). A continuación, su tasa de incorporación se reduce al mismo tiempo que se incrementa la del ácido oleico. Este último no sólo contribuye a la fracción de lisofosfatidato sino también, fundamentalmente, a la formación de di y triacilglicéridos por acilaciones sucesivas en las posiciones *sn*-2 y *sn*-3, mediadas por LPAAT y DAGAT, respectivamente. La presencia de triacilglicéridos se registra desde fases muy tempranas del desarrollo, al principio con una elevada una proporción de ácido oleico (> 80 %) y posteriormente con un descenso paulatino de su concentración hasta alcanzar valores constantes en el periodo previo al inicio de la maduración de los frutos. A partir de este momento, se observa un incremento en las proporciones de los ácidos palmítico y linoleico, los cuales logran concentraciones relativamente estables durante la fase de envero. La incorporación de los tres ácidos grasos principales a los glicéridos de los aceites analizados se puede resumir según la secuencia indicada en la Figura 34.

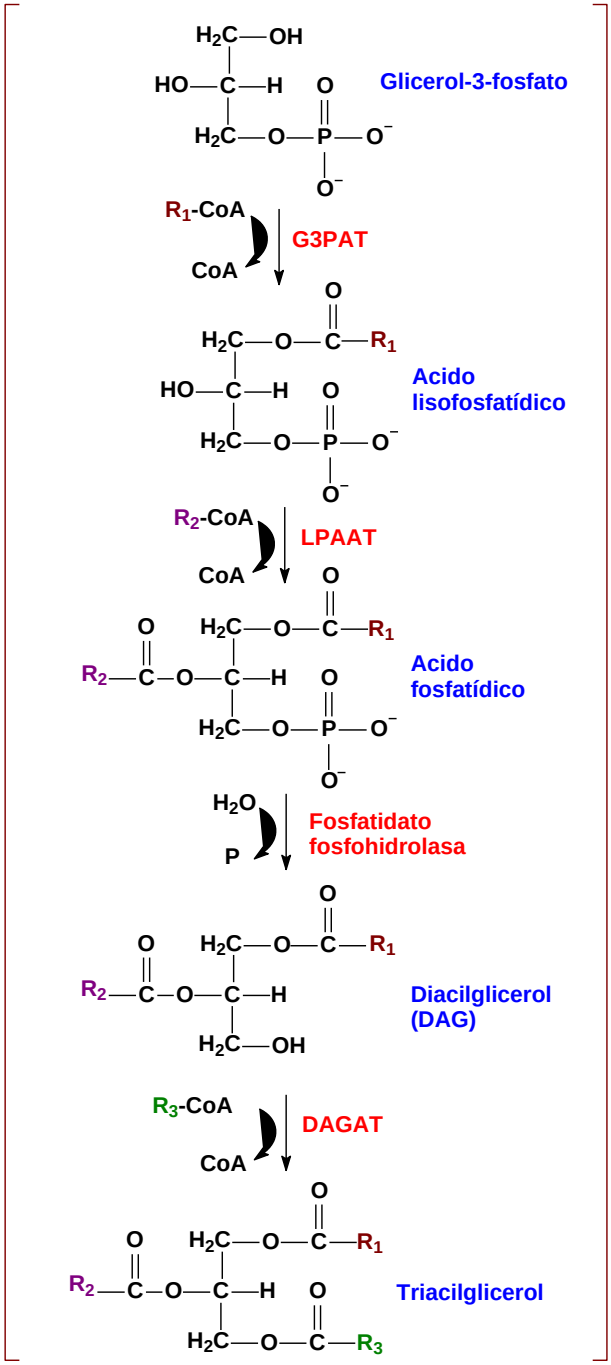
En los tres cultivares estudiados, las concentraciones máximas de sustancias fenólicas de los frutos se obtienen en fases anteriores a la maduración. Los cultivares Arbequina y Arauco muestran patrones de acumulación similares, con máximos al inicio y a la finalización de la fase de endurecimiento del endocarpo. En el cv. Manzanilla se observa una declinación prácticamente constante durante todo el periodo de desarrollo. En fases posteriores al envero, el contenido de fenoles en el cv. Arauco prácticamente duplica al encontrado en Arbequina y Manzanilla. Desde el punto de vista cualitativo, los estudios realizados en el cv. Arauco muestran que los compuestos secoiridoides y derivados son el grupo mayoritario representando, al inicio de la madurez, entre el 77 y el 87 % del contenido fenólico total. Analizados en su conjunto, los datos muestran una disminución general del contenido de sustancias fenólicas, principalmente como resultado de un marcado descenso en la concentración de oleuropeína, 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA.

El patrón general de la evolución del contenido de tocoferoles totales muestra tendencias similares en los tres cultivares: elevadas concentraciones en etapas tempranas del desarrollo, descenso pronunciado hasta aproximadamente la finalización de la fase de endurecimiento del endocarpo, reducción moderada hasta el comienzo de la maduración y valores prácticamente constantes luego de iniciada esta última. La evolución del contenido de

escualeno presenta una fase de síntesis intensa, que culmina a los 80 – 95 DDPF, seguida de declinación más o menos pronunciada. Los aceites de los distintos cultivares difieren marcadamente en la concentración de escualeno, fundamentalmente como resultado de diferencias en las tasas de acumulación.

La evolución de las principales sustancias indicadas como antioxidantes del aceite de oliva (tocoferoles, otros fenoles y polifenoles, escualeno) no había sido analizada, hasta el momento, desde fases tempranas del desarrollo de los frutos. Este estudio aporta información sobre la dinámica de síntesis, y sobre las diferencias en concentración de los distintos compuestos en los tres cultivares evaluados. Los datos obtenidos adquieren relevancia habida cuenta de la gran cantidad de antecedentes que indican la relación entre el contenido de estas sustancias y la estabilidad del aceite y, en el caso particular de los polifenoles, el papel preponderante que poseen sobre las cualidades organolépticas del mismo. Se debe recordar también la actividad vitamínica de los tocoferoles y numerosas evidencias científicas que demuestran los efectos benéficos de diversos polifenoles sobre la salud, atribuidos a su actividad antioxidante y su implicancia sobre el estrés oxidativo asociado a ciertas enfermedades conocidas en su conjunto como crónicas no transmisibles que actualmente afectan a la población mundial.

Desde el punto de vista práctico, la disminución en el contenido de ácido oleico que tiene lugar particularmente en el cv. Arbequina en fases previas al inicio de la maduración de los frutos, antes de alcanzar la máxima concentración de aceite, puede considerarse un inconveniente a los fines de establecer una época óptima de cosecha para la producción de aceites encuadrados dentro de la normativa del COI. En el cv. Manzanilla, el contenido de ácido oleico se mantiene constante durante las primeras fases de la maduración, al mismo tiempo que la concentración de aceite alcanza el máximo potencial. Sobre la base de la evolución de los parámetros mencionados, en los cultivares Arbequina y Arauco el periodo de recolección apropiado podría coincidir con el inicio del envero, mientras que en el cv. Manzanilla debería realizarse más tardíamente, con frutos de IM comprendido entre 2 y 3. Figura 34: Esquema propuesto para la incorporación de los tres ácidos grasos principales (palmítico, oleico, linoleico) a los glicéridos del aceite del cv. Arauco.



R_1 = Principalmente Palmitato (hasta los 60 - 70 DDPF), posteriormente Oleato.

R_2 = Casi exclusivamente Oleato.

R_3 = Principalmente Oleato, en menor proporción Palmitato y Linoleato.

Comportamiento de los cultivares Arbequina y Manzanilla en dos ambientes de cultivo

Crecimiento y dinámica de acumulación de materia seca y aceite de los frutos

Numerosos antecedentes indican que las condiciones agroclimáticas del ambiente de cultivo tales como el régimen de temperatura del aire (Malik y Bradford, 2009; Kitsaki et al., 2010; García-Inza et al., 2014), la disponibilidad hídrica (Lavee et al., 2007; Palese et al., 2010; Searles et al., 2011; Pierantozzi et al., 2014) y las condiciones lumínicas (Cherbiy-Hoffmann et al., 2012; 2013) pueden modificar la fenología del olivo e influenciar los procesos de inducción floral, el cuajado y la maduración de los frutos. Dichas variaciones, a su vez, pueden afectar la acumulación de fotoasimilados y la dinámica de síntesis y composición del aceite. Algunos estudios han indagado estos últimos aspectos en olivares implantados en diversos ambientes de cultivo en Argentina, particularmente en las provincias de Mendoza, La Rioja y Catamarca (Alderete Salas et al., 2005; Dalla Lasta, 2006; Ceci y Carelli, 2007; Trentacoste et al., 2010, 2012; Rondanini et al., 2011, 2014; García-Inza et al., 2014).

En este apartado se comparan los resultados analizados en las variedades Arbequina y Manzanilla cultivadas en San Juan con datos obtenidos en un olivar localizado en las proximidades de Cruz del Eje, en la región NO de la provincia de Córdoba. El cv. Arauco es de muy escasa difusión en esta provincia, y no está presente en el olivar del sitio de estudio evaluado en el Dpto. Cruz del Eje. Tampoco fue posible encontrar individuos de este cultivar en zonas aledañas, por lo cual su estudio no pudo ser realizado en dicho ambiente. En ambos sitios (San Juan y Cruz del Eje) se trabajó con plantaciones de baja densidad, con árboles de 70 años de edad aproximadamente que presentaban niveles semejantes de carga frutal, a los cuales se proveyó riego suplementario suficiente para cubrir el 100 % de la demanda evapotranspirativa del cultivo (ver sección materiales y métodos para mayor detalle).

Los registros térmicos obtenidos durante los dos ciclos de cultivo analizados muestran, en general, temperaturas medias más elevadas, durante el periodo otoño-invernal, en la localidad de Cruz del Eje. Por el contrario, durante el periodo primavero-estival los registros térmicos son similares en ambas localidades (Tablas 4 - 7; Figs. 8 - 11). Cuando se analiza la dinámica de crecimiento, evaluada a través del incremento del peso fresco de los mismos, se observan tendencias prácticamente lineales para las cuatro combinaciones cultivar-ambiente evaluadas (Fig. 35), sin una delimitación definida de fases de desarrollo. Se ha sugerido que

este patrón de crecimiento prácticamente continuo puede presentarse cuando las plantas son mantenidas en ausencia de déficit hídrico a lo largo de todo el ciclo de cultivo (Lavee, 1986; Manrique, 1997). En los ambientes evaluados, los frutos del cv. Arbequina alcanzan su peso definitivo con una carga térmica acumulada próxima a 2900 ºCd. Los frutos del cv. Manzanilla, en tanto, logran peso constante a diferentes tiempos, observándose un periodo de crecimiento más prolongado en los provenientes de plantas cultivadas en Cruz del Eje.

La acumulación de materia seca (Fig. 36) sigue aproximadamente las tendencias observadas para el peso fresco de los frutos. Las tasas de acumulación presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambientes. En ambos cultivares se registran tasas más elevadas en la localidad de San Juan (Tabla 15).

El cv. Arbequina en Cruz del Eje presenta un periodo de acumulación de materia seca (considerado desde el inicio de la plena floración hasta obtención de materia seca constante) más acotado (2200 ºCd) en relación a la implantada en San Juan (2900 ºCd). Los valores resultan sustancialmente inferiores a los observados en la provincia de La Rioja (Rondanini et al., 2014). En el cultivar Manzanilla, la duración del periodo de acumulación no difiere significativamente entre ambientes, alcanzándose la madurez fisiológica con una carga térmica cercana a 2900 ºCd. Este valor coincide aproximadamente con aquellos reportados por Rondanini et al. (2014) para el cv. Manzanilla Fina en la provincia de La Rioja. En dicho cultivar, los mismos autores han informado tasas mínimas y máximas de acumulación (promedios de 0.045 y 0.095 g/fruto/100 ºCd, respectivamente) en ambientes que difieren en las condiciones de temperatura. Sin embargo, no encontraron una relación unívoca entre ambos parámetros.

En resumen, en el cv. Arbequina tanto la tasa como el periodo de acumulación de materia seca fueron mayores en San Juan, mientras que en Manzanilla sólo se observa incidencia de la tasa de acumulación. En ambos cultivares, la tasa de acumulación de materia seca es mayor (en un porcentaje aproximado de 150 %) en San Juan respecto de Cruz del Eje.

El momento de inicio del periodo de maduración de los frutos no muestra influencia del ambiente del cultivo (Fig. 37). En ambas localidades y en los dos cultivares evaluados los primeros cambios en la pigmentación de la epidermis se registran entre los 110-120 DDPF, con carga térmica acumulada comprendida entre 2100 - 2200 ºCd.

Figura 35: Evolución del peso de los frutos (g/fruto) en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje - Córdoba y en EEA - INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las mediciones se realizaron en 50 frutos/árbol.

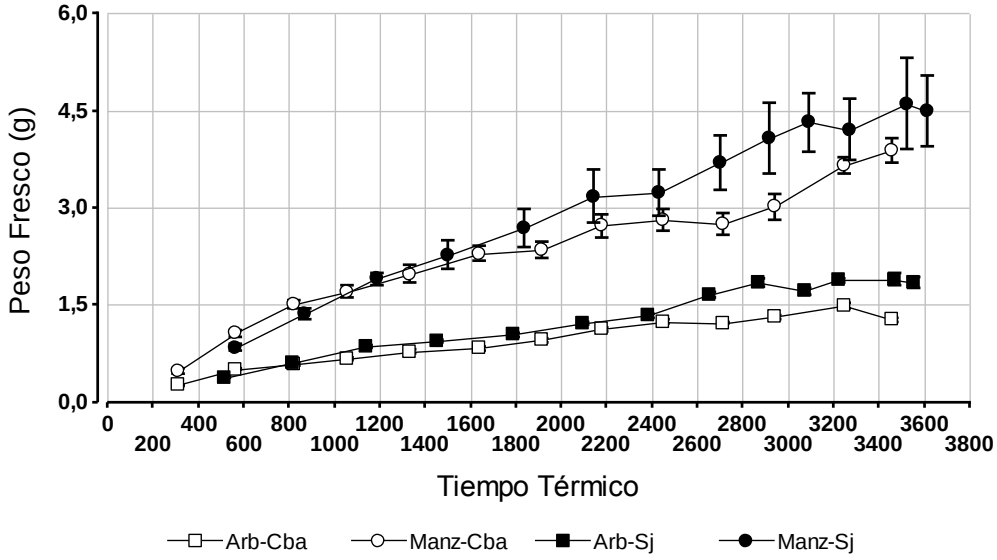


Figura 36: Dinámica de la acumulación de materia seca (g/fruto) en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

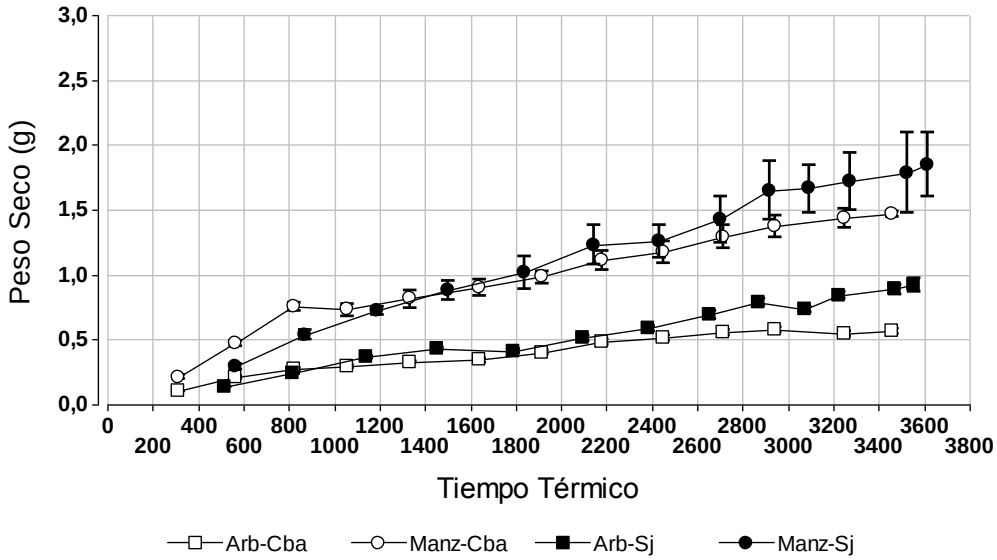
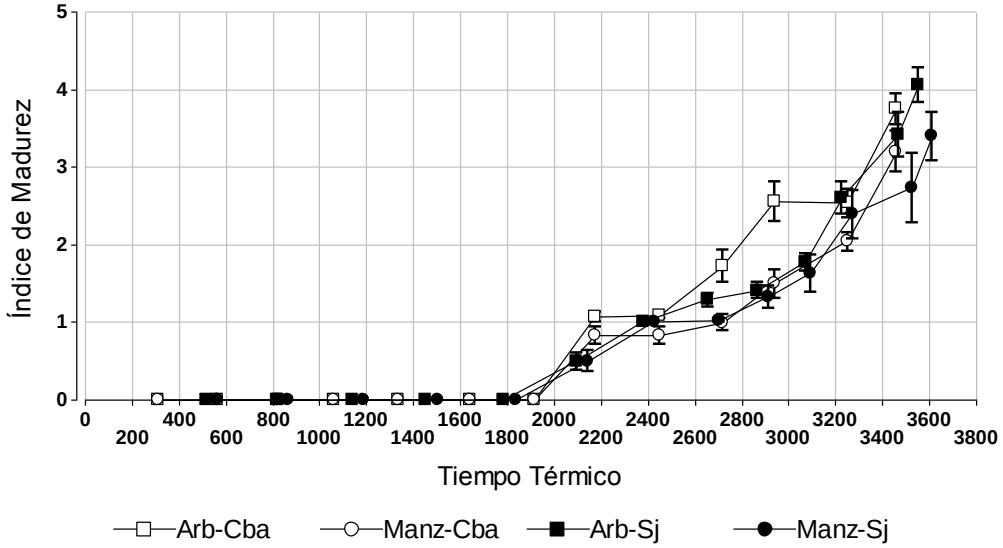


Tabla 15: Modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para componentes de rendimiento de frutos de las variedades Arbequina y Manzanilla cultivadas en Cruz del Eje - Córdoba y en EEA - INTA San Juan. Los datos fueron analizados en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) a partir de la plena floración. Se utilizaron datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC 2010-11 y 2011-12). En cada CC se emplearon 5 árboles por cultivar. Para cada parámetro analizado, las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre cada combinación cultivar-ambiente ($p \leq 0,05$).

Parámetro	Cultivar	Ambiente	Tasa de acumulación	R^2
Peso seco (g/100 °Cd)	Arbequina	Córdoba	0,016[d]	0,74
		San Juan	0,025[c]	0,74
	Manzanilla	Córdoba	0,039[b]	0,74
		San Juan	0,065[a]	0,74
Contenido de aceite (SBS) (%/ 100 °Cd)	Arbequina	Córdoba	1,51[b]	0,91
		San Juan	1,80[a]	0,91
	Manzanilla	Córdoba	1,32[c]	0,91
		San Juan	1,61[b]	0,91

Figura 37: Evolución del índice de madurez de los frutos en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las mediciones se realizaron en 100 frutos/árbol.



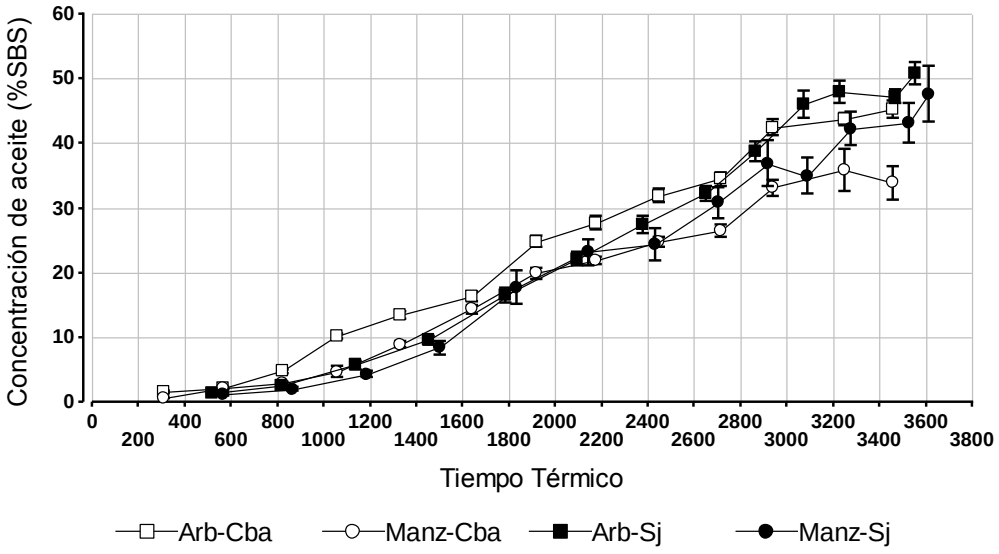
En el cultivar Arbequina, el patrón de acumulación de aceite registra diferencias entre los dos ambientes de cultivo (Fig. 38). A partir de los 50 DDPF (800 - 900 ºCd) se observa un incremento prácticamente lineal hasta alcanzar un valor constante (sin diferencias significativas) promedio de 45 % (Cruz del Eje), con carga térmica acumulada superior a 2900 ºCd, y de 50 % (San Juan), con carga térmica mayor a 3200 ºCd. En ambos sitios de cultivo, estos valores de concentración constante se logran en frutos con IM próximos a 2 (Fig. 37).

En el cv. Manzanilla, hasta los 130 DDPF (2400 ºCd), la evolución del contenido de aceite sigue curvas prácticamente idénticas, sin diferencias significativas entre ambientes para cada una de las fechas de cosecha evaluadas. Posteriormente, la concentración de aceite en frutos procedentes de Cruz del Eje se estabiliza en valores próximos al 38 %, con TTA superior a 2900 ºCd, mientras que en San Juan se prolonga hasta alcanzar un promedio del 46 %, con TTA mayor a 3200 ºCd. Dichas concentraciones se logran en frutos con IM comprendidos entre 1 y 2 (Cruz del Eje) y entre 2 y 3 (San Juan).

En ambos cultivares, la tasa de acumulación de aceite es significativamente más elevada la localidad de San Juan (Tabla 15). En consecuencia, los mayores porcentajes de aceite registrados en esta región se pueden explicar no sólo en función de un periodo de acumulación más prolongado, sino también por una tasa de incremento más elevada. En cultivos localizados en la provincia de La Rioja, Rondanini et al. (2014) han determinado una mayor incidencia de la tasa sobre la duración del periodo de acumulación. Por el contrario, en la provincia de Mendoza, Trentacoste et al. (2012) han observado que las variaciones en el contenido máximo de aceite durante la ontogenia del fruto se deben principalmente a la duración del periodo de síntesis.

La época de recolección de los frutos es la principal fuente de variabilidad para la concentración de aceite (Tabla 18). Las influencias del cultivar, del ambiente, y la interacción de este último con la época de cosecha también resultan significativas, aunque de menor magnitud.

Figura 38: Dinámica de la acumulación de aceite (g/100 g de fruto, base seca) en función del tiempo térmico acumulado (º Cd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de los dos ciclos de cultivo (CC) evaluados (2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles.



Composición de ácidos grasos

En general se asume que la composición de ácidos grasos del aceite de oliva es fuertemente dependiente del genotipo, aunque puede ser afectada considerablemente por el ambiente (Uceda et al., 2008). Estudios realizados en la cuenca mediterránea dan cuenta de variaciones importantes de la calidad de los aceite entre ciclos de cultivo (Beltrán et al., 2004; Lombardo et al., 2008) y localidades (Tous y Romero 1994) que pueden ser atribuidos a diferencias climáticas. Al analizar específicamente la concentración de ácido oleico, se ha observado que generalmente decrece en condiciones de menor latitud y altitud, tanto en España (Tous et al., 1997) e Italia (Orlandi et al., 2012). Estas observaciones están en línea con resultados obtenidos en las zonas de producción de olivo del hemisferio sur (particularmente Argentina y Australia), donde los aceites suelen tener bajos porcentajes de ácido oleico (< 55 %), y elevadas concentraciones de los ácidos palmítico (> 16 %) y linoleico (> 21 %) (Mailer et al., 2010; Rondanini et al., 2011, 2014).

En un estudio realizado por Torres et al. (2009) se analizó la variabilidad genética y la composición del aceite de la var. Arbequina en la provincia de Córdoba (Argentina) cotejándola con la cultivada en España y en la región NO de Argentina. A pesar del bajo nivel de polimorfismo observado en los patrones genéticos de muestras procedentes de las regiones mencionadas, se encontraron diferencias significativas en la composición del aceite (particularmente en el contenido de ácido oleico), sugiriendo que las condiciones agro-climáticas específicas de cada sitio de cultivo ejercen una marcada influencia sobre el mismo.

Los patrones de síntesis y acumulación de cada uno de los ácidos grasos saturados presentan tendencias similares en los dos ambientes de cultivo evaluados (Figs. 39 y 40). En drupas jóvenes tiene lugar una corta fase de descenso rápido con tasas similares en ambos cultivares y ambientes (Tabla 17). A partir del inicio de la fase de biosíntesis acelerada del aceite (1000 - 1200 °Cd), las concentraciones de los ácidos palmítico y esteárico llegan a valores prácticamente constantes durante los primeros estadios de la maduración. Sin embargo, por encima de los 2400 ºCd la var. Arbequina cultivada en Córdoba experimenta un incremento significativo en la concentración de ácido palmítico la cual alcanza valores por encima del máximo establecido por el COI para aceites de oliva virgen extra.

Los valores finales del ácido palmítico son significativamente más bajos en aceites del cv. Manzanilla (aproximadamente 15 %) respecto del cv. Arbequina (aproximadamente 20 %), y en este último resultan significativamente mayores en Cruz del Eje. El ácido esteárico, en cambio, presenta concentraciones finales entre 1 y 2,5 % en ambos cultivares y ambientes.

En general, la dinámica de síntesis y acumulación observada para los ácidos grasos saturados responde al patrón informado previamente en los mismos genotipos cultivados en España (Gómez-González et al., 2011), y también en otros cultivares y ambientes de la cuenca mediterránea (Cevdet y Yesim, 2000; Finotti et al., 2001; Matos et al., 2007; Sakouhi et al., 2008). Sin embargo, el comportamiento de la var. Arbequina cultivada en Cruz del Eje, en cuanto a la evolución del contenido de ácido palmítico, es opuesto al reportado en diversas variedades cultivadas en el hemisferio norte, tales como Chétoui (Damak et al., 2008) y Gordal Sevillana (Menz y Vriesekoop, 2010), donde se han registrado importantes reducciones en la concentración de este ácido graso durante la maduración. No obstante, el patrón mencionado para el cv. Arbequina en la región NO de la provincia de Córdoba resulta similar al observado

por Rondanini et al. (2014) en la provincia de la Rioja, donde se ha encontrado que el ácido palmítico se incrementa hasta alcanzar valores próximos al 20 %, con carga térmica cercana a 3500 ºCd.

En el cv. Arbequina, la evolución del contenido de ácido palmitoleico también registra variaciones significativas entre ambientes (Fig. 41). Luego de una primera fase con concentraciones prácticamente constantes (TTA comprendido entre 500 y 1600 – 1800 ºCd), se observan incrementos significativos hasta alcanzar valores próximos al 2 % (San Juan) o superiores al 3 % (Cruz del Eje). En el cv. Manzanilla, la concentración de este ácido graso se mantiene entre 0,8 y 1,4 %, con variaciones menores entre ambientes, y decae a valores por debajo del 1 %, con TTA mayores a 3400 ºCd.

En los dos cultivares evaluados, el periodo de síntesis y acumulación de ácido oleico se produce anticipadamente en Cruz del Eje con respecto al cultivo en San Juan (Fig. 42). En este periodo las tasas de acumulación no difieren significativamente entre cultivares y ambientes. En todos los casos, se alcanzan las máximas concentraciones (70 – 75 %) con carga térmica comprendida entre 1300 – 1500 ºCd. A partir de este momento, el contenido de ácido oleico en el cv. Manzanilla se mantiene prácticamente constante en ambos sitios de cultivo, pero con valores algo más elevados en San Juan. En el cv. Arbequina, con posterioridad al periodo indicado, se produce un descenso significativo hasta alcanzar valores constantes próximos al 60 %, a partir de un TTA mayor a 2700 ºCd (San Juan), o bien cercanos al 52 %, con TTA superior a 3200 ºCd (Cruz del Eje).

La disminución en el contenido de ácido oleico que tiene lugar en el cv. Arbequina ha sido también observada por Rondanini et al. (2014) en tres ambientes de cultivo en la provincia de La Rioja. En los mismos, dicha reducción fue registrada a partir de fases tempranas del crecimiento de los frutos, con cargas térmicas próximas a 1000 ºCd, y con tasas de disminución que variaron entre -0.47 y -0.97 %/100 ºCd. Al correlacionar estos cambios con la temperatura ambiente durante la fase de biosíntesis del aceite, obtuvieron reducciones de aproximadamente 0.8 % de ácido oleico por cada 100 ºCd. Resultados similares han sido reportados por García-Inza et al. (2014) en experimentos a campo donde se manipularon ramas del cv. Arauco controlando la temperatura durante 4 meses.

En el presente trabajo, las tasas de disminución del contenido de ácido oleico en el cv. Arbequina asumen valores de -0.69 y -0.51 %/100 ºCd, sin variaciones significativas entre ambientes (Tabla 17). Sin embargo, a valores constantes, la concentración es significativamente menor en el cultivo localizado en Cruz del Eje. En principio, esto puede explicarse por una fase de descenso más prolongada en el tiempo, en este ambiente. Cuando se comparan las temperaturas medias durante el periodo de síntesis activa del aceite (diciembre – abril) no se observan mayores diferencias entre los dos ambientes evaluados, sugiriendo que otros factores podrían afectar la síntesis del ácido oleico y/o su tasa de conversión en ácido linoleico.

El contenido de ácido oleico en el aceite del cv. Arbequina es altamente variable en función del ambiente de cultivo. La concentración final obtenida en Cruz del Eje (52 %) es semejante a un valor promedio reportado por Rondanini et al. (2011) en seis ambientes de cultivo de la región NO (provincias de La Rioja y Catamarca) de Argentina. En otros estudios realizados a partir de muestras procedentes de la provincia de Catamarca, se han encontrado valores inferiores al 50 % (Ravetti, 1999; Mannina et al., 2001; Matías et al., 2004; Alderete Salas et al., 2005; Dalla Lasta, 2006; Ceci y Carelli, 2007). Por su parte, Torres y Maestri (2006) citan valores de alrededor del 63 % en cultivos localizados en el valle de Traslasierra (Córdoba), los cuales resultan similares a los obtenidos a partir del cultivo de esta variedad en el norte de África (Essiari et al., 2014; Haddam et al., 2014). En cualquier caso, los valores mencionados anteriormente son inferiores a los registrados en algunos aceites del cv. Arbequina (70 – 75 % de ácido oleico) en España e Italia (Morelló et al., 2004; Lombardo et al., 2008; Gómez-Gonzalez et al., 2011; De la Rosa et al., 2013) y en el sudeste de Brasil (75 – 75,7 %) (Ballus et al., 2014).

En el caso del cv. Manzanilla, las concentraciones finales de ácido oleico en ambos ambientes evaluados no difieren mayormente de las informadas por otros autores tanto en Argentina como en países de la cuenca mediterránea (Torres et al., 2006; Gómez-González et al., 2011; Pierantozzi et al., 2014).

Los patrones de acumulación de ácido linoleico (Fig. 43) muestran marcadas variaciones entre cultivares y ambientes. En Arbequina, las curvas presentan forma de "V" con mínimos comprendidos entre 7 – 8 %. Estos mínimos se producen en tiempos significativamente

diferentes, próximos a 600 ºCd en Cruz del Eje, y a 1200 ºCd en San Juan. Posteriormente, el contenido de este ácido graso registra un aumento lineal hasta llegar a máximos de 17 % (San Juan) y 20 % (Córdoba) con tasas de incremento de 0,49 y 0,61 %/100 °Cd, respectivamente (Tabla 17). En el cv. Manzanilla, luego de una fase de disminución con tasas y periodos de duración prácticamente idénticos en los dos ambientes, se observan dos tendencias diferentes a saber: en Cruz del Eje la concentración se mantiene prácticamente constante, con valores alrededor del 3,5 %; en San Juan se registra un incremento sostenido hasta valores próximos al 10 % hacia el final del periodo de estudio considerado.

La relación entre las concentraciones de los ácidos oleico y linoleico en cada cultivar y ambiente, se ajusta a regresiones lineales con coeficientes de regresión comprendidos entre 0,69 y 0,93 (Fig. 44). Las correlaciones entre ambos ácidos grasos arrojan coeficientes negativos, altamente significativos ($p \leq 0,01$), cuyos valores se indican a continuación: r = -0,89 (Arbequina – Córdoba), r = -0,83 (Arbequina - San Juan), r = -0,96 (Manzanilla – Córdoba), r = -0,89 (Manzanilla - San Juan).

La evolución del contenido de ácido linolénico (Fig. 45) presenta tendencias similares en los cultivares y ambientes analizados. Luego de una fase de marcado descenso (con tasas entre -3,3 y -4,9%/100 °Cd, Tabla 17), que culmina aproximadamente entre los 1300 – 1500 ºCd, el contenido de este ácido graso no registra variaciones significativas y sus concentraciones finales se ubican por debajo del 1 %.

En el cv. Arbequina la relación entre AGMI y AGPI (Fig. 46) disminuye a partir de los 1200 – 1300 ºCd, con valores que no difieren significativamente entre ambientes. En el cv. Manzanilla se visualizan dos tendencias: incremento lineal hasta los 2200 ºCd, seguido de una corta fase de amesetamiento y leve descenso (Cruz del Eje); incremento lineal hasta los 1500 ºCd, seguido de una fase prolongada de amesetamiento y posterior descenso (San Juan).

La época de recolección de los frutos representa la mayor fuente de variabilidad para todos los ácidos grasos analizados (Tabla 18). El efecto del cultivar y su interacción con la época de recolección son particularmente importantes en los tres ácidos grasos mayoritarios (palmítico, oleico, linoleico) del aceite. El efecto del ambiente y sus interacciones con el cultivar y con la época de cosecha resultan, en general, de menor magnitud.

Figura 39: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmítico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (7,5 – 20 %).

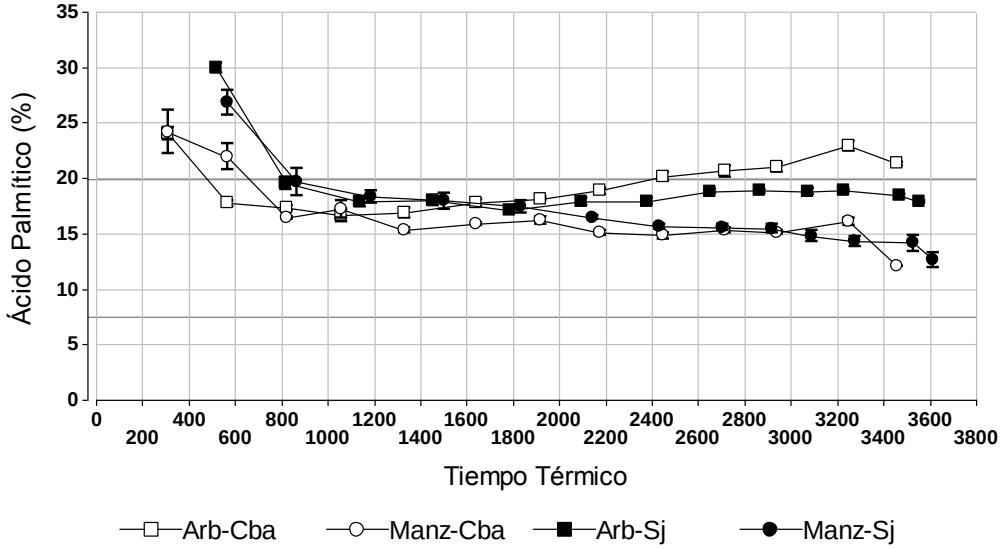


Figura 40: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido esteárico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (0,5 – 5 %).

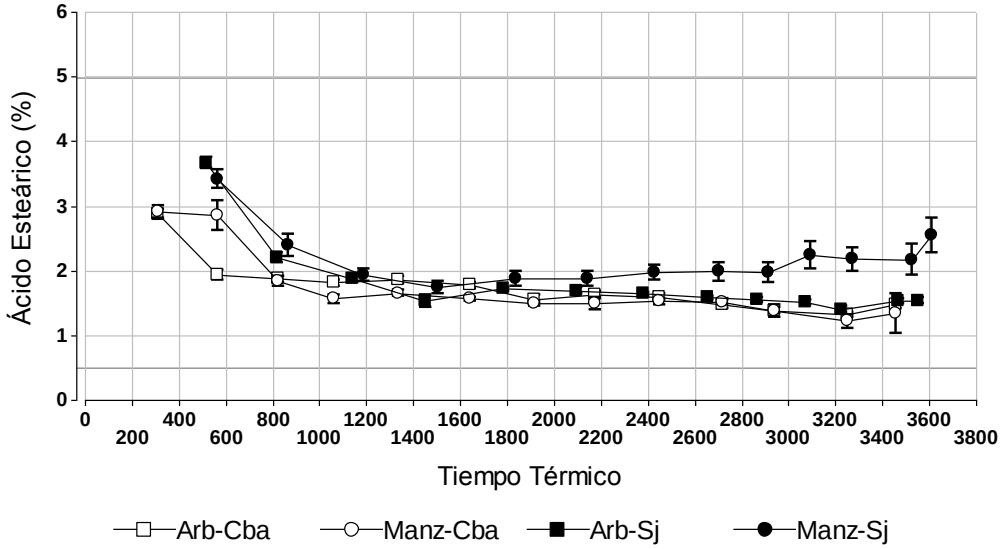


Figura 41: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido palmitoleico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (0,3 - 3,5 %).

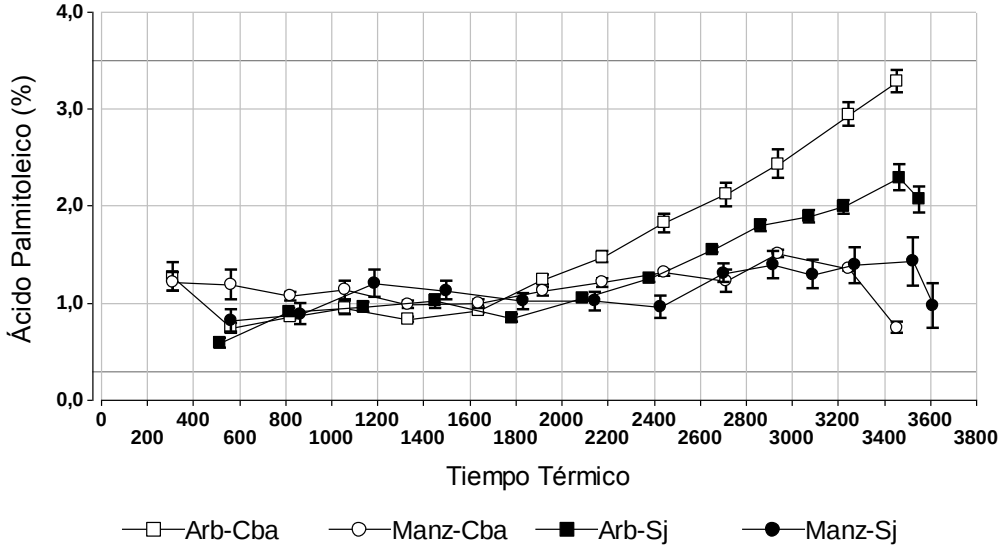


Figura 42: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido oleico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (55 – 83 %).

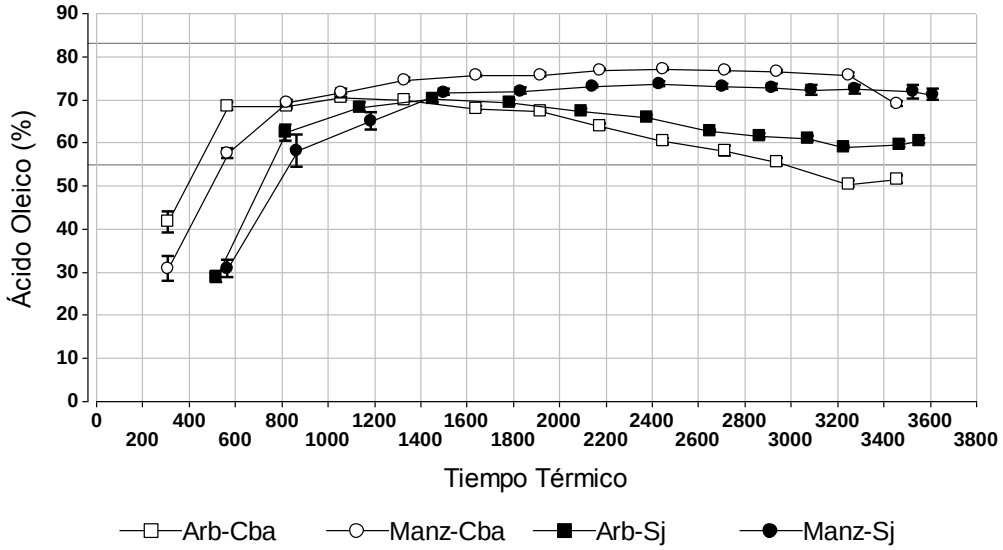


Figura 43: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linoleico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (3,5 – 21 %).

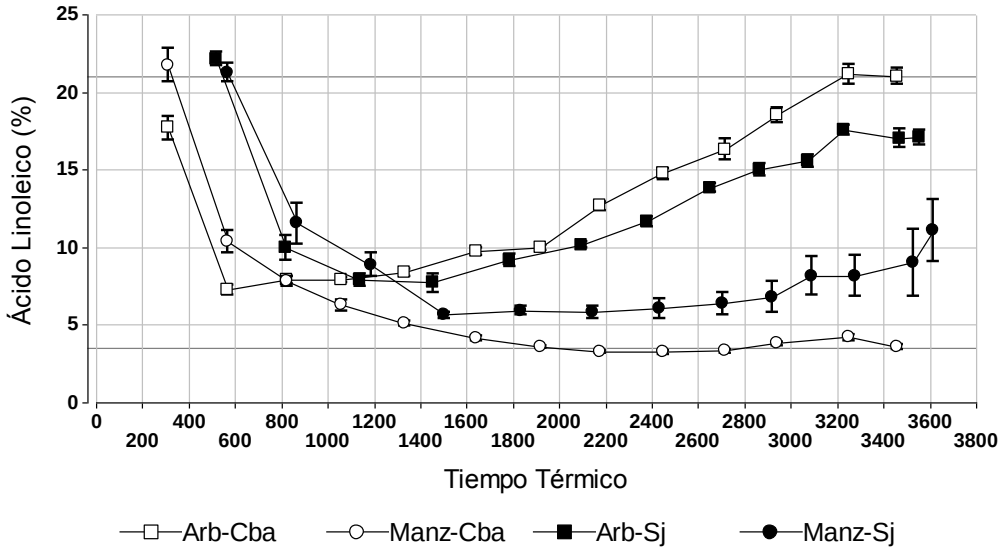


Figura 44: Análisis de regresión lineal entre las concentraciones (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de los ácidos oleico y linoleico en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan ($p \leq 0,05$). Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar.

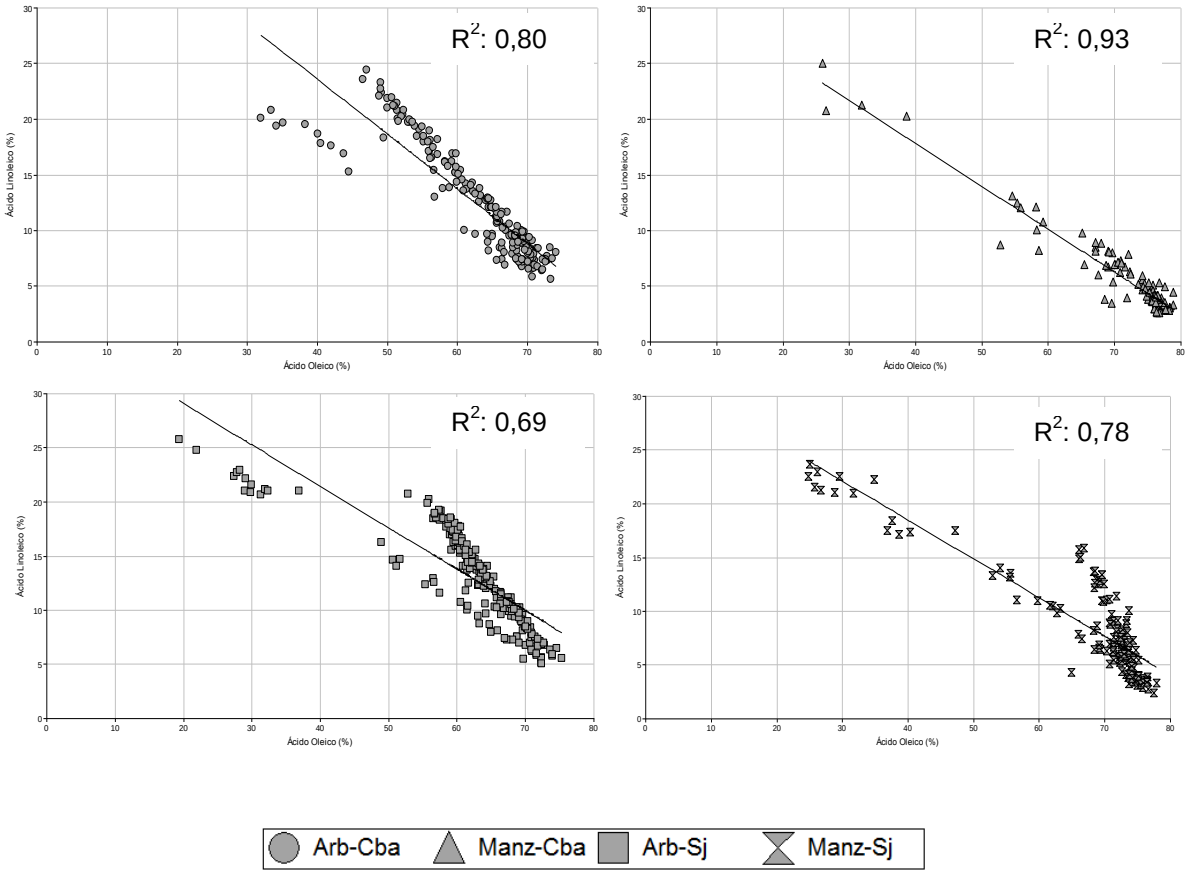


Figura 45: Evolución del contenido (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de ácido linolénico en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente. Las líneas horizontales oscuras marcan los límites establecidos por el COI para este ácido graso en aceites de oliva extra vírgenes (≤ 1 %).

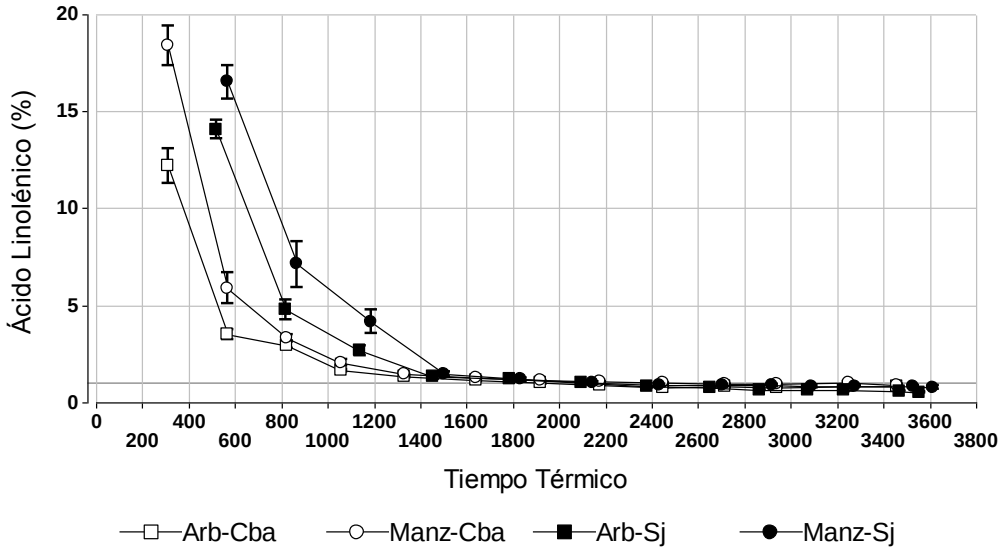


Figura 46: Evolución de la relación entre ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

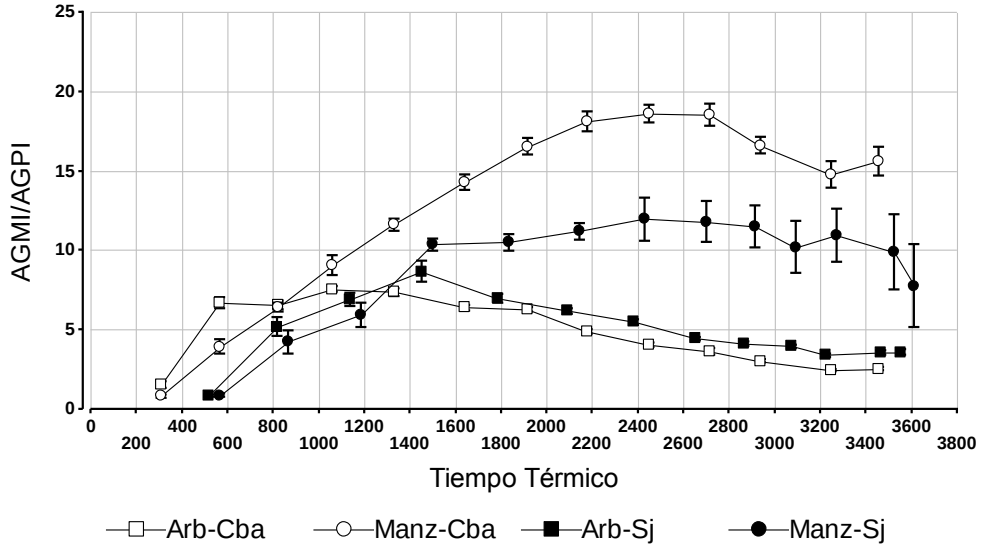


Tabla 16: Análisis de regresión no lineal a dos tramos para algunos componentes químicos del aceite de las variedades Arbequina y Manzanilla cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración. Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar. Ecuaciones de regresión: y = α + β1x (cuando x < γ); y = α + β2 * (x-γ) (cuando x ≥ γ), siendo "y" la variable dependiente, "α" la constante que indica el valor esperado de "y" cuando "x" = 0; "β1" es la pendiente en el primer tramo de la curva; "β2" es la pendiente en el segundo tramo de la curva, "γ" es el valor del momento de quiebre o "Break point" y "x" es la variable independiente o regresora (°Cd).

Parámetro	Cultivar	Ambiente	α	β_1	γ (Break point)	β_2	Valor en "Break point"
Ácido	Arbequina	Córdoba	27,44	-0,01	822,74	2,49E-03	15,78
Palmítico		San Juan	50,15	-0,04	886,57	5,51E-04	17,39
(%)	Manzanilla	Córdoba	29,62	-0,01	875,15	-8,60E-04	16,61
		San Juan	43,65	-0,03	904,72	-1,62E-03	18,39
Ácido palmitoleico	Arbequina	Córdoba	1,03	-1,20E-04	1660,67	1,29E-03	0,83
(%)		San Juan	0,76	1,01E-04	1908,37	7,84E-04	0,95
Ácido	Arbequina	Córdoba	4,07	-3,80E-03	556,06	-2,08E-04	1,94
Esteárico		San Juan	6,37	-4,90E-03	916,77	-1,34E-04	1,81
(%)	Manzanilla	Córdoba	3,87	-2,20E-03	994,95	-1,11E-04	1,64
		San Juan	4,96	-2,80E-03	1182,21	2,32E-04	1,69
Ácido	Arbequina	Córdoba	8,49	0,11	618,54	-7,76E-03	74,3
Oleico		San Juan	-33,65	0,11	919,36	-4,98E-03	72,01
(%)	Manzanilla	Córdoba	-1,62	0,1	704,23	2,54E-03	71,59
		San Juan	-2,31	0,06	1212,05	-1,90E-04	72,74
Ácido	Arbequina	Córdoba	22,79	-0,02	797,31	5,87E-03	5,23
Linoleico		San Juan	45,52	-0,04	932,93	4,63E-03	5,69
(%)	Manzanilla	Córdoba	25,01	-0,02	930,03	-1,16E-03	5,43
		San Juan	32,43	-0,02	1320,35	2,00E-03	4,39
Ácido	Arbequina	Córdoba	22,89	-0,03	606,32	-5,82E-04	2,06
Linolénico		San Juan	31,37	-0,03	921,89	-6,73E-04	2,03
(%)	Manzanilla	Córdoba	33,58	-0,05	638,25	-8,30E-04	2,54
		San Juan	27,05	-0,02	1261,46	-2,63E-04	1,34

Continuación Tabla 16

Parámetro	Cultivar	Ambiente	α	β_1	γ (Break point)	β_2	Valor en "Break point"
Tocoferoles	Arbequina	Córdoba	5754,6	-5,12	898,11	-2,94E-01	1157,37
Totales		San Juan	9943,3	-6,9	1244,49	-4,61E-01	1356,03
(mg/kg)	Manzanilla	Córdoba	6691	-6,49	906,36	-1,19E-01	805,71
		San Juan	7337,5	-4,55	1406,61	-3,19E-01	939,11
Escualeno	Arbequina	Córdoba	-48,8	2,59	1226,14	-1,01	3126,07
(mg/kg)		San Juan	515,6	2,24	1269,82	-1,02	3354,62
	Manzanilla	Córdoba	-3662,4	7,62	1399,23	-1,52	7001
		San Juan	3298,5	1,32	2675,01	-4,26	6828,48

Tabla 17: Aplicación de modelo mixto de medidas repetidas en el tiempo para algunos componentes químicos del aceite en los cultivares Arbequina y Manzanilla cultivados en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan, en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) a partir de la plena floración (DDPF). Los análisis fueron realizados a partir de datos recogidos durante dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre cultivares y ambientes.

Parámetro	Cultivar	Ambiente	Tasa de cambio primer tramo	R^2	Tasa de cambio segundo tramo	R^2
Ácido	Arbequina	Córdoba	-1,25[a]	0,74	0,24[a]	0,69
palmítico		San Juan	-1,96[a]	0,74	0,06[a]	0,69
(%/100 °Cd)	Manzanilla	Córdoba	-1,72[a]	0,74	-0,09[b]	0,69
		San Juan	-1,52[a]	0,74	-0,22[b]	0,69
Ácido palmitoleico	Arbequina	Córdoba			0,12[a]	0,81
(%/100 °Cd)		San Juan			0,10[a]	0,81
Ácido	Arbequina	Córdoba	-0,20[a]	68	-0,02[a]	0,41
esteárico		San Juan	-0,29[a]	0,68	-0,01[b]	0,41
(%/100 °Cd)	Manzanilla	Córdoba	-0,25[a]	0,68	-0,01[b]	0,41
		San Juan	-0,26[a]	0,68	0,03[c]	0,41
Ácido	Arbequina	Córdoba	10,21[a]	0,9	-0,69[b]	0,81
Oleico		San Juan	12,01[a]	0,9	-0,51[b]	0,81
(%/100 °Cd)	Manzanilla	Córdoba	10,83[a]	0,9	0,32[a]	0,81
		San Juan	10,15[a]	0,9	0,22[a]	0,81

Continuación Tabla 17

Parámetro	Cultivar	Ambiente	Tasa de cambio primer tramo	R^2	Tasa de cambio segundo tramo	R^2
Ácido	Arbequina	Córdoba	-1,82[a]	0,73	0,61[a]	0,87
linoleico		San Juan	-2,21[a]	0,73	0,49[a]	0,87
(%/100 °Cd)	Manzanilla	Córdoba	-2,11[a]	0,73	-0,01[c]	0,87
		San Juan	-2,12[a]	0,73	0,13[b]	0,87
Ácido	Arbequina	Córdoba	-3,31[b]	0,85	-0,062[a]	0,78
linolénico		San Juan	-3,35[b]	0,85	-0,067[a]	0,78
(%/100 °Cd)	Manzanilla	Córdoba	-4,87[a]	0,85	-0,084[b]	0,78
		San Juan	-3,33[b]	0,85	-0,089[b]	0,78
Tocoferoles	Arbequina	Córdoba	-467[a]	0,86	-32[b]	0,83
Totales		San Juan	-652[a]	0,86	-49[a]	0,83
(mg/kg/100 °Cd)	Manzanilla	Córdoba	-688[a]	0,86	-13[c]	0,83
		San Juan	-205[a]	0,86	-33[b]	0,83
Escualeno	Arbequina	Córdoba	179[c]	0,84	-95[b]	0,91
(mg/Kg/100 °Cd)		San Juan	97[c]	0,84	-91[b]	0,91
	Manzanilla	Córdoba	544[a]	0,84	-146[a]	0,91
		San Juan	360[b]	0,84	-175[a]	0,91

Componentes menores de frutos y aceites

Fracción fenólica

Algunas observaciones han permitido determinar que los aceites provenientes del mismo cultivar en distintas áreas geográficas presentan características significativamente diferentes respecto a la concentración de compuestos fenólicos mostrando que la tipicidad de los aceites está definida también por la zona de producción (Vihna et al., 2005; Tura et al., 2007).

La evolución de la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT) de los frutos no permite visualizar patrones comunes entre cultivares o ambientes (Fig. 47). El patrón que presenta la var. Arbequina cultivada en Córdoba muestra similitud con el de la var. Manzanilla cultivada en San Juan, de la misma manera que la tendencia observada en Arbequina – San Juan se asemeja a la de Manzanilla – Córdoba. Estos hechos sugieren que la dinámica de síntesis y acumulación de sustancias fenólicas en estos cultivares podría ser resultado de la co-variación debida tanto al genotipo como al ambiente de cultivo.

Independientemente del patrón presente en cada combinación cultivar – ambiente, el CFT medido a la finalización del periodo de estudio evaluado (210 – 220 DDPF, 3450 – 3650 ºCd) se reduce aproximadamente el 50 % con respecto a la concentración detectada en frutos obtenidos a los 30 – 50 DDPF (300 – 350 ºCd), resultando en cantidades comprendidas entre 20 y 40 mg fenoles totales/g de fruto, sin diferencias significativas, a excepción de Manzanilla - Córdoba que presenta la concentración más elevada. Esta diferencia en particular no puede ser explicada por el estado de maduración de los frutos ya que al momento de la última fecha de cosecha analizada, las muestras del cv. Manzanilla tomadas en ambos ambientes poseen IM muy semejantes (3,3 – 3,5). Al aplicar regresiones lineales simples para cada combinación cultivar-ambiente, a partir del momento en el cual la CFT comienza a disminuir, las pendientes estimadas son las siguientes: -0,49 (R^2 = 0,78) para Arbequina - San Juan; -0,20 (R^2 = 0,56) para Arbequina – Córdoba; -0,17 (R^2 = 0,57) para Manzanilla - San Juan; -0,50 (R^2 = 0,88) para Manzanilla – Córdoba.

Al analizar el efecto de las distintas fuentes de variación sobre el CFT, el cultivar y la época de recolección de los frutos representan las mayores fuentes de variabilidad. El efecto del ambiente no fue significativo (Tabla 18).

Tocoferoles

Esta fracción del aceite, analizada a través de sus componentes individuales, muestra tendencias similares en los dos cultivares y ambientes (Figs. 48 – 51), aunque con concentraciones iniciales mayores, obtenidas con valores de cargas térmicas más elevadas, en las muestras provenientes de San Juan. La dinámica de síntesis responde a modelos de regresión bi-lineal con dos fases de decrecimiento, la primera muy acentuada (tasas comprendidas entre -205 y -688 mg/kg/100 ºCd, sin diferencias significativas), y la segunda de menor intensidad (tasas comprendidas entre -13 y -49 mg/kg/100 ºCd, con diferencias significativas entre cultivares y ambientes) (Tabla 17). Luego de iniciado el periodo de maduración de los frutos, la concentración de tocoferoles totales se mantiene en valores entre 350 y 500 mg/Kg aceite. Estos valores resultan sustancialmente más elevados que aquellos obtenidos en otros ambientes. Ceci y Carelli (2007) han encontrado concentraciones de tocoferoles totales comprendidas entre 190 – 463, y entre 212 - 328 mg/kg en aceites de los cvs. Arbequina y Manzanilla, respectivamente, extraídos a partir de frutos con distintos grados de maduración, de distintas zonas de producción de Argentina. Por su parte, Uceda et al. (2008) informan un contenido de tocoferoles totales menor a 200 mg/kg en el aceite del cv. Manzanilla de diferentes orígenes geográficos. Asimismo, Beltrán et al. (2010) reportan concentraciones promedio de α-tocoferol de 150 mg/kg y de 230 mg/kg aceite en muestras de frutos de las variedades Manzanilla y Arbequina, respectivamente, cultivadas en España.

Cuando se analizan las diferentes fuentes de variación sobre el contenido de tocoferoles totales (Tabla 18), sólo se observa un efecto estadísticamente significativo de la época de recolección de los frutos y de su interacción con el ambiente de cultivo.

Escualeno

A pesar de ser el hidrocarburo mayoritario, son escasos los estudios sobre la dinámica de este compuesto conforme avanza el crecimiento y maduración del fruto (Baccouri et al., 2008; Sakouhi et al., 2011[b]) y sobre la influencia del ambiente en su contenido (Di Vaio et al. 2012).

La evolución de la concentración de este metabolito presenta una fase de acumulación intensa, de duración variable, seguida de otra de declinación más o menos pronunciada (Fig. 52). En cada una de las mismas, las tasas de cambio no registran diferencias estadísticamente significativas entre ambientes (Tabla 17).

En los dos ambientes, el cv. Manzanilla muestra tasas de incremento más elevadas y periodos de acumulación algo más prolongados que los correspondientes al cv. Arbequina. Esto resulta en concentraciones máximas significativamente mayores en el primero (6400 – 6700 mg/kg, las cuales se alcanzan entre 1500 – 1900 ºCd) respecto del segundo (3000 – 4000 mg/kg, entre 1050 – 1450 ºCd).

El contenido de escualeno muestra una clara influencia de la época de recolección de los frutos, del cultivar y de su interacción con el ambiente, y un efecto de menor magnitud del ambiente de cultivo (Tabla 18).

Figura 47: Evolución del contenido de fenoles totales (mg/g fruto, SBS) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

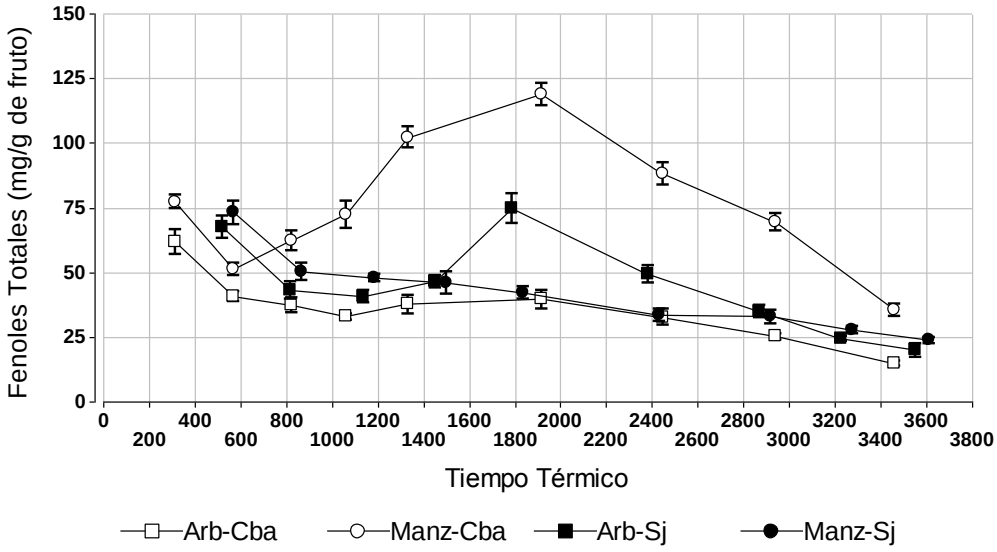


Figura 48: Evolución del contenido de tocoferoles totales (mg/kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

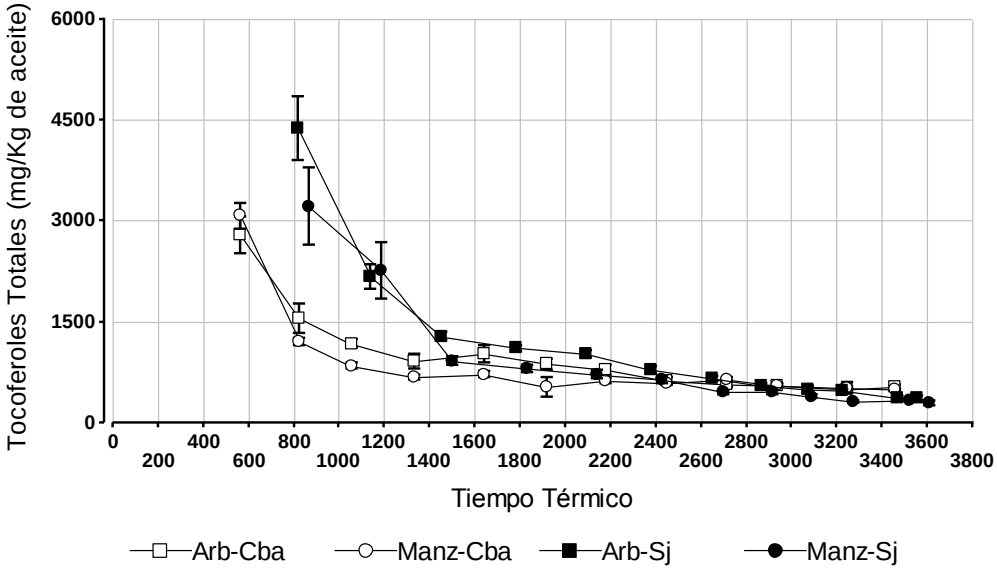


Figura 49: Evolución del contenido de α-Tocoferol (mg/kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

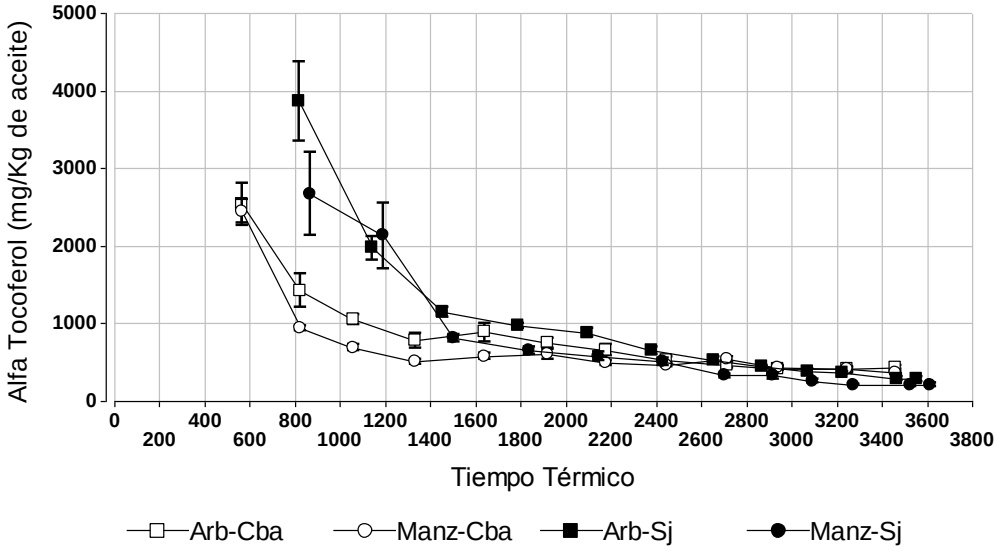


Figura 50: Evolución del contenido de β-Tocoferol (mg/kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

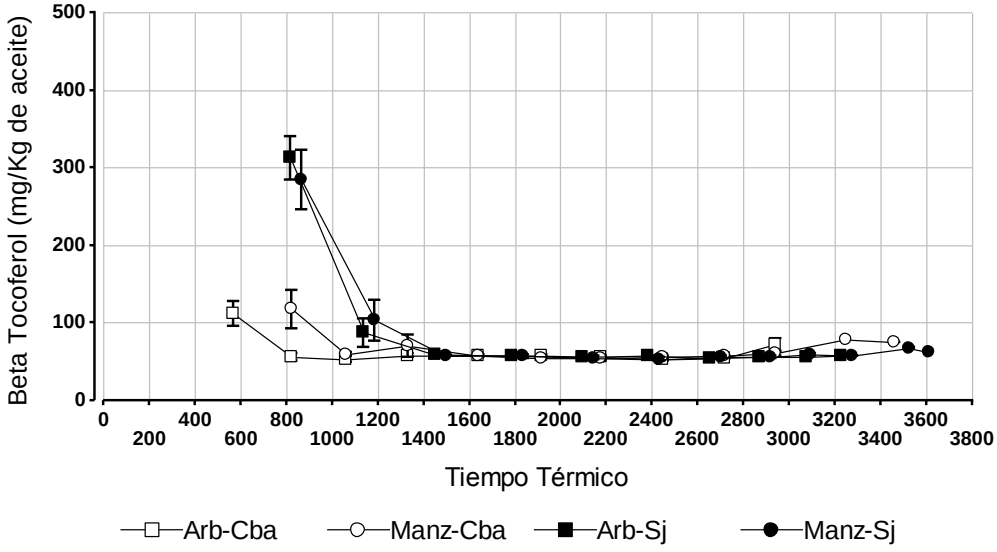


Figura 51: Evolución del contenido de γ-Tocoferol (mg/kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

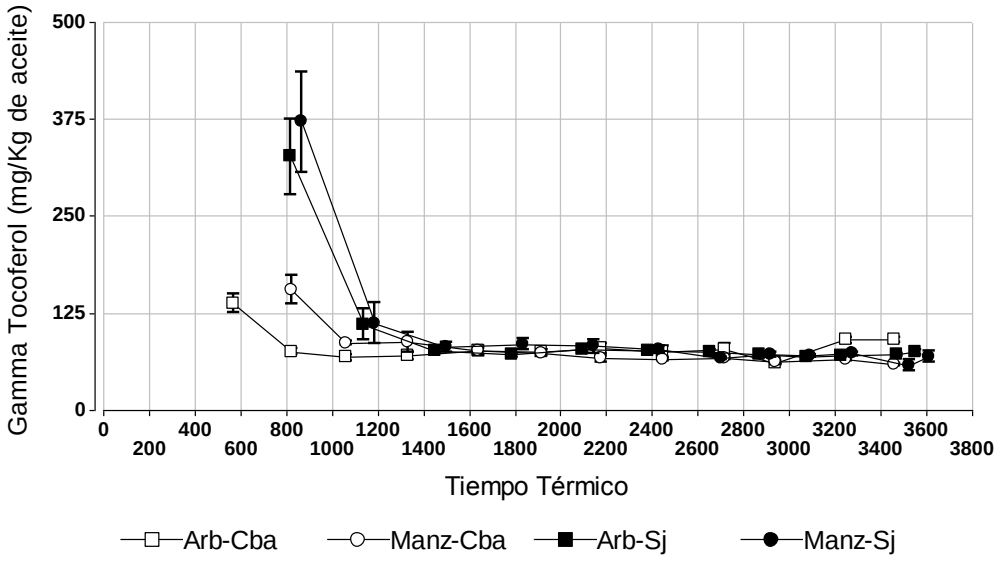


Figura 52: Evolución del contenido de escualeno (mg/kg de aceite) en función del tiempo térmico acumulado (ºCd) en dos variedades de olivo cultivadas en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Los datos representan el promedio de dos ciclos de cultivo (CC, 2010-11 y 2011-12). En cada CC se utilizaron 5 árboles por cultivar y ambiente.

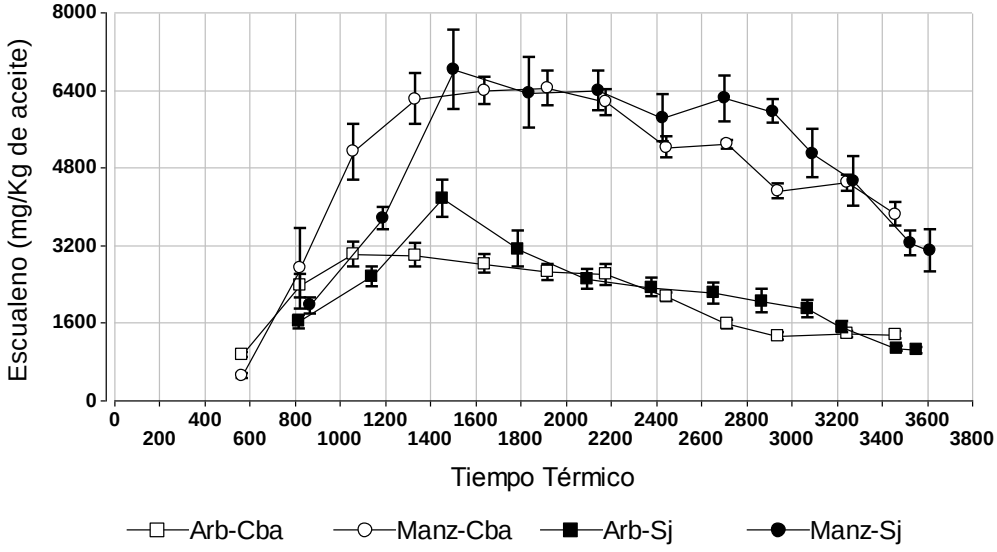


Tabla 18: Efecto de diferentes fuentes de variabilidad (C, cultivar; A, ambiente; ER, época de recolección de los frutos) y sus interacciones para algunos parámetros químicos analizados en frutos y aceites de las cultivares Arbequina y Manzanilla, cultivados en Cruz del Eje – Córdoba y en EEA – INTA San Juan. Significancia estadística: * p ≤ 0,01.

Parámetro	**C**	**A**	**ER**	**C X A**	**C x ER**	**A x ER**
Concentración de aceite	1,12*	2,18*	72,43*	0,16	0,68	1,12*
Acidos grasos						
Ac. palmítico	12,51*	0,01	37,19*	0,076	11,15*	6,30*
Ac. palmitoleico	6,08*	1,32*	32,42*	0,09	13,33*	3,94*
Ac. esteárico	2,21*	4,24*	41,65*	2,31*	3,30*	3,11*
Ac. oleico	9,61*	0,15	54,97*	0,23	11,12*	1,78*
Ac. linoleico	22,39*	0,95	31,28*	0,69	16,57*	0,95
Ac. linolénico	0,74*	0,002	83,31*	0,01	1,83*	0,38
Componentes menores						
Escualeno	52,46*	0,60	16,77*	0,04	5,73*	1,69*
Tocoferoles totales	0,32	0,18	79,56*	0,04	0,62	3,79*
Fenoles totales	14,23*	2,76*	26,17*	19,74*	2,15*	5,52*

Conclusiones

Los registros térmicos obtenidos durante el periodo primavero-estival, coincidente con las fases fenológicas de cuajado, crecimiento y maduración de los frutos, presentan escasas diferencias entre los sitios de cultivo evaluados. No obstante, los dos cultivares analizados muestran variaciones entre ambientes, principalmente en los patrones de síntesis y acumulación de materia seca, aceite y ácidos grasos mayoritarios. Estos hechos indicarían la concurrencia de otros factores ambientales como moduladores del desarrollo de los frutos, la acumulación de fotoasimilados, y la biogénesis y composición del aceite.

Dado el amplio periodo ontogénico evaluado, que abarca distintas fases fenológicas del desarrollo y la maduración de los frutos, la época de recolección de los mismos constituye el principal factor de variabilidad para los parámetros químicos analizados, a excepción del contenido de sustancias fenólicas. El genotipo y su interacción con la época de cosecha representan fuentes de variación de mayor magnitud que el ambiente para las concentraciones de los ácidos grasos mayoritarios, fenoles y escualeno. Para el contenido de aceite, por el contrario, es mayor la influencia del ambiente de cultivo.

Si se tienen en cuenta las concentraciones de aceite y de ácido oleico como parámetros clave en variedades cuyo destino principal es la oleicultura, los datos obtenidos ponen de relieve que el cv. Arbequina expresa su mayor potencial en el ambiente de cultivo de la provincia de San Juan (Dpto. San Martín). Los resultados muestran también mayores variaciones entre ambientes en el cv. Arbequina sugiriendo una menor plasticidad fenotípica en este cultivar respecto de Manzanilla.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

En Argentina, el área de cultivo del olivo se ha expandido más allá de las regiones tradicionales de producción, abarcando actualmente un amplio gradiente latitudinal. Una dificultad a la que se enfrenta la producción nacional de aceites de oliva, principalmente la de aquellos provenientes de la región noroeste del país, guarda relación con algunos parámetros reglamentados de calidad (en especial el contenido de ácido oleico) los cuales pueden estar fuera de los límites establecidos por el Consejo Oleícola Internacional para aceite de oliva virgen extra. En particular, los aceites obtenidos del cv. Arbequina presentan menores contenidos de ácido oleico con respecto a los producidos en países de la cuenca Mediterránea para este mismo cultivar. Desde el punto de vista práctico, el aspecto mencionado puede constituir un obstáculo para la comercialización de los aceites, sobretodo en el mercado internacional. En nuestro país, en las zonas donde este cultivo tiene lugar, el régimen de temperatura del aire a lo largo del año es diferente respecto de la región Mediterránea, siendo las temperaturas de invierno y primavera sustancialmente mayores. Esta situación trae aparejada un adelanto en la fenología del cultivo; la fase de acumulación de aceite tiene lugar principalmente en el verano con temperaturas medias más elevadas que aquellas registradas en las regiones de cultivo del hemisferio norte.

Si bien las rutas biosintéticas que conducen a la formación de ácidos grasos en el fruto del olivo empiezan a ser bien conocidas, muy poco se sabe sobre su regulación. En este sentido, resulta de interés determinar el papel de la expresión genética de una familia de enzimas relacionadas con las primeras etapas de la desaturación de los ácidos grasos. Una de las enzimas clave en esa secuencia de reacciones es la oleil-ACP desaturasa (FAD2), la cual cataliza la transformación del ácido oleico en linoleico. Algunos trabajos realizados en Argentina han revelado una relación negativa entre el contenido de ácido oleico y la temperatura media durante la fase de acumulación de aceite sugiriendo un posible efecto de la misma sobre la actividad de desaturasas involucradas en el metabolismo de este ácido graso.

Considerando la problemática que plantea el cultivo del olivo en los valles cálidos del noroeste argentino resulta de interés el estudio de la regulación ambiental de los marcadores moleculares mencionados, en variedades de olivo cultivadas en ambientes con distintas

características agro-climáticas, como las que se observan en el gradiente latitudinal donde se desarrolla el cultivo en Argentina. Estos estudios permitirán generar conocimientos básicos que pueden ser aplicados a programas de mejoramiento del cultivo, con el objetivo de obtener nuevos genotipos con mejores características (ej: mayor nivel de ácido oleico) en sus aceites.

BIBLIOGRAFIA

Agramont, A., López, M.C., Boatella, J., de la Torre, M.C. 1986. Évolution de la teneur en tocophérols et en tocotrienols pendant le mûrissage des olives. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 63: 443-447.

Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, G., Servili, M., Baldoni, L. 2012. Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol* .12: 162-180.

Alderete Salas, S., Matías, A.C., Montalván, D., Gómez, P. 2005. Caracterización de la producción olivícola de la provincia de Catamarca- República Argentina. *Grasas y Aceites* 60: 526-531.

Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M. 1998. Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements. (FAO irrigation and drainage paper no. 56). FAO, Rome.

Andjelkovic, M., Van Camp, J., Pedra, M., Renders, K., Socaciu, C., Verhé, R. 2008. Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5181-5187.

AOCS, 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign, USA.

Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A., Gutiérrez, F. 1999. Effect of various compounds in virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food Chem*. 47: 4150-4155.

Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Rivera del Álamo, R.M., Salvador, M.D., Fregapane, G. 2004. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chem*. 86: 485-492.

Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. 2000. Virgin olive oil odour notes: their relationship with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem*. 68: 283-287.

Ayers, R.S., Westcot, D.W. 1985. Water quality for agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper 29 Rev.1, Roma, 174 p.

Aziz, N.H., Farag, S.E., Mousa, L.A.A., Abo Zaid, M.A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 93: 43-54.

Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Ben Miled, D.D. 2008. Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem.* 109: 743-754.

Baiano, A., Gambacorta, G., Terracone, C., Previtali, M.A., Lamacchia, C., La Notte, E. 2009. Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *J. Food Sci*. 74: 177-183.

Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., Montedoro, G.F. 1996. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 73: 1589-1593.

Ballus, C.A., Meinhart, A.D., Souza Campos, F.A., Oliveira da Silva, L.F., Oliveira, A.F., Godoy, H.T. 2014. A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. *Food Res. Int.* 62: 74-83.

Barranco, D. 2008. Variedades y patrones. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández-Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 63-92.

Barranco Navero, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo Romero, L., Touzani, A., Castañeda, C., Serafini, F., Trujillo Navas, I. 2000. Catálogo Mundial de Variedades de Olivo. Ed. Consejo Oleícola Internacional. Madrid, España, 360 pp.

Bartolini, G., Prevost, G., Meseri, C., Carignani, G. 1998. Olive Germplasm: Cultivars and World-Wide Collections. FAO, Roma, 459 pp.

Beltrán, G., Del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L. 2004. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3434-3440.

Beltrán, G., Aguilera, M.P., del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L. 2005. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem*. 89: 207-215.

Beltrán, G., Uceda, M., Hermoso, M., Frías, L. 2008. Maduración. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y L, Rallo, Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 163-187.

Beltrán, G., Jiménez, A., del Río, 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 Comp. Anal.* 23: 633-639.

Bendini, A., Cerretani, L., Vecchi, S., Carrasco-Pancorbo, A., Lercker, G., 2006. Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *J. Agric. Food Chem*. 54: 4880-488.

Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F., Nucci, R. 2002. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science* 162: 791-798.

Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G., Toschi, T.G. 2004. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a fuction of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7026-7032.

Bouaziz, M., Chamkha, M., Sayadi, S. 2004. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem*. 52: 5476-5481.

Cao, Y., Huang, A.H.C. 1986. Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and other species. *Plant Physiol.* 82: 813-820.

Cao, Y., Oo, K., Huang, A.H.C. 1990. Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Physiol.* 94: 1199-1206.

Caponio, F., Gomes, T., Pasqualone, A. 2001. Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *Eur. Food. Res. Technol.* 212: 329-333.

Caruso, G., Gucci, R., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A., Di Maio, I., Selvaggini, R., Servili, M. 2014. Effect of different irrigation volumes during fruit development on quality of virgin olive oil of cv. Frantoio. *Agric. Water Manag.* 134: 94-103.

Cavagnaro, P.F., Masuelli, R.W. 2002. La homogeneidad varietal en viveros de olivo estudiada con marcadores moleculares. Rev. FCA UNCuyo. Tomo XXXIV. N° 2: 17-26.

Ceci L.N., Carelli A.A. 2007. Characterization of monovarietal argentinian olive oils from new productive zones. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 84: 1125-1136.

Cevdet, N., Yesim, E. 2000. Compositional variation of olive fruit during ripening. *Food Chem.* 69: 55-59.

Chen, G.Q., Turner, C., He, X., Nguyen, T., McKeon, T.A., Laudencia-Chingcuanco, D. 2007. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in castor bean (*Ricinus communis* L). *Lipids* 42: 263-274.

Chen, X., Snyder, C.L., Truksa, M., Shah, S., Weselake, R.J. 2011. *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. *Plant Signal Behav*. 6: 1695-1699.

Cherbiy-Hoffmann, S.U., Searles, P.S., Hallb, 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. *Scientia Horticulturae* 137: 36-42.

Cherbiy-Hoffmann, S.U., Hallb, A.J., Rousseaux, M.C. 2013. Fruit, yield, and vegetative growth responses to photosynthetically active radiation during oil synthesis in olive trees. *Scientia Horticulturae* 150: 110-116.

Cicerale, S., Lucas, L.J., Keast, K.S.J. 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr. Op. Biotech.* 23: 129-135.

Cimato, A., Cantini, C., Sani, G. 1990. Climate-phenology relationships on olive cv. Frantoio. *Acta Horticulturae* 286: 171-174.

Cioffi, G., Pesca, M.S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., De Tommasi, N. 2010. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem.* 121: 105-111.

Civantos, H.F. 2008. La olivicultura en el mundo y en España. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 17-35.

Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. 2008. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J. Plant Physiol.* 165: 1545-1562.

Cunha, S.C., Amaral, J.S, Fernandes, J.O., Oliveira, M.B. 2006. Quantification of tocopherols and tocotrienols in portuguese olive oils using HPLC with three different detection systems. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3351-3356.

Dabbou, S., Dabbou, S., Chehab, H., Brahmi, F., Taticchi, A., Servili, M., Hammami, M. 2011. Chemical composition of virgin olive oils from Koroneiki cultivar grown in Tunisia with regard to fruit ripening and irrigation regimes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46: 577-585.

Dag, A., Kerem, Z., Yogev, N., Zipori, I., Lavee, S., Ben-David, E. 2011. Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Sci. Hortic*. 127: 358-366.

Dag, A., Harlev, G., Lavee, S., Zipori, I., Kerem, Z. 2014. Optimizing olive harvest time under hot climatic conditions of Jordan Valley, Israel. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 116: 169-176.

Dalla lasta, M. 2006. Estudio de parámetros de genuinidad de aceites varietales de la provincia de Catamarca- Campaña 2005. *Aceites y Grasas* 63: 312-317.

Damak, N., Bouaziz, M., Ayadi, M., Sayadi, S., Damak, M. 2008. Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids, and antioxidant activity of the Chétoui olive fruit cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1560-1566.

De la Rosa, R., Talhaoui, N. Rouis, H., Velasco, L., León, L. 2013. Fruit characteristics and fatty acid composition in advanced olive breeding selections along the ripening period. *Food Res. Int.* 54: 1890-1896.

Dionisi, F., Prodolliet, J., Tagliaferri, E. 1995. Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high performance liquid chromatography/amperometric detection of tocopherols and tocotrienols. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 72: 1505-1511.

Di Vaio, C., Nocerino, S., Paduano, A., Sacchi, R. 2012. Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition. *J. Sci. Food and Agric.* 93: 1134-1139.

Eccleston, V.S., Harwood, J.L. 1995. Solubilisation, partial purification and properties of acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1257: 1-10.

Essiari, M., Zouhair, R., Chimi, H. 2014. Contribución al estudio de la tipicidad de los aceites de oliva vírgenes producidos en la región de Sais (Marruecos). *Olivae* 119: 8-23.

Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G.F., Morozzi, G. 2002. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Eur. J. Cancer Prev.* 11:351-358.

Fereres, E., Pruitt, W.O., Beutel, J.A., Henderson, D.W., Holzapfel, E., Schulbach, H., Uriu, K. 1981. Evapotransporation and drip irrigation scheduling. En: Drip irrigation management (Fereres, E., Ed.). Division of Agricultural Sciences, University of California, California, pp. 8-13.

Finotti, E., Beye, c., Nardo, N., Quaglia, G.B., Milin, C., Giacometti, J. 2001. Physico-chemical characteristics of olives and olive oil from two mono-cultivars during various ripening phases. *Nahrung Food* 45: 350-352.

Galeano Díaz, T., Durán Merás, I., Sánchez Casas, J., Alexandre Franco, M.F. 2005. Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. *Food Control* 16: 339-347.

Galli, C., Visioli, F. 1999. Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids* 34: 523-526.

García-Inza, G.P., Castro, D.N., Hall, A.J., Rousseaux, M.C. 2014. Responses to temperature of fruit dry weight, oil concentration, and fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L. var. ´Arauco´). *Eur. J. Agron*. 54: 107-115.

Girona, J., Luna, M., Arbonés, A., Mata, M., Rufat, J., Marsal, J. 2002. Young olives trees responses (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) to different water supplies. Water function determination. *Acta Hortic.* 586: 277-280.

Gómez-González, S., Ruiz-Jiménez, J., De Castro, M.D.L. 2011. Oil content and fatty acid profile of Spanish cultivars during olive fruit ripening. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 88: 1737-1745.

Gómez-Rico, A., Fregapane, G., Salvador, M.D. 2008. Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Res. Int*. 41: 433-440.

Gucci, R., Lodolini, E., Rapoport, H.F. 2007. Productivity of olive trees with different water status and crop load. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 82: 648-656.

Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., Albi, M.A. 1999. Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *J. Agric. Food Chem*. 47: 121-127.

Gutiérrez-Rosales, F., Paz Romero, M., Casanovas, M., Motilva, M.J., Mínguez-Mosquera, M.I. 2012. β-Glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropein during the growth and development of olive fruits (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *J. Agric. Food Chem*. 60: 4348−4358.

Haddam, M., Chimi, H., El-Antari, A., Zahouily, M., Mouhibi, R., Zaz, A., Ibrahimi, M., Amine, A. 2014. Caracterización fisicoquímica y estabilidad oxidativa de los aceites de oliva de las variedades 'Picholine marocaine', 'Haouzia', 'Koroneiki' y 'Arbequina' de la región oleícola central de Marruecos (Chauía-Uardiga). *Olivae* 119: 24-36.

Hammami, S.B.M., Manrique, T., Rapoport, H.F. 2011. Cultivar-based fruit size in olive depends on different tissue and cellular processes throughout growth. *Sci. Hort.* 130: 445-451.

Harwood, J.L. 1998. Environmental effects on plant lipid biochemistry. En: Plant lipid biosynthesis (Harwood, J.L., Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 305-347.

Hernández, M.L., Mancha, M., Martínez-Rivas, J.M. 2005. Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturasas (FAD2) from olive. *Phytochem*. 66: 1417-1426.

Hernández, M.L., Padilla, M., Mancha, M., Martínez-Rivas, J.M. 2009. Expression analysis identifies FAD2-2 as the olive desaturase gene mainly responsible for the linoleic acid content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 6199-6206.

Ichihara, K., Asahi, T., Fujii, S. 1987. 1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase in maturing safflower seeds and its contribution to the non-random fatty acid distribution of triacylglycerol. *Eur. J. Biochem.* 167: 339-347.

Ichihara, K., Takahashi, T., Fujii, S. 1988. Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds: its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 958: 125-129.

IOOC. 2000. International Olive Council trade standard applying to olive oil and olive-pomace oil. International Olive Oil Council. En: www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/222-standards.

Jiménez, A., Uceda, M. 1995. Características químicas y organolépticas del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. I Simposio del olivo Arbequino en Cataluña, Borges Blanques, pp. 145-148.

Jiménez, B., Sánchez-Ortiz, A., Lorenzo, M.L., Rivas, A. 2013. Influence of fruit ripening on agronomic parameters, quality indices, sensory attributes and phenolic compounds of Picudo olive oils. *Food Res. Int.* 54: 1860-1867.

Kitsaki, C. Andreadis, E., Bouranis, D. 2010. Developmental events in differentiating floral buds of four olive (*Olea europaea* L.) cultivars during late winter to early spring. *Flora* 205: 599-607.

Lanzón, A., Guinda, A., Albi, T., De la Osa, C. 1995. Método rápido para la determinación de escualeno en aceites vegetales. *Grasas y Aceites* 46: 276-278.

Lavee, S. 1986. Olive. En: Handbook of fruit set and development (Monselise, S., Ed.). CRC Press, pp. 261-276.

Lavee, S., Wodner, M. 1991. Factors affecting the nature of oil accumulation in fruit of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Hortic. Sci.* 66: 583-591.

Lavee, S. 1994. ¿Por qué la necesidad de nuevas variedades de olivos? En: Olivicultura. Barcelona: Fundación La Caixa - Ed. Agrolatino, pp. 29-37.

Lavee, S., Wodner, M. 2004. The effect of yield, harvest time and fruit size on the oil content in fruits of irrigated olive trees (*Olea europaea* L.), cvs. Barnea and Manzanillo. *Sci. Hortic.* 99: 267-277.

Lavee, S., Hanoch, E., Wodner, M., Abramowitch, H. 2007. The effect of predetermined determined deficit irrigation on the performance of cv. Muhasan olives (*Olea europaea* L.) in the eastern coastal plain of Israel*. Sci. Hort.* 112: 156-163.

Lavelli, V., Bondesan, L. 2005. Secoiridoids, tocopherols, and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils extracted from destoned fruits. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1102-1107.

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.

Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., Zetta, L. 1995. ^{1}H and ^{13}C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *J. Chem. Soc*. 1: 1519-1523.

Lombardo, N., Marone, E., Alessandrino, M., Godino, G. 2008. Influence of growing season temperatures in the fatty acids (FAs) of triacilglycerols (TAGs) composition in Italian cultivars of *Olea europaea* L*. Adv. Hort. Sci.* 22: 49-53.

Lou-Bonafonte, J.M., Arnal, C., Navarro, M.A., Osada, J. 2012. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 1043-57.

Lung, S., Weselake, R.J. 2006. Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 41: 1073-1088.

Maestri, D.M., Labuckas, D.O., Meriles, J.M., Lamarque, A.L., Zygadlo, J.A., Guzmán, C.A. 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.

Malik, N.S.A., Bradford, J.M. 2009. The effect of high daytime temperatures on inhibition of flowering in 'Koroneiki' olives (*Olea europaea* L.) under chilling and non-chilling nighttime temperatures. *J. Appl. Hortic.* 11: 90-94.

Mannina, L.Fontanazza, G., Patumi, M., Ansanelli, G., Segre, A. 2001. Italian and Argentine olive oils: a NMR and gas cromatographic study. *Grasas y Aceites* 52: 380-388.

Manrique, T. 1997. Pautas y procesos celulares en el crecimiento de la aceituna. Tesis de Maestría. Universidad de Córdoba, 95 pp.

Manrique, T., Castro, J., Pastor, M., Rapoport, H.F. 1999. Mesocarp cell division and expansion in the growth of olive fruit. *Acta Hort*. 474: 301-304.

Martínez, M.L., Maestri, D.M. 2008. Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 1183-1189.

Martín-Vertedor, A.I., Pérez Rodríguez, J.M., Prieto Losada, H., Fereres Castiel, E. 2011. Interactive responses to water deficits and crop load in olive (*Olea europaea* L., cv. Morisca). II: Water use, fruit and oil yield. *Agric. Water Manag.* 98: 950-958.

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.

Mateos, R., Domínguez, M.M., Espartero, J.L., Cert, A. 2003. Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgen olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7170-7175.

Matías, A.C., Luna, M.C. Moyano, P.L. Alderete Salas, S., Gómez, P.E. Dalla Lasta, F., Benítez, J.L. Montalván, L.D. 2004. Determinación del momento oportuno de cosecha para la obtención de aceite de oliva virgen extra de las variedades Pendolino, Moraiolo, Picual y Arbequina cultivadas en el valle central de Catamarca. *Aceites y Grasas* 57: 676-681.

Matos, L.C., Cunha, S.C., Amaral, J.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Seabra, R.M. Oliveira, B.P.P. 2007. Chemometric characterization of three varietal olive oils (Cvs. Cobrancosa,

Madural and Verdeal Transmontana) extracted from olives with different maturation indices. *Food Chem*. 102: 406-414.

Matteucci, M., D'Angeli, S., Errico, S., Lamanna, R., Perrotta, G., Altamura, M.M. 2011. Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europaea* L. genotypes with different cold hardiness. *J. Exp. Bot.* 62: 3403-3420.

Menz, G., Vriesekoop, F. 2010. Physical and chemical changes during the maturation of Gordal Sevillana olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana). *J. Agric. Food Chem*. 58: 4934-4938.

Moghaddam, G., Vander Heyden, Y., Rabiei, Z., Sadeghi, N., Oveisi, M.R., Jannat, B., Araghi, V., Asan, S., Behzad, M., Hajimahmoodi, M. 2012. Characterization of different olive pulp and kernel oils. *J. Food Comp. Anal.* 28: 54-60.

Morelló, J.R., Romero, M.P., Motilva, M.J. 2004. Effect of the maturation process of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6002-6009.

Morelló, J.R., Romero, M.P., Ramo, T., Motilva, M.J. 2005. Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Sci*. 168: 65-72.

Moscatelli, G., Muro, E.E., Salazar, L.P., Gorgas J.C. 1990. Atlas de suelos de la República Argentina. Buenos Aires

Murphy, D.J. 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog. Lipid Res*. 32: 247-280.

Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Perri, E., Chiappetta, A.A. 2011. Transcript levels of CHL P gene, antioxidants and chlorophylls contents in olive (*Olea europaea* L.) pericarps: A comparative study on eleven olive cultivars harvested in two ripening stages. *Plant Food Hum. Nutr.* 66: 1-10.

Oliveras-López, M.J., Innocenti, M., Ieri, F., Giaccherini, C., Romani, A., Mulinacci, N. 2008. HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europaea* L. fruits. *J. Food Comp. Anal*. 21: 62-70.

Ollivier, D., Pinatel, C., Ollivier, V., Artaud, J. 2014. Composición de ácidos grasos y triglicéridos de aceites de oliva vírgenes de 34 variedades y 8 denominaciones de origen francesas, y de 2 variedades extranjeras implantadas en Francia: elaboración de un banco de datos (Parte I). *Olivae* 119: 37-49.

Olmedo, R., Asensio, C., Nepote, V., Mestrallet, M.G., Grosso, N.R. 2009. Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essencial oil and olive oil. *J. Sci. Food Agric*. 89: 2128-2136.

Oo, K.C., Chew, Y. H. 1992. Diacylglycerol acyltransferase in microsomes and oil bodies of oil palm mesocarp. *Plant Cell Physiol.* 33: 189-195.

Orgaz, F., Fereres, E. 2008. Riego. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 337-362.

Orlandi, F., Bonofiglio, T., Romano, B., Fornaciari, M. 2012. Quanlitative and quiatitative aspects of olive production in relation to climate on southern Italy. *Sci. Hortic*. 138: 151-158.

Ortega García, F., Peragón, J. 2009. Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *J. Agric. Food Chem*. 57: 10331-10340.

Owen, R.W., Mier, W., Giacosa A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2000. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem*. *Toxicol*. 38: 647-659.

Palese, A.M., Nuzzo, V., Favati, F., Pietrafesa, A., Celano, G., Xiloyannis, C. 2010. Effects of water deficit on the vegetative response, yield and oil quality of olive trees (*Olea europaea* L., cv. Coratina) grown under intensive cultivation. *Sci. Hortic.* 125: 222-229.

Panzanaro, S., Nutricati, E., Miceli, A., De Bellis, L. 2010.Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 48: 741-745.

Pierantozzi, P. 2012. Aplicación de distintos niveles de estrés hídrico durante el periodo prefloración-floración del olivo (*Olea Europaea* L.): influencia sobre parámetros agronómicos, bioquímico-fisiológicos y productivos. Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Pierantozzi, P., Torres, M., Lavee, S., Maestri, D. 2014. Vegetative and reproductive responses, oil yield and composition from olive trees (*Olea europaea* L.) under contrasting water availability during the dry winter-spring period in central Argentina. *An. Appl. Biol*. 164: 116-127.

Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D. 2000. α-Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem. 48*: 1770-1775.

Psomiadou, E., Tsimidou, M. 2002. Stability of virgin olive oil. 2. Photo-oxidation studies. *J. Agric. Food Chem.* 50: 722-727.

Rallo, P., Rapoport, H.F. 2001. Early growth and development of the olive fruit mesocarp. *J. Hort. Sci. Biotech*. 76: 408-412.

Rallo, L., Cuevas, J. 2008. Fructificación y producción. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 127-162.

Ramli, U.S., Baker, D.S., Quant, P.A., Harwood, J.L. 2002. Control mechanism operating for lipid biosynthesis differ in oil-palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and olive (*Olea europaea* L.) callus culture*. Biochem. J.* 364: 385-391.

Rannali, A., Tombesi, A., Ferrante, M. L., De Mattia, G. 1998. Respiratory rate olive drupes during their ripening cycle and quality of oil extracted. *J. Sci. Food Agric*. 77: 359-367.

Rangel, B., Platt, K.A., Thomson, W.W. 1997. Ultraestructural aspects of the cytoplasmic origin and accumulation of oil in olive fruit (*Olea europaea* L.). *Physiol. Plant.* 101: 109-114.

Ravetti, L. 1999. Caracterización preliminar de variedades y aceites de oliva vírgenes de la provincia de Catamarca. *Aceites y Grasas* 36: 361-369.

Rapoport, H.F. 2008. Botánica y morfología. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández-Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 37-62.

Romano, R., De Micco, V., Aronne, G. 2004. Caratteristiche istologiche e citologiche dei frutti di alcune cultivar di olivo. *Riv. Ital. Sost. Grasse* LXXXI: 73-79.

Romero-Segura, C., Sanz, C., Pérez, A.G. 2009. Purification and characterization of an olive fruit β-glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7983-7988.

Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lercker, G., Toschi, T.G. 2004. Effect of olive ripening degre on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrata di Brisighella extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem*. 52: 3649-3654.

Rondanini, D.P., Castro, D.N., Searles, P.S., 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.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.

Ross, J.H.E., Sánchez, J., Millán, F., Murphy, D.J. 1993. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissue in olive (*Olea europaea* L.) and avocado (*Persea americana*). *Plant Sci.* 93: 203-210.

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.

Rovellini, P., Azzolini, M., Cortesi, N. 1997. Tocoferoli e tocotrienoli in oli e grassi vegetali mediante HPLC. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 74: 1-5.

Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sci. Hortic*. 92: 147-176.

Ryan, D., Prenzler, P., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. 2003. Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Hardy´s Mammoth. *J. Agric. Food Chem*. 51: 2532-2538.

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 europaea* L.): Changes in their composition during ripening and processing. *Food Chem.* 108: 833-839.

Sakouhi, F., Herchi, W., Sebei, K., Absalon, C., Kallel, H., Boukhchina, S. 2011[a]. Accumulation of total lipids, fatty acids and triacylglycerols in developing fruits of *Olea europaea* L. *Sci. Hortic*. 132: 7-11.

Sakouhi, F., Herchi, W., Sebei, K., Absalon, C., Boukhchina, S. 2011[b]. Characterization and accumulation of squalene and n-alkanes in developing Tunisian *Olea europaea* L. fruits. *Int. J. Food Sci. Technol*. 46: 2281-2286.

Salas, J.L., Sánchez, J., Ramli, U.S., Manaf, A.M., Williams, M., Harwood, J.L. 2000. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Prog. Lipid Res.* 39: 151-180.

Salas Alderete, S., Gómez, P.E. Matías, A.C. Moyano, P.L., Luna, M.C., Benítez, J., Dalla Lasta, F., Montalván, L.D. 2004. Influencia de las condiciones ambientales en la composición de ácidos grasos de los aceites de oliva virgen de Catamarca. *Aceites y Grasas* 55: 336-342.

Salvador, M.D., Aranda, F., Fregapane, G. 1998. Contribution of chemical components of Cornicabra virgin olive oils to oxidative stability. A study of three successive crop seasons. *J. Am. Oil Chem. Soc*. 76: 427-432.

Salvador, MD, Aranda, F, Fregapane, G. 2001. Influence of fruit ripening on Cornicabra virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chem*. 73: 45-53.

Samaniego-Sánchez, C., Quesada-Granados, J.J., López-García de la Serrana, H., López-Martínez, M.C. 2010. β-Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic

method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *J. Food Comp. Anal*. 23: 671-676.

Searles, P.S., Agüero Alcarás, M., Rousseaux, M.C. 2011. El consumo de agua por el cultivo de olivo (*Olea europaea* L.) en el noroeste de Argentina: una comparación con la Cuenca Mediterránea. *Ecología Austral* 21: 15-28.

Searles, P., Rosseaux, M.C., Ladux, Trentacoste, E., Arjona, C., Cólica, J., Matías, C., Bueno, L., Vita Serman, F. 2012. Argentina. En: Following Olive Footprints (*Olea europaea* L.). Cultivation and culture, folklore and history, traditions and uses (M. El-Kholy, Ed.). International Society for Horticultural Science (ISHS), Scripta Horticulturae N. 13, pp. 13-23.

SECH. 1998. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Diccionario de Ciencias Hortícolas. Ed. Mundi-Prensa, 605 pp.

Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G.F., Morozzi. G. 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspect of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr*. 1054: 113-127.

Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R., Montedoro, G.F. 2009. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacol*. 17: 1-9.

Servili, M., Rizzello, C.G., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Mazzacane, F., Di Maio, I., Selvaggini, R., Gobbetti, M., Di Cagno, R. 2011. Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 147: 45-52.

Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Selvaggini, R., Taticchi, A., 2014. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants* 3: 1-23.

Shanklin, J., Somerville, C. 1991. Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2510-2514.

Snyder, C.L., Yurchenko, O.P., Siloto, R.M., Chen, X., Liu, Q., Mietkiewska, E., Weselake, R.J. 2009. Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. *New Biotechnol.* 26: 11-16.

Soler R.C., Espín, J.C., Wichers, H.J. 2000. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1013-1023.

Stiti, N., Triki, S., Hartmann, M.A. 2007. Formation of triterpenoids throughout *Olea europaea* L. fruit ontogeny. *Lipids* 42: 55-67.

Stiti, N., Triki, S., Hartmann, M.A. 2010. Sterols and non-steroidal triterpenoids of the developing olive fruit. En: Olives and olive oil in health and disease prevention (Preedy, V.R.; Watson, R.R., Eds.). Elsevier. Londres, Inglaterra.

Szakiel, A., Paczkowski, C., Pensec, F., Bertsch, C. 2012. Fruit cuticular waxes as a source of biologically active triterpenoids. *Phytochem. Rev*. 11: 263-284.

Taticchi, A., Esposto, S., Veneziani, G., Urbani, S., Selvaggini, R., Servili, M. 2013. The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chem.* 136: 975-983.

Thompson, G.A., Scherer, D.E., Foxall-Van Aken, S., Kenny, J.W., Young, H.L., Shintani, D.K., Kridl, J.C., Knauf, V.C. 1991. Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2578-2582.

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.* 38: 83-93.

Tognetti, R., d´Andria, A., Lavini, A., Morelli, G. 2006. The effect of deficit irrigation on crop yield and vegetative development of *Olea europaea* L. (cvs. Frantoio and Leccino). *Europ. J. Agronomy* 25: 356-364.

Torres, M.M. 2006. Caracterización química – organoléptica y molecular de variedades y aceites de oliva vírgenes de la provincia de Córdoba (Argentina). Tesis de Doctorado en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Torres, M.M., Maestri, D.M. 2006. Chemical composition of Arbequina virgin olive oil in relation to extraction and storage conditions. *J. Sci. Food Agric.* 86: 2311-2317.

Torres, M.M., Pierantozzi, P., Maestri, D., Orecchia, E., Santos, E. 2007. Catálogo de las variedades de olivo de la provincia de Córdoba. Ediciones INTA.

Torres, M.M, Pierantozzi, P., Cáceres, M. E., Labombarda, P., Fontanazza G., Maestri, D.M. 2009. Genetic and chemical assessment in Arbequina olive cultivar grown in Córdoba province (Argentina). *J. Sci. Food Agric*. 89: 523-530.

Torres, M.M., Martínez, M.L., Pierantozzi, P., Albanese, M.L., Nasjleti, A., Maestri, D.M. 2011. Contribution of compositional parameters to the oxidative stability of olive and walnut oil blends. *J. Am. Oil Chem Soc*. 88: 755-762.

Tous, J., Romero, A. 1994. Aceites Catalanes. Denominaciones de origen. En: Olivicultura. Fundación 'La Caixa' Agrolatino, S.L., Barcelona, España.

Tous, J., Romero, A., Plana, J., Guerrero, L., Díaz, I., Hermoso, J.R. 1997. Características químico-sensoriales de los aceites de oliva "Arbequina" obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites* 48: 415-424.

Tovar, M.J., Romero, M.P., Alegre, S., Girona, J., Motilva, M.J. 2003. Composition and organoleptic characteristic of oil from Arbequina olive (*Olea europaea* L.) trees under deficit irrigation*. J. Sci. Food Agric*. 82: 1755-1763.

Tura, D., Gigliotti, C., Pedo, S., Failla, O., Bassi, D., Serraiocco, A. 2007. Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea* L.) and correlations with oxidative stability. *Sci. Horticult*. 112: 108-119.

Uceda, M., Hermoso, M., Aguilera, M.P. 2008. La calidad del aceite de oliva. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp.699-727.

Vázquez-Roncero, A., Janer Del Valle, C., Janer Del Valle, M.L. 1973. Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 24: 350-357.

Vinha, A.F., Ferreres, F., Silva, B.M., Valentao, P., Gonçalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M.B., Seabra, R.M., Andrade, P.B. 2005. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.* 89: 561-568.

Visioli, F., Galli, C. 1998. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agric. Food Chem*. 46: 4992-4296.

Visioli, F., Poli, A., Galli, C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 22: 65-75.

Vissers, M.N., Zock, P.L., Katan, M.B. 2004. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: A review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58: 955-965.

Werteker, M., Lorenz, A., Johannes, H., Berghofer, E., Findlay, C.S. 2010. Environmental and varietal influences on the fatty acid composition of Rapeseed, Soybeans and Sunflowers. *J. Agro. Crop Sci.* 196: 20-27.

West, B.T., Welch, K.B., Gallechki, A.T. 2007. Linear mixed models. A practical guide using statistical software. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.

Youssef, N. B., Zarrouk, W., Carrasco, Pancorbo, A., Ouni, Y. 2009. Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chétoui virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.* 90: 199-204.

Zarrouk, W., Baccouri, B., Taamalli, W., Trigui, A. 2009. Oil fatty acid composition of eighteen Mediterranean olive varieties cultivated under the arid conditions of Boughrara (southern Tunisia). *Grasas y Aceites* 60: 498-506.

Ziogas, V., Tanou, G., Molassiotis, A., Diamantidis, G., Vasilakakis, M. 2010. Antioxidant and free radical-scavening activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chem*. 120: 1097-1103.