

Evaluación de parámetros relacionados con el cambio de fase juvenil-adulto en olivo

I. Moreno-Alías¹, R. de la Rosa¹, M. Mazarro-Ochoa¹, L. León¹ y H. F. Rapoport²

¹ Área de Mejora y Biotecnología de Cultivos. IFAPA Centro *Alameda del Obispo*, Junta de Andalucía. Apdo. 3092, 14080 Córdoba.

² Instituto de Agricultura Sostenible C.S.I.C. Apdo. 4084, 14080 Córdoba

Palabras clave: *Olea europaea*, juvenilidad, anatomía, morfología, espectroscopia, heteroblastia

Resumen

La prolongada duración del periodo juvenil, unida a la escasez de estudios para acortar esta fase, es la principal causa de que existan muy pocos programas destinados a la mejora varietal en olivo (*Olea europaea* L.). Un aspecto fundamental en el acortamiento de dicho periodo es una precoz determinación del cambio de fase de juvenil a adulto. Aunque se han descrito algunas diferencias morfológicas entre las hojas de zonas juveniles y adultas en esta especie, la aparición de la flor es, en la actualidad, el único indicador disponible para conocer que una planta ha alcanzado la fase adulta. En este trabajo se han evaluado una serie de criterios morfológicos, histológicos y espectroscópicos para poder distinguir, antes de la floración, entre hojas juveniles y adultas. Para ello se eligieron al azar veinte plantas de semilla en estado adulto y otras veinte plantas en estado juvenil. Se midieron diversos parámetros morfológicos y se realizaron cortes histológicos para observar la estructura interna de la hoja mediante análisis de imagen acoplado al microscopio. Para el análisis espectroscópico se recogieron los espectros en la región entre 400 y 2498 nm, en intervalos de 2nm, mediante un equipo monocromador NIRSystems 6500. Se han observado diferencias significativas entre los dos tipos de hoja para todos los parámetros medidos, tanto morfológicos como histológicos, salvo para el caso del peso específico y el grosor de la capa de parénquima esponjoso. Asimismo, el análisis de componentes principales (PCA) de los datos espectroscópicos permitió separar las muestras de acuerdo a su naturaleza juvenil o adulta. En base a estos resultados se podrían seleccionar criterios de selección precoz para corto periodo juvenil más rápidos y eficaces que la aparición de flores.

INTRODUCCIÓN

Tanto en plantas herbáceas como leñosas, salvo pocas excepciones (Borchert, 1976), existe una fase juvenil. Esta fase se caracteriza por la incapacidad de dichas plantas para producir flores, incluso bajo condiciones favorables, lo cual representa un gran inconveniente en la realización de un programa de mejora. En olivo (*Olea europaea*) la fase juvenil dura mucho más tiempo que en otras especies frutales (Humanes et al., 1967).

En muchas plantas leñosas existen diferencias entre las fases juvenil y adulta en diversos aspectos morfológicos. Cuando estas diferencias tienen lugar en las hojas, se trata de una expresión de desarrollo heteroblástico. En el olivo, se puede observar generalmente un cambio relativo del tamaño de las hojas en zonas juveniles y adultas, pero actualmente el único indicador de que disponemos para conocer que una planta ha alcanzado la fase adulta es la aparición de la flor, estructura de reproducción sexual. Esto ocurre una sola vez al año en primavera y es el resultado de un proceso que

comienza unos ocho meses antes, la iniciación floral. Sería de gran interés poder distinguir entre hojas juveniles y adultas en épocas anteriores a la floración, para definir con más precisión las zonas potencialmente reproductoras. El objetivo de este trabajo ha sido detectar posibles diferencias a nivel morfológico o histológico que dieran lugar a un marcador de cambio de fase en olivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se eligieron al azar veinte plantas de semilla en estado adulto, evidenciado por la presencia de flores, y otras veinte plantas de semilla en estado juvenil. Se tomaron veinte hojas completamente expandidas, de diez nudos por planta, de zonas distales de las flores en el caso de las adultas. En una hoja de cada nudo se realizaron medidas de tamaño y morfología, y la otra se utilizó para observaciones histológicas. Del mismo modo, se muestrearon 5 hojas por árbol, de las mismas plantas y zonas, para recoger los espectros. Se midieron diversos parámetros morfológicos y de tamaño (longitud, anchura, peso seco y peso fresco) y se calcularon otros a partir de estos (peso específico, expresado como peso seco por área).

Las hojas destinadas al estudio histológico se conservaron en fijador y posteriormente se deshidrataron con alcohol butílico terciario y se realizó su inclusión en parafina. Para poder observar la estructura interna de la hoja, se hicieron cortes histológicos transversales a 12 μm , perpendiculares al nervio central, y se tiñeron con azul de toluidina (0,05%) según Sakai (1973). Mediante análisis de imagen acoplado al microscopio se midió el grosor total de la hoja y de cada uno de los tejidos principales.

Para el análisis espectroscópico se recogieron los espectros en la región entre 400 y 2498 nm, en intervalos de 2nm, mediante un equipo monocromador NIRSystems 6500 (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, USA). Se utilizó el módulo Direct Contact que permite el análisis de hojas individuales. Mediante el análisis de componentes principales (PCA) se separaron los datos espectroscópicos de las muestras de acuerdo a su naturaleza juvenil o adulta y la regresión por mínimos cuadrados (PLS) para relacionar los datos espectrales con la información morfológica e histológica, utilizando en ambos casos el software Unscrambler (CAMO A/S, Trondheim, Norway).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se han observado diferencias significativas entre hojas juveniles y adultas de olivo para todos los parámetros morfológicos determinados salvo para el caso del peso específico, lo cual parece indicar un aspecto constante del crecimiento de las hojas del olivo. Las diferencias en tamaño quedan claramente reflejadas en las medidas de longitud, anchura, área y peso indicadas en la tabla 1. Estas diferencias concuerdan con la existencia de heteroblastia en esta especie, aunque hay que señalar que existe una gran variabilidad entre los genotipos.

Por otra parte, la forma y anatomía de hojas adultas y juveniles en olivo es bastante similar, al igual que se ha descrito para otras especies (*Pseudopanax crassifolius*, Gould, 1993). Sin embargo, una diferencia marcada ha sido la presencia de una capa particular dentro del parénquima esponjoso y próxima a la epidermis del envés de las hojas adultas (Fig. 1a). Las células de esta capa están organizadas de forma más compacta y presentan una orientación parecida a las células del parénquima en empalizada, por lo cual otros autores que lo han observado en hojas del olivo lo llaman “parénquima en empalizada II” (Chartzoulakis et al., 1999). En las hojas adultas se observó una variabilidad en su grado de formación o presencia según el corte histológico, pero en las hojas juveniles analizadas no se encontró dicha capa (Fig. 1b). Si se confirman estos datos en un número mayor de muestras y bajo distintas

condiciones de crecimiento, esta capa podría ser un indicador de cambio de fase de juvenil a adulto.

El análisis de componentes principales (PCA) de los datos espectroscópicos permitió separar las muestras de acuerdo a su naturaleza juvenil o adulta. La separación entre las muestras juveniles y adultas se obtuvo empleando tanto la región del visible (400-750 nm) como la región del infrarrojo cercano (750-2498 nm) (Fig. 3), lo cual indica que otros compuestos, además de los pigmentos foliares responsables de la absorción en el visible, deben ser responsables de las diferencias entre los estados juvenil y adulto. Asimismo, mediante regresión por mínimos cuadrados (PLS) se ha podido relacionar los datos espectrales con la información morfológica e histológica, obteniendo valores del coeficiente de correlación de 0,92-0,93 para características morfológicas como humedad y peso específico, 0,83-0,84 para caracteres histológicos como anchura total y anchura del parénquima en empalizada y valores más bajos para el resto de características. Estos resultados permitirían formular ecuaciones de calibración para la predicción de algunas de estas características en base a la información espectral.

El conjunto de diferencias observado en tamaño, morfología, anatomía y análisis espectroscópico de hojas juveniles y adultas es prometedor en la búsqueda de marcadores para identificar zonas reproductoras en olivo antes de la aparición de flores. Trabajos actuales se dirigen a confirmar estas diferencias.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos INIA RTA2006-00039-C02-01, CICYT AGL2003-08768-C02-01 y CICYT AGL2005-00930.

Referencias

- Borchert, R. 1976. The concept of juvenility in woody plants. *Acta Horticulturae* 56: 21-36.
- Chartzoulakis, K., A. Patakas, and A. Bosabalidis. 1999. Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 42:113-120.
- Gould, K.S. 1993. Leaf Heteroblasty in *Pseudopanax crassifolius*: Functional Significance of Leaf Morphology and Anatomy. *Annals of Botany*, 71: 61-70.
- Humanes, J., Ferreira-Llamas, J. & Bolaños-Borrero, P. 1967. Selección de nuevas variedades de olivo. *Port. Acta Biol./Serie A/X 1/2*, 185-194.
- Sakai, W.S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using Toluidine blue O. *Stain Technology* 48:247-249.
- Sylvester, A.W., V. Parker-Clark y G.A. Murray. 2001. Leaf shape and anatomy as indicators of phase change in the grasses: comparison of maize, rice, and bluegrass. *American Journal of Botany* 88: 2157-2167.

Tabla 1. Tamaño y morfología en hojas adultas y juveniles de plantas de semilla de olivo.

Estado	Longitud ¹ (cm)	Anchura (cm)	Área (cm ²)	Peso seco(g)	Peso específico (g/cm ²)
Adulto	3,81 a	1,00 a	3,04 a	0,061 a	0,020 a
Juvenil	1,89 b	0,67 b	0,76 b	0,019 b	0,019 a

¹Valores con la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes (Test de Duncan, $p < 0,05$)

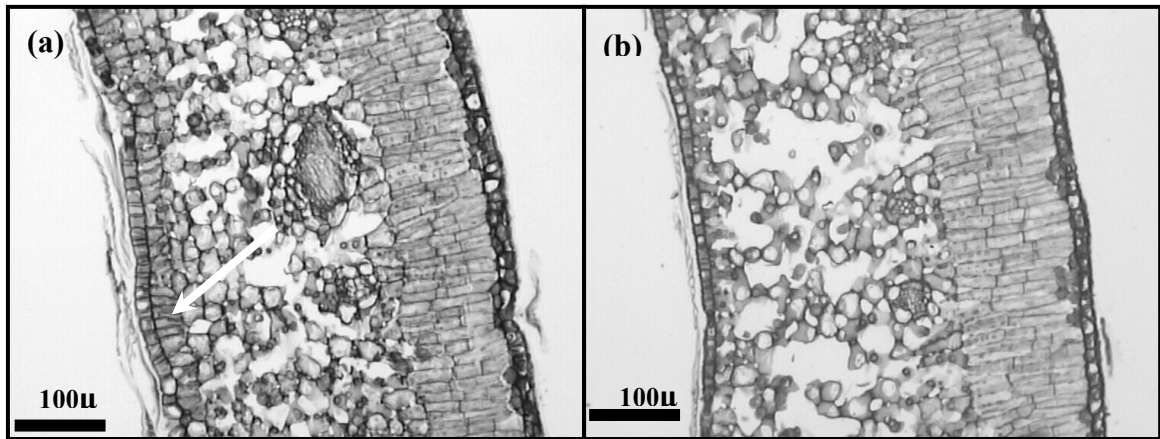


Fig. 1. Cortes histológicos transversales de hojas adultas (a) y juveniles (b) de olivo. La parte izquierda de cada imagen corresponde al envés de la hoja. En el envés de la hoja adulta, próxima a la epidermis, se puede observar la capa particular de parénquima más compacta, de células alargadas y uniformes, dentro del parénquima esponjoso (flecha).

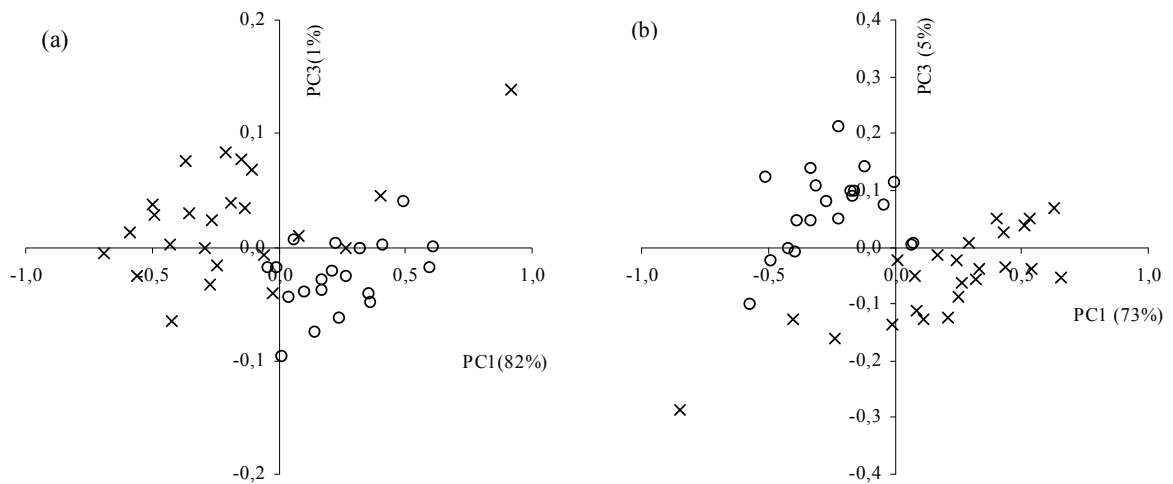


Fig. 2.- Discriminación entre hojas juveniles (o) y adultas (x) en base al análisis de componentes principales de los datos espectrales correspondientes a la región del visible (a, 400-750 nm) y del infrarrojo cercano (b, 750-2498 nm).