

66200

T.565

QUIROGA, A.M.
Estudios con Fitohor

Tesis Doctoral

2009

66200

“Estudios con fitohormonas sobre la producción de vid para vinos tintos de alta calidad. Efectos sobre el crecimiento, síntesis de azúcares y componentes de la baya”

ANDREA MARIELA QUIROGA

Muriel Quiroga
Director: Dr. Rubén Bottini

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales
UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

2009



1 0270

Dedicada a mis padres y hermana...
porque son mis palenques y le dan sentido a mi vida

60200

MFN:
Clasif: T.565

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la posibilidad y la fortaleza necesaria para llegar hasta aquí y a todas las personas e instituciones que, de alguna manera, han contribuido en la realización de este trabajo.

A CONICET por el apoyo financiero recibido por medio de la beca durante el desarrollo de esta Tesis.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNCuyo y a la UNRC por el apoyo académico e institucional recibido para la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Rubén Bottini, por permitirme realizar la tesis doctoral bajo su dirección, por su predisposición al ofrecerme todos los elementos necesarios para concluir el trabajo y su orientación científica.

A la Dra. María Fernanda Silva, por su amistad, orientación, apoyo y por brindarme palabras de aliento, siempre. Por su gran generosidad que me permitió aprender de ella y sobre todo por su calidad profesional y fundamentalmente humana.

Al M.Sci. Bruno Cavagnaro, por interesarse constantemente en la evolución de mi trabajo y por su colaboración y sus críticas en el desarrollo de esta tesis.

A los miembros de mi Comisión Asesora, Dra. Teresa Kraus, Dr. Rodolfo Sanchez y M.Sc. Bruno Cavagnaro, por el tiempo dedicado y sus valiosas correcciones.

A Carina y Juan Pablo, mis compañeros de oficina y amigos, porque fue muy grato compartir con ellos el ámbito de trabajo, por su apoyo y porque me brindaron el mejor año repleto de risas y buenos momentos.

A mis niños (como yo les digo): Rocío, Sebastián y Martín, quienes durante todos estos años colaboraron en la realización de distintas tareas a campo y en laboratorio, gracias porque además de permitirme trabajar con Uds. Me brindaron su amistad y cariño.

A Hilda mi incondicional amiga y mentora, porque siempre confiaste y me valoraste como persona y profesional, por tu aliento constante y porque fuiste quien con tu generosidad me dio la posibilidad de conocer e iniciarme en lo que

después sería mi vocación. Gracias por inculcarme valores y formarme como lo hiciste.

A todos mis amigos, incluidos los que están lejos, por su invaluable apoyo, y porque siempre estuvieron ahí para escucharme, darme una palabra de aliento y el impulso necesario para seguir adelante.

Por último, y por sobre todas las cosas, quiero agradecer a mi familia, porque supieron inculcarme la perseverancia, la honestidad y el don de "buena gente", especialmente a mis padres, por los esfuerzos y sacrificios hechos con cariño para que yo alcanzara mis sueños. A mi hermana Lorena, por su apoyo incondicional, amistad, compañía y por brindarme la fortaleza para salir adelante. Gracias mamá, papá y Lore por no dejarme caer nunca, levantarme cuando lo hacía y siempre brindarme la fuerza y el amor que me permitieron llegar hasta aquí y terminar esta etapa que aquí concluye.

Esta Tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Abscisic Acid Sprays Significantly Increase Yield per Plant in Vineyard-Grown Wine Grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon Through Increased Berry Set with No Negative Effects on Anthocyanin Content and Total Polyphenol Index of Both Juice and Wine.

Quiroga, A. M., Berli, F.J., Moreno, D., Cavagnaro, J. B., Bottini, R.
Journal of Plant Growth Regulation. 2009. 28, 28-35.

- Phenolic Enhancement in Grape Skin and Wine Submitted to Exogenous Hormonal Supply and Water Stress Monitored by Gas Chromatography/Mass Spectrometry after Ultrasonic Assisted Extraction.

Quiroga, A. M., Deis, L., Cavagnaro, J. B., Bottini, A. R., Silva, M.F.
Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009. En revision.

RESUMEN

Como la provincia de Mendoza es la principal productora de vides destinadas a la elaboración de vinos, se planteó investigar la fisiología del cultivo para evaluar los efectos de ABA sobre variables fisiológicas y de producción cuali-cuantitativa en condiciones de campo, e incrementar la producción de vid para vino tinto mediante aplicación de la hormona. La hipótesis fue que incrementando los niveles de ABA (por aplicación exógena) en hojas de vid durante el período de rápido crecimiento vegetativo, promueve cierre de estomas, evita pérdidas excesivas de agua, impide picos de estrés hídrico temporario, lográndose de este modo un incremento de la fotosíntesis. Asimismo, de que en vid aplicaciones de ABA tienen efectos sobre la síntesis de antocianos, se corroboró si estos efectos se manifiestan además en las condiciones evaluadas, fundamentalmente considerando que los eventuales incrementos en rendimientos podrían ser perjudiciales en la calidad de las bayas con destino a vinificación.

Para poner a prueba las hipótesis, se realizó un ensayo a campo durante cuatro temporadas en un viñedo de Cabernet Sauvignon. En los primeros tres años de estudio se establecieron tratamientos control vs. ABA en distintas concentraciones y momentos de aplicación. En función a los resultados parciales obtenidos se planteó probar una hipótesis alternativa durante la última temporada, con el objeto de evaluar el posible efecto de ABA sobre la acción/síntesis de etileno en vid. Para ello se establecieron tratamientos con ABA y 1-MCP (un inhibidor de la síntesis de etileno), en distintas concentraciones y durante diferentes momentos de aplicación.

En las plantas tratadas con ABA el rendimiento de uva se incrementó durante tres temporadas consecutivas (2004/2005, 2005/2006 y 2006/2007). Para todos los parámetros evaluados, el número de bayas por racimo fue el componente que determinó los incrementos en rendimiento entre el 48% y 103% de las plantas tratadas con ABA. Las bayas de estas plantas fueron del mismo tamaño y acumularon los mismos (o en algunos casos mayores) niveles de azúcares, antocianinas y polifenoles totales que el control. En los vinos elaborados con las bayas cosechadas, no se encontraron diferencias en el contenido de antocianinas ni en los índices de polifenoles totales. En conclusión, tres temporadas de experimentos demuestran que ABA incrementa rendimientos en vides cv. Cabernet Sauvignon, cultivadas a campo al favorecer el mantenimiento de bayas sin afectar la calidad para vinificación. Para la temporada 2007/2008 del cultivo ABA aplicado en 250 ppm hasta cosecha y 1-MCP aplicado durante 6 semanas, aumentaron significativamente el rendimiento de uva por planta, con aumentos significativos del número de bayas por racimo. Adicionalmente, el tratamiento con ABA mostró valores de antocianos y de polifenoles totales significativamente mayores que los otros tratamientos en todas las etapas de maduración. Los resultados sugieren que el mayor establecimiento de bayas por ABA opera, al menos parcialmente, inhibiendo acción y/o síntesis de etileno, siendo la estimulación de antocianos y polifenoles independiente de esta vía.

ABSTRACT

Keeping in mind that Mendoza is the primary province with cultivated vines in Argentina for the purpose to winemaking, a research was complete with the aim to contribute to the knowledge related to the increase of yields with exogenous ABA applications as well as the evaluation of the effects of this hormone on physiological variables, yield and grape quality on field conditions. The main hypothesis of the present project is that an increase in ABA levels (exogenous applications) on *Vitis* leaves during the period of rapid vegetative growth produces stomata closure, avoids loss of water, eludes temporary water stress peaks, and those producing an enhancement of photosynthesis. It has already been demonstrated that exogenous ABA applications in grape had effects on anthocyanin synthesis, but it was necessary to confirm if such effects are shown under the experimental conditions propose for the present study; basically considering that the improvement of yield could consequently diminish grape quality for winemaking.

To corroborate the hypothesis, an in-field assay was carried out during four seasons on a vineyard of Cabernet Sauvignon with water supply. The first three seasons the treatments were control vs. ABA plants on different concentrations and application times. The results obtained allowed the establishment of an alternative hypothesis for the last season with the purpose to evaluate the possible effect of ABA on action/synthesis of ethylene. So, treatments with ABA and 1-MCP (an inhibitor of ethylene action) were performed.

For ABA plants an enhancement of yield was observed during the three consecutive seasons (2004/2005, 2005/2006 y 2006/2007). For all the evaluate parameters, the number of berries was the factor that determinate such increments, that rounded between 48% and 103%. Berries of ABA plants was the same size and accumulate equal (or even mayor) levels of sugar, anthocyanin and polyphenols than control plants. In wines no differences were found on anthocyanin contents or polyphenols index. In summary, three seasons of experiments shown that ABA produces enhancements of yield on vines, favoring berry maintenance without affecting quality. For the season 2007/2008, ABA 250 ppm until harvest and 6 times of 1-MCP treatments improves yields per plant with an enhancement of the number of berries per bunch. Additionally, ABA treatments showed the highest anthocyanin and polyphenol contents during all maturing berries stages. The results suggest that the mayor maintenance of berries is due at least to an inhibitory effect of ABA on action/synthesis of ethylene; furthermore the stimulation on anthocyanin and polyphenols levels is independent of this pathway.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACO	ACC oxidasa
ACS	ACC sintasa
AF	Área foliar
AOS	Active Oxigen Species
ATP	Adenosil trifosfato
BM	Baño maría
BR	Brasinosteroides
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CE	Capillary Electrophoresis
CO ₂	Dióxido de carbono
CRA	Contenido relativo de agua
CU	Cobre
cv.	Cultivar
DO	Densidad óptica
EtAC	Acetato de etilo
g	gramos
GAs	Giberelinas
GC	Cromatografía gaseosa
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
gs	Conductancia estomática
HI	Hectolitro
His	Histidina
HPLC	Hight Performance Liquid Cromatography
IPT	Índice de Polifenoles Totales
kg	Kilogramos
KOH	Hidróxido de potasio

LEA	Late embryogenesis-abundant
lts	Litros
m	Metro
mL	Mililitro
Mpa	Megapascales
1-MCP	1-metilciclopropeno
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
Na (MeBS)	Metabisulfito de sodio
nm	Nanómetros
Nº	Número
PAL	Fenilalanina-amonioliasa
PF	Peso fresco
R ²	Coeficientes de correlación
RDI	Déficit regulado de riego
RNA _m	Ácido Rivonucleico mensajero
s	Segundos
S-(+)-ABA	S-cis-Ácido abscísico
S-AdoMet	S-adenosilmetionina
SAM	S-adenosilmetionina
SO ₂	Anhídrido sulfuroso
SPE	Extracción de fase sólida
TF	Tasa fotosintética
µl	Microlitros
UV	Ultravioleta
UV-B	Ultravioleta B
UV-Vis	Ultravioleta visible
Zn	Zinc
Ψ _w	Potencial agua
°C	Grados Celsius
%	Porcentaje

INDICE**✓ CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL**

Importancia del cultivo de vid	01
Características generales de la planta	02
Fenología y Ciclo del crecimiento	03
Exigencias de clima y suelo	04
Importancia del período de maduración del fruto	04
Efectos de estrés en la vid	05
Importancia de los compuestos fenólicos en la vid	08
Fitohormonas	15
Ácido abscísico	15
Biosíntesis de ABA	16
Inhibidores de la biosíntesis de ABA	18
Efectos fisiológicos del ABA	20
Cuaje, Etileno y Vid	22
- Hipótesis	25
- Objetivo general y específicos	27

✓ CAPÍTULO II. EFFECTOS DE ÁCIDO ABSCÍSICO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon.

- Introducción	29
- Materiales y Métodos	32
Condiciones generales	32
Diseño experimental	34
Tratamientos	34
Mediciones realizadas a campo	36
Mediciones realizadas en laboratorio	39
Determinaciones a cosecha	40
Microvinificaciones	41
Análisis estadístico	42
- Resultados y Discusión	43

✓ **CAPÍTULO III. MECANISMOS DE ACCIÓN DE ÁCIDO
ABSCISÍCO Y 1-METILCICLOPROPENO EN VIDES
CULTIVADAS EN CONDICIONES DE CAMPO**

- Introducción	58
El crecimiento del fruto de vid y su regulación	58
Biosíntesis y función de etileno	60
Bioquímica y síntesis de etileno	60
Factores que afectan la biosíntesis de etileno	63
Modo de acción	63
Efectos fisiológicos	63
Uso de 1-Metilciclopropeno como inhibidor específico de etileno	64

Etileno en vid	65
- Materiales y Métodos	67
Condiciones generales	67
Diseño experimental	68
Tratamientos	68
Mediciones realizadas en campo y laboratorio	71
Determinaciones a cosecha	72
Análisis estadístico	72
- Resultados y Discusión	73
✓ CAPÍTULO IV. <u>DETERMINACIÓN DEL FERFIL POLIFENÓLICO EN PLANTAS TRATADAS CON ABA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS</u>	
- Introducción	80
- Materiales y Métodos	85
Extracción de muestras	85
Procedimiento para la extracción asistida con ultrasonido	85
Preparación de muestras para inyección en GC-MS	87
Productos químicos y reactivos	88
- Resultados y Discusión	89
✓ CAPÍTULO V. <u>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</u>	
Discusión general y conclusiones	96

✓ <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	101
-----------------------	-----

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia del cultivo de vid

La vid es considerada el cultivo frutícola de mayor importancia económica mundial con una producción total en el año 2000 de 60 millones de toneladas que crecen en alrededor de 7.5 millones de hectáreas en al menos 90 países con el objeto de producir vino y jugo, o para consumo de uva en fresco o seco (Keller, 2003). En las últimas tres décadas la actividad vitivinícola ha estado en continua expansión, tanto en cantidad como en calidad del producto elaborado. En las provincias de Mendoza y San Juan, donde se localiza más del 80% de la superficie cultivada con vid en la Argentina, la industria vitivinícola es una de las fuentes de ingresos más importantes, hecho aún más relevante en cuanto al impacto social por la mano de obra ocupada. En los últimos años la demanda de vinos finos ha crecido marcadamente, tanto en los mercados nacional como internacional, a diferencia de los vinos "común de mesa" cuyo consumo ha disminuido en forma notable.

Hasta 1973 la vitivinicultura argentina creció en paralelo con el aumento poblacional, cuando el consumo alcanzó los 90 litros año⁻¹ per capita. En 1978 la actividad incluía unos 50.000 productores y 60.000 viñedos. A partir de ese año se produjo un cambio en el patrón de consumo que fue disminuyendo hasta hoy. El cambio de tendencia tuvo profundas implicancias sobre el sector, ya que a partir de 1978 comenzaron a erradicarse viñedos y ya nunca la evolución del sector fue función del crecimiento poblacional. Esta crisis produjo la pérdida de una gran cantidad de productores (entre 1978 y 2000 se perdieron 30.000 productores de vid) con el consecuente impacto económico y social. En esta etapa la actividad vitivinícola ha realizado una profunda transformación tecnológica recibiendo inversiones del orden de 2.000 millones de u\$s. Su actividad se orientó hacia la producción de vinos de calidad, con demanda internacional creciente en países del Hemisferio Norte que encontraron en el vino un reflejo de su estilo de vida. Coadyuvó a este proceso la Paradoja Francesa que puso de manifiesto los efectos beneficiosos del vino

sobre la salud humana. La producción se orientó a vinos varietales de alta calidad para proveer a mercados externos y al mercado nacional, con un modelo tecnológico traído desde el exterior. En este esquema, se introdujeron el manejo de canopia y el de restricciones de riego con el objetivo de aumentar la calidad, pero debido a una mala adaptación a las condiciones locales, se produjeron resultados dispares.

Los especialistas señalan que la excelencia del vino depende del cultivar, la calidad del fruto y de las técnicas de elaboración. A su vez la calidad del fruto es función de la ecología del sitio y del manejo del viñedo, donde juegan un rol preponderante tanto factores bióticos como abióticos.

Características generales de la planta

La vid (*Vitis vinifera*) es una planta perteneciente a la familia de las Ampelídeas descrita como «una familia de arbustos sarmentosos y trepadores, con hojas estipuladas, opuestas inferiormente y alternas en la parte superior. Las flores son pequeñas y verdosas. Cáliz entero o apenas dentado, corola de cuatro a cinco pétalos, insertos en la cara exterior de un disco que ciñe el ovario, más anchos en la base, encorvados y en general soldados por el ápice; el número de estambres igual al de las piezas de la corola; el pistilo presenta el ovario libre, el estilo cortísimo o nulo y el estigma sencillo. Las flores y los frutos ordenados en forma de racimo (compuesto). El fruto consiste en una baya globosa, de dos celdas cuando es joven y simplemente unilocular cuando maduro, con una, dos, tres a cuatro semillas». En las vides, así como en el resto de las especies leñosas, se puede distinguir una parte enterrada, formada por el sistema radicular, con raíces de mayor o menor grosor y también de mayor o menor edad, cuyas extremidades, más finas y jóvenes, constituyen la cabellera radicular. En la parte aérea, se pueden distinguir los siguientes órganos: tronco, brazos y sarmientos que duran varios años, formando en conjunto la parte de madera vieja de las cepas, y los pámpanos, hojas, frutos y zarcillos, cuya duración no excede del año, y que de manera conjunta constituyen la vegetación joven anual de las vides. La zona de la cepa

que une estas dos partes, la subterránea y la aérea, se llama cuello (Hidalgo Togores, 2006).

En particular *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon es originaria de la región bordelesa, resultado de un posible cruce entre Cabernet Franc y Sauvignon Blanc. Se trata de una de las variedades de vinificación más conocida y extendida en el mundo, con racimos pequeños y apretados de bayas esféricas con hollejos de gran espesor, que produce potentes vinos con aromas a frambuesa, cassis y pimienta verde.

Fenología y Ciclo del crecimiento

La fenología es el estudio de los eventos o fases de crecimiento de las plantas que ocurren periódicamente, y sus relaciones con diversos factores climáticos que tienen en cuenta la temperatura, radiación solar y heliofanía. En la producción vitícola, las consideraciones fenológicas son muy importantes para seleccionar cultivares que maduraran sus frutos en un cierto marco de tiempo en el ambiente de la localización propuesta para el viñedo. En climas tropicales, donde no hay o son pequeños los cambios en la duración del día durante el año, las vides se comportan como plantas con continuo crecimiento (y una fuerte dominancia apical), y una continua producción de frutos, a lo largo del año. Con apropiadas estrategias de poda, severas defoliaciones o raleos manuales, en combinación con estrés hídrico y el asperjado de químicos que induzcan dormancia, seguido de aplicaciones de reguladores que induzcan una uniforme brotación, frecuentemente se pueden obtener dos cosechas por año en los trópicos. Sin embargo, en climas templados, las vides tienen un ciclo discontinuo con períodos alternados de crecimiento y dormancia. Bajo estas condiciones, el tiempo de activo crecimiento generalmente ocurre desde Abril a Octubre/Noviembre (Hemisferio Norte) o desde Septiembre/Octubre a Abril/Mayo (Hemisferio Sur). El ciclo anual de crecimiento y madurez, es normalmente dividido en vegetativo y reproductivo donde distintos estados de desarrollo o eventos claves se han identificado y entre ellos se incluyen dormancia, brotación, floración, cuaje, envero, cosecha y abscisión de hojas (Keller, 2003).

Exigencias de clima y suelo

En la mayor parte de los países vitícolas, numerosos ejemplos demuestran que los viñedos típicos no corresponden a una zona abstracta, sino a un resultado de experiencias seculares de adaptación a un medio natural determinado (Branas, 1974).

En particular *Vitis vinifera* L. es una especie de clima templado que no resiste inviernos extremadamente fríos y que requiere veranos templado-cálidos para la maduración de los frutos. El área mundial del cultivo de la vid comprende aproximadamente entre los 20° y 50 °N y los 20 ° y 40 °S. En cuanto a las condiciones de suelo que favorecen el desarrollo de una óptima vitivinicultura aquellos suelos franco o franco-arcillosos con bastante material grueso (grava y canto rodado), con muy buena permeabilidad y sin problemas de salinidad, se consideran los mas aptos para el cultivo (Keller, 2003).

Importancia del período de maduración del fruto

La dinámica del crecimiento y composición de la baya puede ser considerada como la clave que determina la calidad de la cosecha (Champagnol, 1998). Cuando se describe el mecanismo de maduración de las bayas se pueden establecer tres etapas arbitrarias: I, la fase inicial de rápido crecimiento; II, la fase de ralentización del crecimiento del pericarpio y la maduración de las semillas; y III, la fase final de reanudación del crecimiento y maduración. La instalación de esta última etapa esta marcada por el ablandamiento de la baya y por el cambio de color en los cultivares coloreados. El momento en el que comienzan a aparecer los pigmentos antociánicos en la baya se conoce como envero (Mullins et al., 1992). La duración de esta fase es de uno o dos días para un grano de uva, mientras que en un viñedo puede suceder a lo largo de 12 a 15 días. El crecimiento del grano de uva se detiene, apareciendo los pigmentos propios de cada variedad de uva, perdiendo la clorofila que hasta entonces contenía y gracias al aumento de la enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL) que provoca la acumulación de polifenoles en determinados lugares de las bayas. El escobajo en este período alcanza el tamaño definitivo, mientras que los órganos de uva se tornan de aspecto

traslúcido, de consistencia más blanda y elástica, recubriéndose exteriormente de pruina y alcanzando las semillas la «maduración fisiológica», pudiendo formarse, en el caso de germinar, nuevos individuos de vid (Hidalgo Togores, 2006).

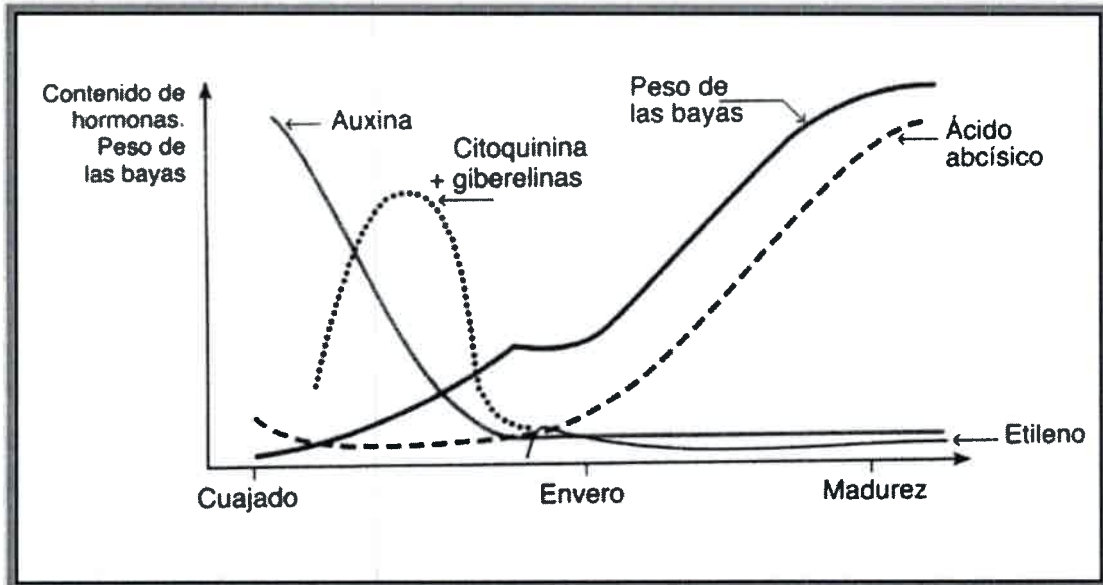


Figura 1. Evolución del peso y diversos componentes de la baya. Gráfico extraído del Capítulo III, Etapas del desarrollo del racimo del libro: La calidad del vino desde el viñedo (Hidalgo Togores, 2006).

Efectos de estrés en la vid

Se define estrés como un factor externo que ejerce una influencia negativa para el vegetal medido en relación a su supervivencia, rendimiento y producción de biomasa (Taiz y Zeiger, 1998). Entre los factores abióticos el estrés hídrico es uno de los aspectos limitantes del crecimiento más importantes en muchas áreas cultivadas (Hsiao, 1973). No obstante, se ha propuesto que en vid un nivel moderado de restricción hídrica es beneficioso para aumentar la calidad organoléptica del vino (Vallone et al., 2004). Efectivamente, varios autores (Hardie y Considine, 1976; Freeman, 1983; Bravdo et al., 1985; Matthews y Anderson, 1988 citados por Vallone 1998) han demostrado que un estrés hídrico moderado aumenta el contenido de compuestos fenólicos, aunque se ha sugerido que dicho estrés por sí mismo también influencia el metabolismo de estos compuestos (Ojeda et al., 2002). De modo que el uso de períodos de restricción hídrica es una herramienta

utilizada para obtener uvas de alta calidad vinícola, especialmente para vino tinto (Dry et al., 2000a y 2000b), ya que aumenta el contenido de polifenoles y antocianos. Estos compuestos tienen tanto valor organoléptico, ya que son constituyentes y/o precursores de sustancias que determinan el "flavor" de la uva y el vino (Marais et al., 1991), como en salud humana debido a su capacidad antioxidante, ya que se ha relacionado una menor incidencia de enfermedades coronarias con un consumo moderado de vino tinto (Burns et al., 2000). Sin embargo, a pesar de que en la región cuyana la vid se cultiva bajo riego, debido a condiciones de alta heliofanía y extrema sequedad ambiental las plantas están sometidas a diario a este factor adverso que limita el crecimiento y la producción (Schultz y Matthews, 1988; Williams y Matthews, 1990), lo que hace que la aplicación de la técnica resulte perjudicial tanto sobre la producción como en la supervivencia de las plantas.

Una de las respuestas de las plantas ante el estrés hídrico es el aumento de los niveles de ácido abscísico (ABA). El ABA constituye la señal hormonal que lleva el mensaje de estrés hídrico censado en la raíz y provoca el cierre estomático de las hojas, aún cuando dichas hojas no hayan variado su Ψ_{agua} (Davies y Zhang, 1991; Leung y Giraudat, 1998), incluso en vid (Dry et al., 2000 c). Además, al producir cierre parcial de estomas, especialmente en horas de mayor pérdida de agua por transpiración, disminuye la situación de estrés hídrico temporaria generada a nivel de hoja. Estos procesos son acompañados por cambios en la expresión génica, muchos de los cuales son regulados por ABA (Bray, 1988; Ingram y Bartels, 1996). La aplicación de ABA causa cierre de estomas (Zhang y Outlaw jr., 2001 b) aportando a la economía del agua y aún incrementando producción en biomasa (Sansberro et al., 2004). Las fitohormonas como ABA han sido propuestas como herramientas potenciales para incrementar producción debido a sus profundos efectos reguladores sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Davies, 2005a) y, al ser producidas por la misma planta su utilización aceptable para incrementar la producción orgánica.

En las vid la restricción en el riego es una práctica viable para controlar el vigor de la planta, reducir el ataque de enfermedades y modificar la

composición química de la uva (Bravdo et al., 1985; Matthews y Anderson, 1988; Nadal y Arola, 1995). El riego excesivo produce plantas con grandes superficies foliares que sombrean racimos, reducen el color y crean condiciones micro-climáticas favorables para las enfermedades (Price et al., 1995; Smart et al., 1988; Spayd et al., 2002). En cambio, déficits excesivos producen canopias pequeñas con insuficiente producción de carbohidratos para madurar la uva (Kaps y Cahoon, 1992; Koblet et al., 1994) y para reponer las reservas (Candolfi-Vasconcelos y Koblet, 1990; Petrie et al., 2000). A nivel local se logró aumentar la calidad de las uvas para vinos de alta gama mediante déficit regulado de riego (RDI, Vallone, 1998; Pérez Peña, 2000). Sin embargo, en algunos casos se observó que la aplicación reiterada del RDI sin considerar las reservas de las plantas condujo a un deterioro general de los cultivos. Efectivamente, la combinación de altas cargas con déficit hídricos y/o nutricionales pueden resultar en una insuficiente reposición de reservas en estructuras permanentes (Perez Peña, 2004; Kaps y Cahoon, 1992; Koblet et al., 1994; Candolfi-Vasconcelos y Koblet, 1990; Petrie et al., 2000).

En experiencias con yerba mate se logró incrementar la producción en biomasa mediante aplicaciones de ABA que, al provocar cierre parcial de estomas, en forma secuencial disminuyó la cantidad de agua transpirada, mantuvo una mejor condición hídrica, ésta se tradujo en mayor turgencia, que a su vez aumentó el crecimiento en volumen, que por su parte actuó como "sumidero" de materia seca (Sansberro et al., 2004). Asimismo, en trigo se evaluó el efecto de aplicaciones de ABA en etapa vegetativa tardía sobre parámetros fisiológicos y de producción del cultivo en secano (Travaglia et al., 2007). La aplicación exógena de ABA moderó el efecto del estrés hídrico y, aunque no existieron diferencias en el CRA, hubo una mayor persistencia de pigmentos colectores de luz en hoja bandera en correlación con una superior acumulación de materia seca en tallo primero, y después en grano a cosecha, con un incremento del rendimiento superior al 35%. Este incremento se debió a aumentos tanto en el peso del grano como en el número de granos por espiga. Estos hechos son indicativos de una mayor actividad fotosintética y aumentos en la tasa de transporte y partición de fotoasimilados hacia grano promovidas

por la aplicación de la hormona, aún cuando no se notara una mejoría de la condición hídrica de los tejidos. Para el caso específico de vid, en resultados preliminares de experimentos a campo se ha demostrado por primera vez que el ABA juega un rol importante en la síntesis de polifenoles. Plantas de vid asperjadas con ABA, tanto en condiciones de riego como con tratamiento de sequía, aumentaron significativamente el contenido de antocianos, índice de polifenoles totales e intensidad colorante en vinos elaborados con esas uvas (Deis et al., 2004). Sin embargo, estos aumentos aunque también se notaron a nivel de bayas no alcanzaron significación estadística, quizás por la variabilidad debida al pleiotropismo originado en los múltiples factores involucrados en tales experimentos a campo. Lo anterior se correlaciona positivamente con otros resultados (Vallone et al., 2004) en que se ha propuesto que un nivel moderado de restricción hídrica es beneficioso para aumentar la calidad organoléptica de vinos tintos de alta gama al aumentar el contenido de compuestos fenólicos (Vallone, 1998). Esto se explicaría en parte ya que bayas más pequeñas acentúan el contenido de fenoles y antocianinas ubicadas en las capas epidérmicas de la baya; es decir, al tener una mayor relación superficie/volumen se incrementa el contenido relativo de esos compuestos. Sin embargo, no puede descartarse que el factor estrés hídrico por sí mismo también tenga influencia sobre el metabolismo de estos compuestos (Ojeda et al., 2002).

Importancia de los compuestos fenólicos en la vid

Síntesis y evolución de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos aparecen bruscamente en la fase de envero, sustituyendo a la clorofila que hasta entonces hacía que el grano de uva se comportase como un órgano verde más de la vid, para convertirse en otro fruto de acumulación de diversas sustancias. Según P. Riberau-Gayon (1982), la síntesis de los compuestos fenólicos es una consecuencia colateral de la formación y acumulación de azúcares en el grano de uva. A partir de las hexosas, y por el ciclo de las pentosas-fosfato, se forma eritrosa-4-fosfato como compuesto intermedio, del cual por la vía del ácido shiquímico se forman

los ácidos benzoicos y aminados, terminando en la formación de otros polifenoles (flaonas, antocianos, flavonoles, taninos, etc.). Por otra parte en la glicólisis, a partir de tres moléculas de ácido pirúvico, se puede formar una molécula de ciclo benzénico, dando lugar posteriormente a los mismos compuestos anteriormente citados. En estas reacciones existe una enzima llamada *fenilalanina-amonoliasa (PAL)*, que eliminando amonio de la fenilalanina y tirosina, forma los primeros compuestos fenólicos. Estando esta enzima exclusivamente localizada en las células del hollejo y de algunos tejidos de las pepitas, lo que explica la acumulación de los polifenoles en estas partes del grano de uva. En el período herbáceo, la concentración de la enzima PAL es máxima en las pepitas, decreciendo durante la maduración, mientras que en el hollejo aparece bruscamente en el momento del envero, existiendo una estrecha relación entre la actividad de esta enzima y la síntesis de los compuestos fenólicos. Otra enzima, la calcona-sintetasa, específica de la otra vía de síntesis de los flavonoides, alcanza su máxima concentración en el envero, para luego disminuir con rapidez (Hidalgo Togores, 2006).

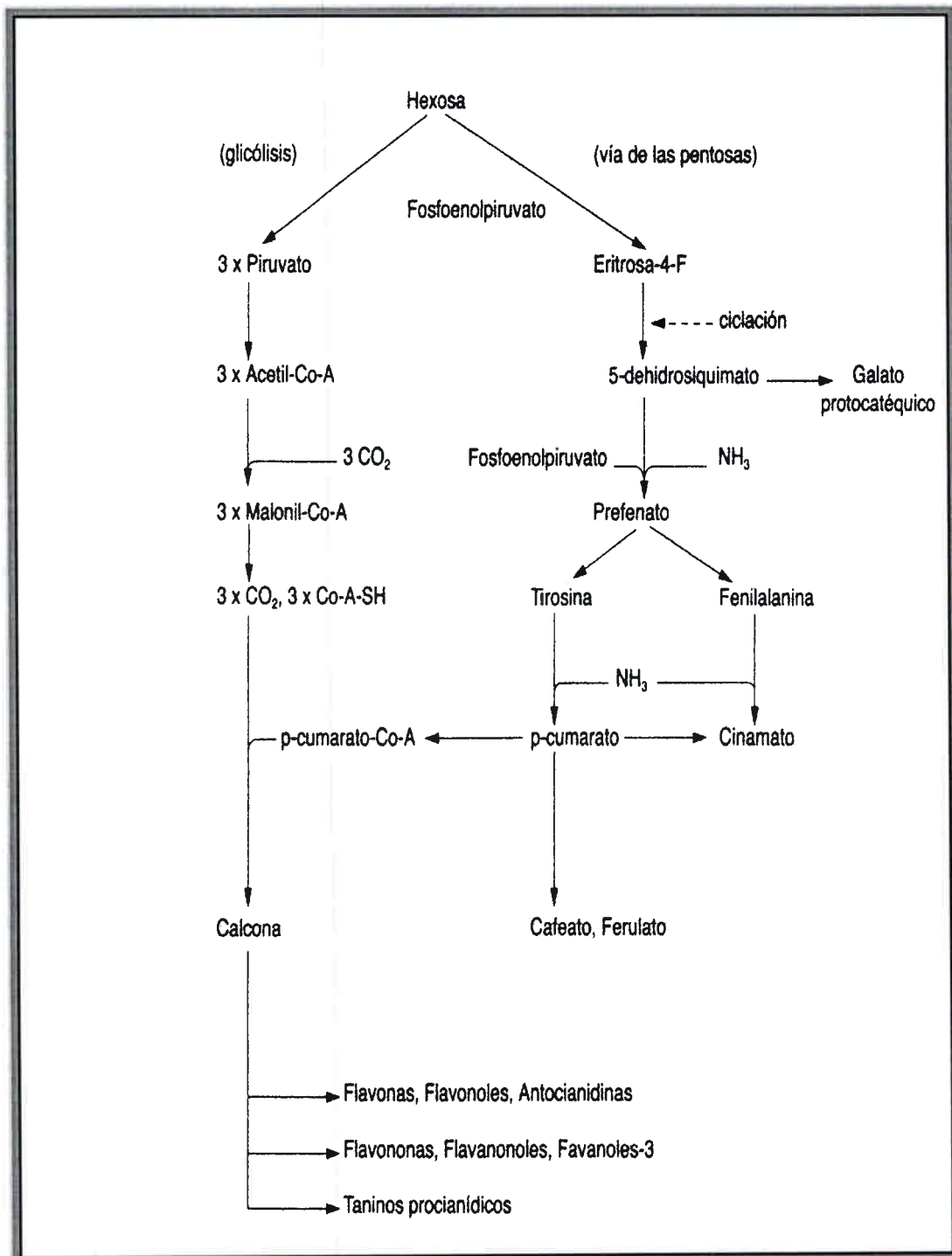


Figura 2. Esquema detallado de la biosíntesis de los polifenoles. Extraído de La calidad del vino desde el viñedo (Hidalgo Togados, 2006).

La consecuencia de estos mecanismos de síntesis es que los compuestos fenólicos evolucionan de la siguiente forma: los antocianos aparecen en el envero y se acumulan durante la maduración, alcanzando generalmente su valor más alto cuando la relación azúcares/acidez en el mosto es máxima. Los taninos de los hollejos también se incrementan durante éste período, aunque su acumulación es más lenta, y su máximo se alcanza algunos días después de que los antocianos, por lo que la “maduración” de ambos compuestos no siempre coincide. Los taninos contenidos en las pepitas sufren un progresivo descenso desde el envero hasta la maduración, donde parece ser que son los precursores de los taninos acumulados en el hollejo.

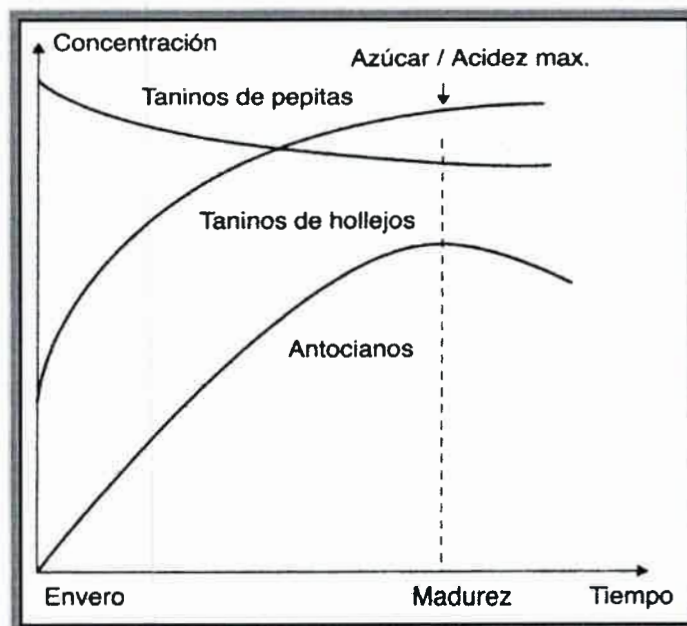


Figura 3. Gráfico de la evolución de antocianos y taninos en hollejos y pepitas durante la maduración (Glories y P. Ribéreau-Gayon, extraído de Hidalgo Togados 2006).

La evolución de los compuestos fenólicos está ligada a la síntesis y acumulación de los azúcares en el grano de uva, especialmente los procedentes de la función clorofílica realizada fundamentalmente por el sistema foliar del viñedo. Los taninos de las pepitas son pro-antocianidinas de bajo

grado de polimerización, aunque éste se incrementa algo desde el envero hasta la maduración, presentando por lo tanto sensaciones sensoriales de notable acidez y astringencia. Los taninos de los raspones están también poco polimerizados y su concentración permanece bastante estable durante el período de maduración. Sin embargo, los taninos de los hollejos presentan estructuras más complejas, con altos grados de polimerización que varían poco durante la maduración, uniéndose a las proteínas y polisacáridos del hollejo, comunicando sensaciones sensoriales muy apreciadas de tipo más suaves, carnosas y grasas.

Las pepitas contienen el 65 por 100 de los polifenoles del racimo, mientras que el raspón tiene un 22 por 100, el hollejo otro 12 por 100 y por fin la pulpa tan solo el 1 por 100 restante.

Los compuestos fenólicos más simples no flavonoides son los ácidos benzoicos y cinámicos bajo la forma de ésteres tartáricos, se localizan en todos los lugares del grano de uva y no presentan coloración alguna, ni tampoco sabores u olores particulares, aunque estos pueden ser precursores de los fenoles volátiles en los vinos, después de la acción de ciertos microorganismos. Su concentración disminuye durante el desarrollo de la uva y se estabiliza en la madurez enológica. Los flavonoles, flavanoles y flavonas son pigmentos de color amarillo que se localizan en el hollejo de las variedades tintas y blancas, comunicando el color característico de los vinos blancos, aunque también participan en el color azulado de las vendimias tintas como cofactores de copigmentación de los antocianos (efecto batocromo). Los antocianos de color rojizo o azulado se encuentran normalmente en el hollejo de las variedades tintas, así como también en la pulpa de las uvas tintoreras y estando también presentes en las hojas de la vid al finalizar su ciclo vegetativo anual. Por último los taninos condensados o 3-flavonoles: catequinas y proantocianidinas o proantocianidoles, se localizan en todas las partes sólidas del racimo: hollejo, pepitas y raspones, pero nunca en cantidades apreciables en la pulpa y su mosto (Hidalgo Togados, 2006).

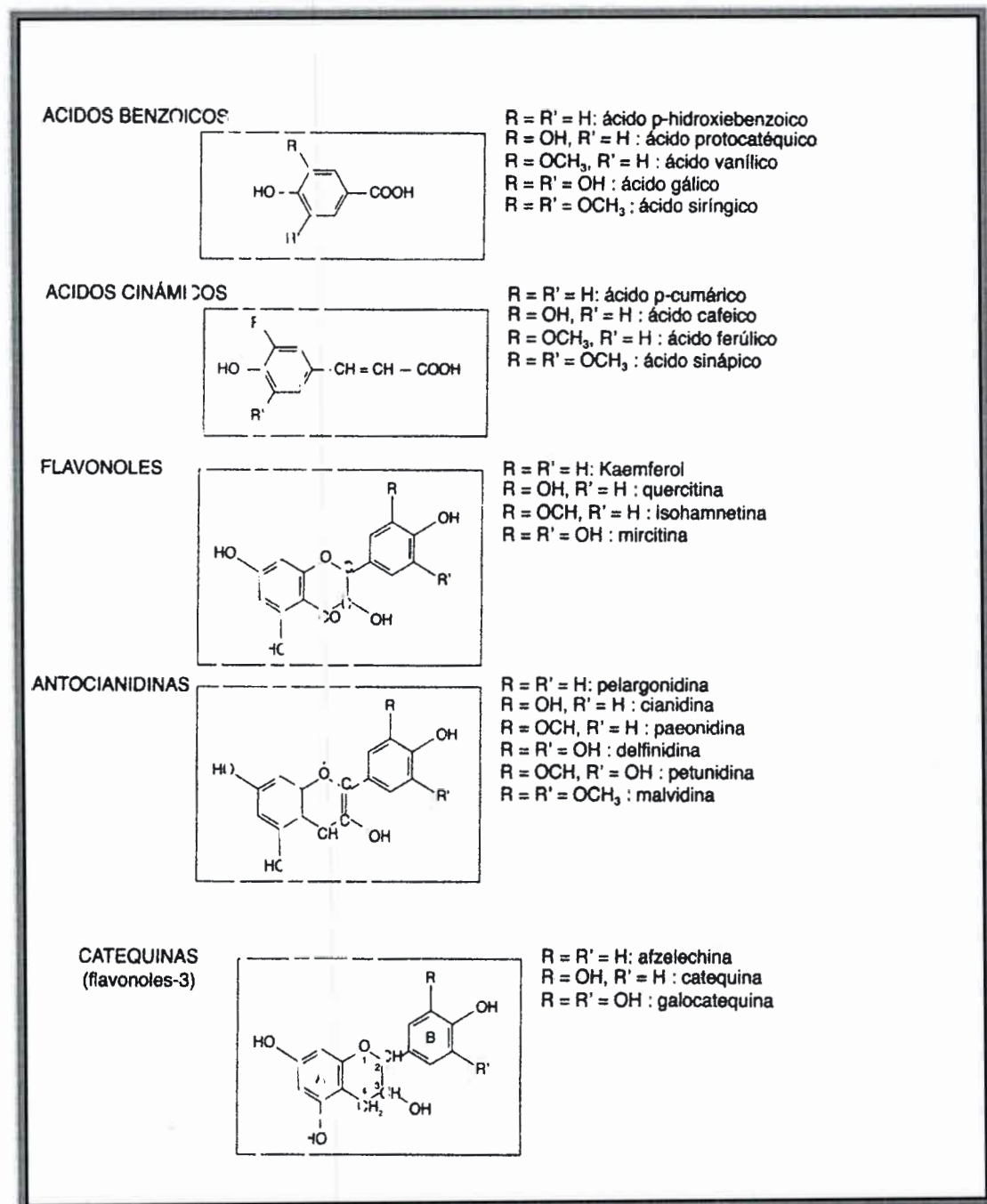


Figura 4. Principales polifenoles en vid (P. Ribéreau-Gayon y otros, extraído de Hidalgo Togados 2006).

Los compuestos fenólicos y especialmente los antocianos son las sustancias que contiene la uva entre 500 a 3000 mg/kg, que resultan más afectadas por las condiciones climatológicas de su medio de cultivo y también

entre sus variaciones anuales. Las temperaturas mas altas no son las más favorables, incluso a más de 35° C se inhibe la síntesis de antocianos. Las temperaturas diurnas constantes de 17° a 26° C, unidas a noches frías, son las condiciones ideales para la formación de éstos compuestos; siendo también necesario disponer de una suficiente iluminación y mejor si ésta es elevada. La escasez de nitrógeno en el suelo también contribuye a la formación de polifenoles. La explicación de estos fenómenos se encuentra en la citada enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL) que sintetiza los polifenoles, la cual se activa fuertemente en presencia de la luz, aunque en exceso de ésta también puede producir un efecto de fotoinhibición, influyendo también en el mismo sentido la temperatura, aunque con menor intensidad. Por otra parte, la disponibilidad de agua y en especial la fertilidad del terreno, factores que condicionan el vigor y la fertilidad del viñedo, influyen en la síntesis y acumulación de polifenoles en el hollejo, ya que la enzima PAL, además de participar en la formación de polifenoles, también lo hace en la síntesis de proteínas a partir de la fenilalanina. En consecuencia, cuando la vid dispone fácilmente de nitrógeno, parte de la enzima PAL se utiliza en esta vía y se reduce la síntesis de los compuestos fenólicos. La explicación de estos fenómenos se encuentra en la citada enzima fenilalanina-amonioliasa (PAL) que sintetiza los polifenoles, la cual se activa fuertemente en presencia de la luz, aunque en exceso de ésta también puede producir un efecto de fotoinhibición, influyendo también en el mismo sentido la temperatura, aunque con menor intensidad. Por otra parte, la disponibilidad de agua y en especial la fertilidad del terreno, que condicionan el vigor y la fertilidad del viñedo, influyen en la síntesis y acumulación de polifenoles en el hollejo, ya que la enzima PAL, además de participar en la formación de polifenoles, también lo hace en la síntesis de proteínas a partir de la fenilalanina. En consecuencia, cuando la vid dispone fácilmente de nitrógeno, parte de la enzima PAL se utiliza en esta vía y se reduce la síntesis de los compuestos fenólicos. Cuando se produce un bloqueo de la migración de los azúcares, pero no de su síntesis, se eleva notablemente la formación y acumulación de los polifenoles en los racimos;

pudiendo inducirse este fenómeno, mediante el tratamiento con sustancias inhibitoras del crecimiento.

Fitohormonas

Se conoce con el término de hormonas vegetales o fitohormonas a todo el conjunto de sustancias orgánicas que influyen en procesos fisiológicos a baja concentraciones (Davies, 2005a). Went and Thimann (1937) describieron una hormona como una sustancia que es transferida desde un lugar de un organismo a otro.

Los cinco grupos clásicos de fitohormonas comprenden auxinas, giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) citocininas y etileno (Davies, 1995; Kende y Zeevart, 1997). Actualmente también se consideran como fitohormonas otros compuestos, tales como sistemina, brasinosteroides (BR), jasmonatos (JA), ácido salicílico (SA) y poliaminas, cuyos cambios en la concentración y sensibilidad de los tejidos median un amplio rango de procesos del crecimiento y desarrollo vegetal, muchos de los cuales involucran una interacción con factores ambientales (Clouse y Sasse, 1998; Crozier et al., 2000; Davies, 2005a; Smith, 1990). Cabe destacarse que cada hormona no sólo influye en las respuestas de muchas partes de la planta, sino que dichas respuestas dependen de la especie, parte del vegetal, estado de desarrollo, concentración hormonal e interacciones con otras hormonas.

Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) fue descubierto independientemente por dos grupos de investigadores en la década del '60. Originalmente, se lo indicó como un inhibidor del crecimiento vegetal, involucrado en los procesos de abscisión de frutos de algodón y en la inducción fotoperiódica de la dormición en yemas vegetativas. Sin embargo, el ABA desempeña un importante papel en la regulación de muchos procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo, como así también, de las respuestas fisiológicas de la planta frente a situaciones de estrés, tales como sequía, salinidad, frío, ataque de patógenos, radiación UV (Rock, 2000) y sensado de azúcares (sugar sensing) (Davies,

2005a). El ABA es la hormona íntimamente relacionada con el sentido del déficit hídrico y está involucrado en la transducción de señales por dicho estrés. La regulación de estos procesos es en gran parte mediada por cambios en la síntesis *de novo* de ABA.

Biosíntesis de ABA

El ABA es un sesquiterpeno (C_{15}) ácido, cuya molécula presenta isomería óptica debido a la presencia de un átomo de carbono anomérico en posición 1'. De los enantioisómeros, sólo la forma S-ABA se encuentra naturalmente en plantas. La molécula de ABA presenta además isomería geométrica, pudiendo existir a forma *cis* (+) o *trans* (-) en el átomo de carbono 2. De estos isómeros presentes en plantas, sólo la forma S-(+)-ABA es biológicamente activa (Finkelstein y Rock, 2002).

Se han propuesto dos rutas para la síntesis de ABA: i) una ruta directa de producción de ABA a partir de isopentenil pirofosfato (C_5) vía farnesil difosfato (C_{15}), y una ruta indirecta, en la cual el ABA es sintetizado mediante el clivaje oxidativo de carotenoides de 40 átomos de carbono (Figura 5).

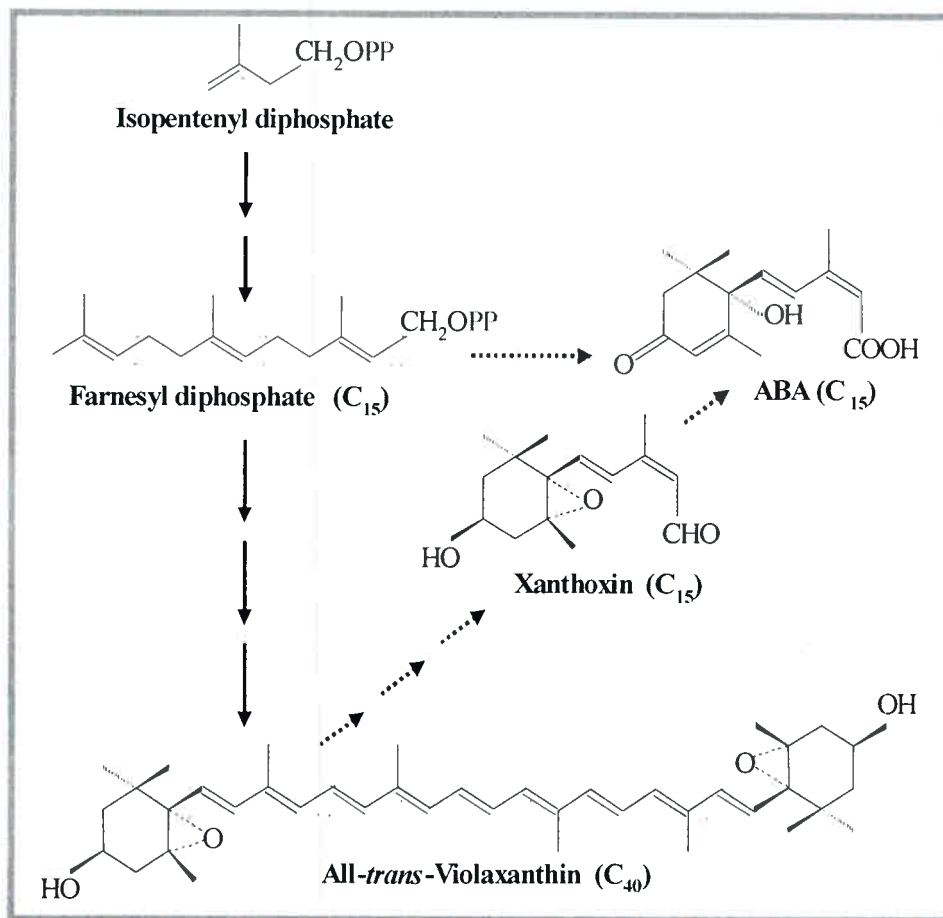


Figura 5. Rutas biosintéticas de ABA. La vía directa, a partir de farnesil difosfato (C_{15}); y la vía indirecta, a partir del clivaje de 9-*cis*-violaxantina (C_{40}) para formar un precursor de ABA, xantoxina (C_{15}) (Crozier et al.

Tras el descubrimiento, en el año 1977, de que la ruta directa de biosíntesis de ABA operaba en algunos hongos tales como los del género *Cercospora*, a través de la C1-hidroxilación de 1-deoxiABA, estos compuestos fueron estudiados para investigar su papel en la biosíntesis de ABA y así determinar la ocurrencia de la vía directa de formación de esta hormona en plantas. Creelman y Zeevaart (1988) concluyeron que xantófilos de 40 átomos de carbono son los intermediarios en la biosíntesis de ABA en plantas vasculares. Estos autores incubaron hojas de *Phaseolus vulgaris* y *Xanthium strumarium* sometidas a estrés hídrico en la presencia de $^{18}\text{O}_2$, con lo cual si el 1-deoxiABA fuera el precursor inmediato (como en hongos) del ABA en

plantas, un átomo ^{18}O sería incorporado a través de la 1C-hidroxilación a la molécula de ABA en la posición 1'. Sin embargo, el análisis por GC-MS, no reveló la presencia de ^{18}O incorporado al ABA. En los últimos años, la identificación y caracterización de mutantes deficientes en ABA ha constituido una herramienta fundamental para la identificación de muchos de los genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de ABA (Schwartz et al., 2003) por lo que actualmente se tiene un conocimiento bastante detallado de la ruta biosintética de ABA en plantas vasculares,

Inhibidores de la biosíntesis de ABA

La ruta biosintética de los terpenos en plantas da origen a diferentes tipos de metabolitos primarios, entre los cuales se incluyen los carotenoides y las fitohormonas ABA y GAs (Figura 6). Una de las reacciones iniciales de la ruta de biosíntesis de carotenoides, es decir la formación de fitoeno, compite con el primer paso en la biosíntesis de GAs, que es la formación de kaureno a partir de geranil geranil pirofosfato (GGPP). De este modo las manipulaciones sobre la biosíntesis de carotenoides que conducen tanto a aumentar como disminuir la producción de los mismos, tendrán un impacto sobre los niveles y funciones de ambas hormonas, ABA y GAs.

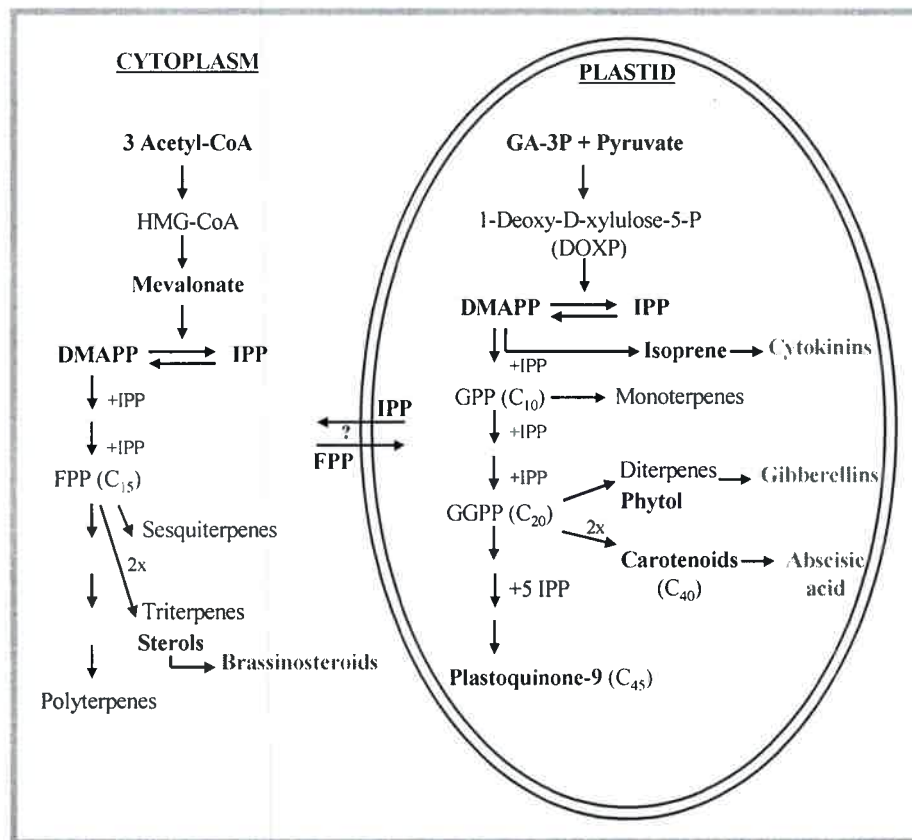


Figura 6. Síntesis de IPP e isoprenoides en citosol (vía acetato/mevalonato) y plástidos (vía DOXP) en plantas vasculares. Síntesis de GAs, citocininas, brasinoesteroides y ácido abscísico. IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil difosfato; GPP, geranil difosfato; FPP, farnesil difosfato; GGPP, geranilgeranil difosfato. (Lichtenthaler 1999 modificado).

Existen comercialmente herbicidas que interfieren con varias enzimas participantes en la ruta biosintética de los carotenoides, como por ejemplo, a nivel de la fitoeno desaturasa, ζ -caroteno desaturasa y licopeno ciclasa. Un amplio espectro de herbicidas, dentro del cual podemos citar a fluridona, inhiben la actividad fitoeno desaturasa, la cual cataliza el paso de desaturación de fitoeno a fitoflueno en la ruta de síntesis de β -carotenos.

Fluridona (1-metil-3-fenil-5-(3-trifluorometilfenil)-4-(1H)-piridinona) es un herbicida de amplio uso en Estados Unidos utilizado para controlar la

proliferación de "malezas" acuáticas en estanques, fuentes, etc. Esta sustancia es absorbida tanto por hojas y tallos como raíces (Fluridone-Sonar, Washington State Department of Health, marzo 2000). Se designa como fluridona al ingrediente activo del herbicida Sonar (Sonar A.S), actualmente comercializado por SEPRO Co.

Fluridona inhibe en forma indirecta la síntesis de ABA, ya que bloquea un paso temprano en la formación de carotenoides, lo que trae como consecuencia para la planta la foto-oxidación de la clorofila. No obstante esta limitación, fluridona ha sido ampliamente usada, contribuyendo significativamente al estudio de las respuestas mediadas por ABA en plantas (Popota y Riddle, 1996; Xu y Bewley, 1995; Yoshioka et al., 1998). Se ha propuesto que fluridona tiene efectos directos sobre los niveles endógenos de ABA, ya que dichos efectos pueden ser revertidos por la aplicación simultánea de esta hormona. En semillas de lechuga, fluridona en combinación con GA₃ y AIA revirtió el efecto inhibitorio de la luz azul sobre la elongación de plántulas de lechuga etioladas al inhibir la síntesis de ABA (Volmaro et al., 1998).

Efectos fisiológicos del ABA

El ABA participa en numerosos procesos del crecimiento y desarrollo durante todo el ciclo de la vida de la planta, ya sea sólo o a través de la interacción con otras fitohormonas. Desempeña un papel importante en procesos celulares que incluyen el desarrollo del embrión, dormición y germinación de la semilla, así como también en el control del crecimiento.

Se ha sugerido mediante estudios con *Arabidopsis* que durante el desarrollo de la semilla se producirían dos picos en los niveles endógenos de ABA (Finkelstein et al., 2002). Un pico temprano, aproximadamente 10 días posteriores a la polinización, requerido para prevenir la germinación prematura al final de la fase de división celular de la embriogénesis y para la síntesis de proteínas (Raz et al., 2001). El segundo pico en los niveles de ABA sería esencial para inducir la dormición de la semilla mediante la activación de la síntesis de proteínas LEA (*late embryogenesis-abundant*), que preparan al embrión para tolerar condiciones de desecación (Finkelstein et al., 2002).

Finalmente, durante la última etapa de maduración de la semilla, los niveles de ABA disminuyen drásticamente y rápidamente a valores significativamente bajos. Si bien los niveles endógenos de ABA son esenciales para inducir la dormición de la semilla y el mantenimiento de dicha dormición está correlacionado con la síntesis de novo de ABA durante la inhibición, los bajos niveles de ABA no serían suficientes para promover la germinación. En este sentido se ha observado que varias hormonas tales como GAs, BR y etileno pueden promover la germinación de *Arabidopsis*, y que mutaciones que afectan a cada una de éstas vías reducen la capacidad germinativa en la presencia de ABA exógeno (Beaudoin et al., 2000; Ghassemian et al., 2000; Steber y McCourt, 2001). Otro ejemplo de interacción hormonal durante la germinación, lo constituye el antagonismo entre ABA y GAs durante la germinación de semillas de cebada, donde el embrión sintetiza y secreta a la capa de aleurona GAs, las cuales inducen la transcripción de genes que codifican α -amilasa y proteasas (Lovegrove y Hooley, 2000). La expresión de estos genes es suprimida por ABA durante el desarrollo de la semilla o bajo condiciones desfavorables para la germinación (Gómez-Cadenas et al., 2001). También, se ha encontrado en semillas germinantes de sorgo que el ABA disminuye la expresión de genes que codifican GA 20-oxidasas (Perez-Flores et al., 2003).

Una vez que la plántula ha emergido, el rol fisiológico del ABA en el control del crecimiento caulinar es mucho menos conocido. Sin embargo, y al igual que lo observado durante la germinación, frecuentemente se ha propuesto que el ABA regularía el crecimiento del tallo en antagonismo con las GAs. Se ha sugerido que la acción inhibitoria del ABA sobre el crecimiento involucraría una limitada extensibilidad de la pared celular (Kutschera y Schopfer, 1986), así como también la detención del ciclo celular en la fase G1, con la consiguiente inhibición de la división celular (Liu et al., 1994). En otros casos, en cambio, en que se ha observado un efecto promotor del crecimiento por aplicaciones de ABA, es posible que los efectos de la hormona se deban más al mantenimiento de la turgencia (al disminuir el déficit hídrico temporario por cierre estomático) que a un efecto directo de este inhibidor sobre la elongación caulinar (Sansberro et al., 2004).

Cuaje, Etileno y Vid

La estimulación del cuaje es un medio disponible de aumentar la producción, y ha inspirado el desarrollo de muchas investigaciones sobre el uso de reguladores de crecimiento en viticultura (Considine, 1983). El cuaje esta sujeto a cada grupo principal de sustancias de crecimiento naturales; hay reportes de promoción del cuaje por aplicación de auxinas, citocininas, giberelinas y diversos retardantes del crecimiento. Existen interacciones de genotipo, ambiente y reguladores de crecimiento que hacen difícil atribuir roles específicos a compuestos individuales.

La evidencia disponible soporta el punto de vista que el cuaje en la vid esta sujeto a un control correlativo. Es posible en uvas de Cabernet Sauvignon alcanzar un aumento sustancial en el cuaje a proveer condiciones ideales para la polinización y fecundación y al reducir el número de sumideros en competencia, pero no ha sido posible hasta ahora obtener un nivel de cuaje que exceda el 65%. Aún bajo las circunstancias más favorables hay una pérdida considerable de flores aparentemente funcionales, y ello sugiere que puede haber diferencias en el potencial de las flores a ser transformadas en frutos.

Se conoce que el etileno esta relacionado con muchos aspectos del ciclo de vida de las plantas, incluyendo germinación de semillas, desarrollo de raíces y nodulación, senescencia de flores, abscisión y madurez de frutos (Johnson y Ecker, 1998). La producción de etileno es finamente regulada por señales internas durante el desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales desde estreses bióticos (por ej. ataque de patógenos) y abióticos, como heridas, hipoxia, ozono, bajas temperaturas o heladas (Wang et al., 2002).

Con la finalidad de aportar al conocimiento sobre el cultivo de la vid en la provincia de Mendoza, y tomando en consideración los antecedentes pertinentes a este cultivo y de la fitohormona ABA, se planteó como **objetivo general del trabajo**:

Evaluar el efecto de tratamientos con ABA sobre variables fisiológicas y de producción cuali-cuantitativas en vides del cv Cabernet Sauvignon cultivadas a campo.

La realización de este objetivo planteado se propone comprobar la siguiente hipótesis general del trabajo:

la aplicación de ABA en diferentes etapas fenológicas de la planta de vid, permite producir una mayor cantidad y calidad de bayas a cosecha.

HIPÓTESIS

Hipótesis

Hipótesis 1. Incrementando los niveles de ABA (por aplicación exógena) en hojas de vid durante el período de rápido crecimiento vegetativo, se promueve cierre de estomas, se evitan pérdidas excesivas de agua, se impiden picos de estrés hídrico temporario y se logra un incremento de la fotosíntesis.

Hipótesis 2. El crecimiento vegetativo es promovido por la mayor turgencia en plantas tratadas con ABA.

Hipótesis 3. El ABA per se tiene efectos positivos sobre el metabolismo de antocianos y polifenoles.

Hipótesis 4. La mayor actividad fotosintética de plantas tratadas con ABA se traducen en una mayor producción de uva.

Hipótesis 5. ABA aplicado sobre racimos durante la floración disminuye la caída de flores y/o mejora la persistencia de las mismas en el racimo.

Hipótesis 6. Al inhibir el efecto de abscisión sobre las flores cuajadas y/o sobre los pequeños frutos en formación, se incrementarían los rendimientos de vid a campo.



OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar, en experimentos a campo conducidos sin restricción hídrica, los efectos de aplicaciones de ABA y 1-MCP sobre parámetros fisiológicos que influyen y controlan la producción cuali-cuantitativa en vides de la cultivar Cabernet Sauvignon.

Objetivos específicos

Objetivo 1. Evaluar la acción de aplicaciones de ABA sobre diversos parámetros fisiológicos, la composición de la baya y el rendimiento de uva de la cv. Cabernet Sauvignon.

Objetivo 2. Evaluar la acción de aplicaciones de ABA sobre el contenido de antocianos y polifenoles totales, en bayas de vides de la cv. Cabernet Sauvignon.

Objetivo 3. Evaluar en vides de la cv. Cabernet Sauvignon el efecto de aplicaciones de ABA y 1-MCP sobre el cuaje y posterior rendimiento y calidad enológica de bayas.

Objetivo 4. Identificar y cuantificar mediante GC-MS el perfil polifenólico de bayas colectadas durante distintas etapas de la maduración de la vid y de los vinos elaborados a partir de ellas.

QUESTION

1. The following are the details of the accounts of a company for the year ended 31st March 2019:

Particulars	Rs.
Opening Balance	1000
Transfer from Profit and Loss Account	2000
Transfer to Profit and Loss Account	1500
Closing Balance	1500

CAPÍTULO II

***EFFECTOS DE ÁCIDO ABSCÍSICO SOBRE EL
CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE *Vitis*
vinifera cv. Cabernet Sauvignon***

CAPÍTULO II

EFFECTOS DE ÁCIDO ABSCÍSIKO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon.

En un contexto agrícola, es común que las limitaciones hídricas sean el factor más importante que condiciona la productividad de los cultivos y consecuencia de ello son las diversas y extensas investigaciones relacionadas a las respuestas de las plantas frente a déficits hídricos a nivel de desarrollo, fisiológico y molecular (Passioura y Stirzaker, 1996; Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Wery, 2005). Una respuesta temprana al déficit hídrico es una reducción en el desarrollo del área foliar, que les permite a las plantas reducir sus tasas de transpiración, y por ende facilita la conservación de agua (Westgade y Boyer, 1985). Sumado a esto en condiciones de estrés, las hojas cierran sus estomas, y esto se cree es la causa de la reducción en la ganancia de carbono bajo períodos de sequía (Kaiser et al., 1981).

En algunos lugares del mundo, como el suroeste de Europa, América latina, África del Sur, Australia, Estados Unidos e Israel, la pluviométrica media anual no es suficiente para el desarrollo óptimo de la vid y no se obtienen los mejores rendimientos cualitativos y cuantitativos, y esto determina que en estas áreas el estrés hídrico sea el factor limitante más importante para el cultivo (Gomez del Campo et al., 1999 y 2002; Medrano et al., 2002). Debido a esto surge la necesidad de regar y controlar ese riego en oportunidad e intensidad para lograr cualidades sobresalientes en las bayas (Kliewer et al., 1983). La restricción de agua es una técnica que consiste en disminuir o suprimir, según la intensidad que se desee, el riego con el objetivo de someter a estrés hídrico. Se han estudiado los diversos efectos que ocasiona un estrés hídrico en las plantas inclusive en la vid (Hardie y Considine, 1976; Naor et al., 1994; Smart, 1974; Williams y Matthews; Smart, 1983; 1990; Williams et al., 1994; Vallone, 1998; Dry y Loveys 1999; Dry et al., 2000; Carbonneau, 1998; Zufferey, 2000). Según la cantidad de agua restringida al viñedo y el momento de aplicación, la restricción provoca disminuciones de los rendimientos de hasta un 50% si es aplicado inmediatamente después de la floración y de un 24 % si se lo aplica

32 días antes de la cosecha (Poni et al., 1994; Naor et al., 1993). Algunos estudios previos en cuanto a la respuesta fotosintética a sequía en condiciones de campo muestran que el cierre estomático es una respuesta temprana, que estaría unida a disminuciones en la asimilación de CO₂. Esta respuesta es progresivamente mayor en función a lo largo del verano, a medida que la disponibilidad del agua del suelo disminuye y los efectos no estomáticos aparecen (Medrano et al., 1998).

Asimismo, se ha demostrado que un estrés hídrico moderado aumenta la intensidad colorante y el matiz en las uvas (McCarthy et al., 1983; Bravdo et al., 1985; Vallone et al., 1997; Ojeda, 1999). Una explicación directa y racional respecto al aumento del contenido de antocianinas y otros compuestos fenólicos en plantas sometidas a restricción hídrica, es que el estrés disminuye el crecimiento de las bayas. Como las antocianinas y otros compuestos fenólicos se encuentran en el pericarpio de las bayas, en bayas más pequeñas, aumenta la relación superficie/volumen, y en consecuencia aumenta la concentración de estos compuestos fenólicos. En las variedades tintas, las concentraciones de antocianos y polifenoles constituyen un aspecto fundamental pues de ellos dependen las propiedades organolépticas y calidad del vino (Riberau-Gayon, 1998; Boido et al., 2006). Los antocianos son responsables del color de los vinos rojos mientras que los flavonoles (presentes en la piel de la baya) son particularmente efectivos como cofactores en la copigmentación de los vinos y beneficiosos para la salud, reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Riberau-Gayon, 1982; Hertog, M., 1996; Knekt et al., 1997; Hertog, M. y Katan, M. 1998; Estruch R., 2000; Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que el estrés hídrico moderado también aumentó la biosíntesis de antocianos y flavonoles (Ojeda, 1999, Deis et al., 2004). Paralelamente, se ha encontrado que aplicaciones de ABA en plantas de vid incrementaron la concentración de antocianos en bayas (Pirie y Mullins, 1976; Kataoka et al., 1984; Jeong et al., 2004; Deis et al., 2004).

Se ha verificado que un estrés en cualquier vegetal provoca fluctuaciones (generalmente aumento) en los niveles de ABA (Kamande y Masumi, 1997; Zhang y Davies, 1989, 1990 y 1991; Eze et al., 1983). Usando



mutantes de maíz deficientes en ABA, se demostró que una de las funciones del ABA es mantener la integridad de la membrana y prevenir los niveles excesivos de AOS durante el estrés hídrico (Jiang y Zhang 2002; Bowler et al., 1992 y Fryer et al., 1992 en Zhang et al., 2001).

Aplicaciones de ABA en plantas de vid incrementaron la concentración de antocianos en bayas (Pirie y Mullins, 1976; Kataoka et al., 1984; Jeong et al., 2004; Deis et al., 2004). Sin embargo, hasta el momento, no se ha estudiado su relación con el rendimiento del cultivo y como afecta esto la calidad de los frutos, ni el efecto de aplicaciones durante años sucesivos en los viñedos. Tampoco ha sido esclarecido si el ABA actúa a través de la actividad enzimática en la síntesis de polifenoles. Sólo se ha verificado una falta de correlación entre RNAm de las enzimas y la concentración de polifenoles (Jeong et al., 2006). Se sabe que el ABA activa un gen regulador de otros genes ligados directamente a la síntesis de polifenoles (Jeong et al., 2004).

Trabajos previos de nuestro grupo de trabajo, demostraron que el ABA aplicado a plantas enteras en condiciones de campo, aumentó el contenido de antocianos y polifenoles totales (Quiroga et al., 2009; Deis et al., 2004). Además se ha observado que el efecto deja de ser significativo si las plantas reciben aplicaciones en dos años sucesivos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y con el objetivo de conocer los efectos de esta fitohormona sobre el crecimiento, rendimiento y calidad de las bayas en vides del cv. Cabernet Sauvignon se plantea la experiencia que se describirá a continuación.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones generales

El ensayo se realizó en un viñedo de la cultivar Cabernet Sauvignon, de 12 años conducido en espaldero alto y podado en cordón bilateral ubicado en la finca "San Antonio" de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo en el departamento de Lujan de Cuyo, provincia de Mendoza, Argentina ($33^{\circ} 0' 37.38''$ latitud sur, $68^{\circ} 52' 37.69''$ longitud oeste, 920 m sobre el nivel del mar).



Figura 7. Foto satelital donde se muestra en detalle la ubicación de la parcela experimental establecida en la Finca San Antonio de la Facultad de Ciencias Agrarias (Fuente: GoogleEarth 2007).



Figura 8. Detalle de la parcela experimental protegida con malla antigranizo, establecida en el sector de espalderos de la Finca San Antonio de la Facultad de ciencias Agrarias (Fuente: Google Earth 2007).

La parcela experimental se ubicó en un sector seleccionado por homogeneidad de plantas (elegidas en función a la altura y tamaño del tronco) en la zona central de cada hilera para disminuir las diferencias o errores por el tipo de riego.

Las plantas, conducidas en espaldera con una distancia de plantación de 1,5 m entre plantas y 2,2 m entre hileras, fueron regadas gravitacionalmente por surcos, con desagüe al pie con una frecuencia semanal. Todas las plantas monitoreadas están distribuidas en 3 hileras con orientación Norte – Sur y se encuentran protegidas con malla antigranizo para evitar los daños que se pudieran ocasionar durante los meses de verano.

Los tratamientos fueron sorteados y se identificó cada planta al pie un cartel indicador de madera.

Diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques completamente aleatorizados y la unidad experimental de 2 plantas en cada uno de los bloques (repeticiones). La toma de datos se realizó sobre la cara Este de las plantas y se estableció que las mediciones no destructivas se realizarían en la planta Norte. La planta Sur se utilizó para las mediciones destructivas.

Tratamientos

Durante las dos primeras temporadas las soluciones de aspersion se aplicaron semanalmente y se distribuyeron sobre el follaje y racimos hasta goteo (200 mL/planta) con soluciones que en el caso del Control estaban compuestas por: agua destilada, Triton X100 0.1% como tensioactivo y etanol 0.1%. En el caso de los tratamientos hormonales las soluciones estaban compuestas por: agua destilada, ABA (en distintas concentraciones), Triton X100 0.1% como tensioactivo y etanol 0.1% como disolvente de la hormona utilizando en estos casos para su traslado a campo bidones opacos. Además para minimizar la degradación de ABA por UV-B y asegurar la incorporación del producto las aplicaciones se hicieron al crepúsculo.

Los tratamientos variaron a lo largo de las tres temporadas de la siguiente manera:

- Año 2004-2005. En esta temporada las aplicaciones comenzaron desde 15 días post-brotación y se extendieron hasta cosecha y los tratamientos fueron:

- 1) Control
- 2) ABA, 250 mg L⁻¹

- Año 2005-2006. Las aplicaciones se hicieron según el siguiente detalle:

- 1) Control, desde 15 días post-brotación y hasta cosecha.
- 2) ABA early, 250 mg L⁻¹, plantas sin aplicación previa y en las que se realizó una única aplicación temprana en la temporada, cuando en los brotes existían al menos 4 hojas desarrolladas.

3) ABA 1st, 250 mg L⁻¹, (plantas sin aplicación previa) asperjado 15 días posteriores a la aplicación del tratamiento ABA early y hasta cosecha.

4) ABA 2nd, 250 mg L⁻¹, (plantas con un año de tratamiento previo) asperjado 15 días posteriores a la aplicación del tratamiento ABA early y hasta cosecha.

- Año 2006-2007, las aplicaciones se hicieron desde los 15 días post-brotación y hasta cosecha y los tratamientos fueron:

1) Control.

2) ABA 1st, 250 mg L⁻¹, plantas sin aplicación previa.

3) ABA 2nd, 250 mg L⁻¹, plantas con un año de tratamiento previo.

4) ABA 3rd, 250 mg L⁻¹, plantas con dos años de tratamiento previo.

Con el objeto de una mejor interpretación de los tratamientos realizados en cada temporada de estudio en el siguiente cuadro resumen se da un detalle de los mismos.

Tratamientos	2004/2005	2005/2006	2006/2007
Control	*	*	*
ABA early	-	*	-
ABA 1st	*	*	*
ABA 2nd	-	*	*
ABA 3rd	-	-	*

Mediciones realizadas a campo

1) **Área foliar de plantas (AF).** En las temporadas 2004/2005 y 2005/2006 y con el objeto de conocer la dinámica del crecimiento vegetativo en los tratamientos Control y con ABA, al momento de brotación se identificaron 2 brotes representativos (planta Norte) de cada tratamiento con una cinta de color para realizar en ellos las mediciones no destructivas durante la temporada. En lo que respecta al crecimiento vegetativo esas mediciones consistieron en establecer el largo del brote, el número de entrenudos y el largo de la nervadura central en todas las hojas de los dos brotes seleccionados desde la base al ápice del mismo. Estas determinaciones se hicieron semanalmente desde la primera aplicación hasta el momento en que la tasa diaria de crecimiento fue de cero. Para estos años con dichos datos se generó un modelo de regresión lineal ($R^2 = 0,907$) con el fin de obtener el área foliar, a través de mediciones no destructivas como las de longitud de nervadura central (datos no mostrados).

Se extrajeron todas las hojas de 10 brotes, elegidos al azar, en plantas ubicadas dentro de la parcela de estudio pero que no participaban en los tratamientos, se introdujeron en bolsas de nylon y se mantuvieron en hielo para minimizar su deshidratación. En el laboratorio, se determinó la longitud de la nervadura central y el peso de cada una de las hojas. Posteriormente se cortó un disco de hoja con una superficie de 1 cm^2 y se pesó. Con estos datos se calculó el área foliar de cada hoja de acuerdo a su peso y se generó un modelo de regresión lineal, entre el área foliar y el largo de nervadura central. Los coeficientes de correlación (R^2) fueron superiores a 0,9 en todos los casos (datos no mostrados). Los modelos se utilizaron para transformar los valores de largo de nervadura central, medidos semanalmente en todas las hojas de los brotes seleccionados, en valores de área foliar.

Para la temporada 2006/2007 año como ya se conocía la dinámica del crecimiento de las plantas durante el período vegetativo se modificó la metodología y se tomaron los datos de crecimiento al momento de cosecha en brotes que fueron seleccionados e identificados con cintas (planta Norte) en la etapa de brotación. A cosecha estos brotes fueron cortados y llevados a

laboratorio para determinar largo de brote, número de entrenudos y área foliar total. Para ésta última medición se utilizó un medidor de área foliar (LICOR portable área meter, mod. LI3000A) que permitió conocer en detalle el AF total discriminando el AF aportado por hojas “verdaderas” de aquella aportada por feminelas, datos que no fueron posibles de discriminar en las mediciones realizadas a campo debido a la complejidad que esto tiene.

2) **Potencial agua (Ψ_w)** en hojas al medio día según la técnica de la cámara de presión (Scholander et al. 1965). En algunas fechas, debido a precipitaciones a la hora de realizar las mediciones, éstas se realizaron al día siguiente cuando las condiciones meteorológicas lo permitieron. Para realizar dicha medición se utilizó la repetición Sur (mediciones destructivas) de cada tratamiento y sobre la cara Este de cada hilera se eligió un brote representativo de la planta y del nudo 6 o 7 (considerando desde la base del brote) se designaba dicha hoja como muestra, considerando que la misma debía estar totalmente expandida y en excelente estado fitosanitario y de conservación.

Previo a extraer la hoja ésta se cubría con una bolsita de nylon transparente de tamaño similar a la hoja y se la cerraba a la altura de la unión del limbo con el pecíolo con un clip al mismo tiempo de asegurarse la máxima extracción de aire desde el interior de la misma. Tras la espera de unos minutos para estabilizar las condiciones dentro de la bolsa se cortaba la hoja en bisel con bisturí e inmediatamente se procedía a colocarla en la cámara de Scholander.

3) Las mediciones de **Tasa fotosintética** al medio día (TF) se realizaron por intercambio gaseoso mediante un analizador de gas infrarrojo (Portable Photosynthesis system - LICOR LI-6200). El fundamento del método se basa en que cuando las plantas fotosintetizan, toman CO_2 y cuando respiran ceden CO_2 al medio. El próximo intercambio de CO_2 entre una hoja y la atmósfera es medida con el LI-6200 al encerrar la hoja en una cámara cerrada, y monitorear la tasa a la cual la concentración de CO_2 en el aire cambia en un intervalo de

tiempo bastante corto (generalmente 10-20 segundos). La tasa fotosintética es luego calculada usando esta tasa de cambio y algunos otros factores, como la cantidad de área foliar dentro de la cámara, el volumen dentro de la cámara, la temperatura y la presión. Con este criterio en la planta designada para las mediciones no destructivas se eligieron 2 brotes representativos sobre la cara Este de las mismas y fueron marcados con una cinta de color para identificarlos de manera de realizar estas y otras determinaciones sobre ellos durante toda la temporada. Para medir TF se eligió una hoja totalmente expandida y sana, en la hoja del nudo 6 o 7 (considerando desde la base del brote). Se tuvo en cuenta evitar durante las mediciones la zona de las nervaduras y colocar el dispositivo de medición sobre el limbo de las hojas, además de que estas estuvieran recibiendo pleno sol antes y durante la medición.

4) **Conductancia estomática (gs)** al medio día (LICOR LI-6200). Estas mediciones se realizaron en simultáneo en la misma hoja en la que se monitoreó TF, por lo que las consideraciones generales del procedimiento fueron las mismas.

Para este caso el fundamento de la medición se basa en que cuando una hoja es encerrada en la cámara del Li-6200, la humedad dentro de la cámara tiende a subir. Esto es balanceado (en mayor o menor medida) por el flujo de aire seco que retorna desde el analizador hacia la cámara, si el desecante esta siendo usado. La tasa de transpiración es calculada por el cambio en humedad con el tiempo y la tasa de flujo del aire seco. La tasa de transpiración es luego usada con la temperatura de la hoja y del aire para calcular la conductancia total de la hoja y (después de remover la conductancia de la capa límite) la conductancia estomática. Cuando los estomas de las plantas están abiertos el CO₂ puede ser tomado por la planta y el agua se pierde desde el interior de la hoja hacia la atmósfera seca que rodea a la hoja. La tasa a la cual esta agua se pierde (la tasa de transpiración) depende fuertemente de dos conductancias del flujo desde la superficie sub-stomática a la libre atmósfera: la conductancia de la apertura estomática, y la conductancia

de la fina capa límite de aire que envuelve la hoja. La conductancia estomática (y su inversa, la resistencia estomática) es íntegramente fisiológica en respuesta, por lo que conocer sus valores indican algo sobre el estado de la planta. La conductancia de la capa límite, por otro lado, depende de factores externos, como el tamaño de la hoja y la velocidad del viento que pasa sobre la hoja. Desde que la conductancia de la capa límite para una hoja en la cámara es usualmente diferente a la que existe para la misma hoja fuera de la cámara, la medida de la tasa de transpiración es usualmente artificial. Es decir, la tasa de transpiración determinada en la cámara puede ser algo distinta a la tasa fuera de la cámara. Como sea, una medida real de la conductancia estomática se obtiene por la tasa de transpiración debido a que la conductancia de la capa límite de la cámara es conocida.

Mediciones realizadas en laboratorio

Desde el momento de envero (50 % de las plantas con esta condición) y hasta cosecha se realizó el control de madurez de los racimos. La metodología de muestreo en cada fecha consistió en elegir en la planta Sur de cada tratamiento 6 racimos representativos y coleccionar en cada uno de ellos aproximadamente 10 bayas de la parte alta, media y baja del racimo siempre sobre la cara Este de la hilera. Con este material se realizaron las siguientes determinaciones:

1) **Peso fresco (PF)** de las bayas mediante una balanza analítica, precisión de 0.001 g (SCALTEC) separando para cada tratamiento el número de bayas necesario para alcanzar 50 g de bayas.

2) **Volumen de las bayas** mediante probetas graduadas con agua, midiendo el volumen de agua desplazada por las bayas seleccionadas anteriormente al introducirlas en la probeta.

3) **Concentración de sólidos solubles (°Brix)** mediante un refractómetro digital portátil, rango de medición de 0.0-53.0 °Brix, precisión de 0.1 Brix (Pocket Refractometer PAL-1.ATAGO). Una vez realizadas las determinaciones anteriores y mediante presión manual se separó el hollejo de la pulpa de cada baya que fue recogido en un vaso de precipitación. El mosto

una vez homogeneizado se colocó en el lector del refractómetro y se procedió a la lectura de los °Brix.

4) Determinación del contenido de **antocianos e Índice de polifenoles totales (IPT)** mediante un espectrofotómetro UV-Visible-NIR (Cary50/WinUV-VARIAN) según la técnica descrita por Riou y Asselin (1996). Estos hollejos una vez separados se colocaron en tubos de ensayo de 100 ml a los que se les agregó una solución de extracción que se preparó de la siguiente manera: alcohol etílico 12% v/v, ácido tartárico 6 g L, SO₂ 100 mg L y agua destilada. Una vez ajustado el pH a 3,5 con NaOH o KOH, se colocaron 50 mL de la solución y se taparon los tubos con tapones de goma. Se colocaron en un baño maría (BM) a 70°C por un período de 3 horas, realizando entre horas un agitado de los tubos por inversión con el fin de lograr íntimo contacto del extracto con los hollejos. Transcurridas las 3 horas se retiraron del BM y con embudos de vidrio y un paño de gasa se separaron los hollejos del extracto que era recogido en un tubo limpio. Se dejó reposar por el tiempo necesario para que el extracto alcanzara la temperatura ambiente. En este punto se agitaron los tubos para homogeneizar la solución y con pipetas automáticas se retiraron: para determinar polifenoles 100 µl del extracto que se colocaron en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada; y para determinar antocianos 200 µl del extracto que se colocaron en un tubo con 10 mL de una solución de Ácido Clorhídrico 1%. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 280 y 520 nm para índice de polifenoles y antocianos respectivamente, utilizando cubeta de cuarzo.

Determinaciones a cosecha

El momento en el que las bayas alcanzaron el grado de madurez óptimo para el cultivar (23-24 °Brix) se estableció como momento de cosecha. La misma se realizó en todas las plantas del ensayo, pero para el dato de rendimiento (kg uva planta) solo se tiene en cuenta aquel que proviene de las plantas en las que se realizaron los análisis no destructivos (planta Norte). En esta etapa se midió: kg uva, planta⁻¹, nº de racimos.planta⁻¹, peso de racimos,

nº de bayas.racimo⁻¹, peso fresco de bayas, volumen de bayas y contenido de sólidos solubles.

Microvinificaciones

Con el producto de la cosecha de los años 2004/2005 y 2005/2006 se realizaron las microvinificaciones de cada tratamiento. Para ello se colocaron 4 kg uva/tratamiento en recipientes plásticos (bidones) de 5 lts de capacidad. Una vez separadas las bayas de cada racimo de los escobajos, se procedió a macerar las mismas mediante presión manual y con la ayuda de un pison de madera con el fin de lograr la ruptura del hollejo y lograr íntimo contacto entre pulpa y hollejo. Una vez lograda la trituración de las bayas se incorporó al bidón anhídrido sulfuroso teniendo en cuenta que para el cv. Cabernet Sauvignon se considera que con 130 kg uva se obtiene 1HI de vino y que la concentración de SO₂ a agregar debe ser de 5g SO₂/HI vino. Una vez transcurridas unas horas desde el agregado de SO₂ se le incorporó a los bidones levadura a razón de 20g levadura /HI. La levadura se preparó considerando que para 500g levadura se necesitan 5 lts de agua y 250 g sacarosa. La incorporación de la misma en los bidones se hizo mediante agitación de los mismos. Desde este momento se colocaron los recipientes en un ambiente controlado de temperatura a 26° C. Diariamente y 2 veces al día se realizó el seguimiento y control de la temperatura de la cámara de vinificación y de los bidones. Todos los días también se controlaron los °Brix de los bidones y se incorporó con la ayuda de un pisón el "sombbrero" de hollejos que se forma por la actividad de las levaduras, para lograr la máxima extractividad fenólica. Una vez alcanzados los 2 – 3 °Brix se comienza a medir diariamente con un densímetro los grados Bomhé para evaluar el momento en que cada bidón logra el punto de "rastreo de azúcar" y establecer ese momento como el final de la etapa de fermentación. Una vez retirados los bidones de la cámara de vinificación se determina en cada bidón azúcares reductores mediante el método del Licor de Fehling-Causse-Bonnans.

Posteriormente se procedió a realizar una titulación con SO₂ para valorar la cantidad de SO₂ libre que había quedado en los bidones; considerando que

en cada bidón debería tener 40 mg/l SO₂ libre. Una vez realizada la corrección de anhídrido sulfuroso se procedió al descube de los bidones que consistió en la separación de los hollejos del vino mediante colado de los mismos. El vino resultante se colocó en botellas plásticas y se lo trasladó a un ambiente oscuro a 16° C para lograr "su limpieza" de los sólidos en suspensión mediante decantación en frío (efecto de la gravedad). Se realizaron 3 trasiegos posteriores y sucesivos hasta lograr un vino limpio y libre de material en suspensión y se lo colocó en su embase definitivo en botellas de vidrio oscuro de 750 ml de capacidad. Dichas botellas se almacenaron en un ambiente fresco y protegido de la luz hasta el momento de realización de los análisis de ph, intensidad colorante, matiz, contenido de antocianos y polifenoles en el vino resultante.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) considerando a los tratamientos y los bloques como factores principales usando el programa STATGRAPHICS PLUS 5.1. Se utilizó el Test de Fisher's (LSD) para discriminar entre las medias por la mínima diferencia ($P \leq 0.05$). Para la confección de los gráficos se utilizó el programa GRAPHPAD Prisma 5.1.

CAPÍTULO II

RESULTADOS y DISCUSIÓN

En la Figura 9 se detallan las áreas foliares totales (AF, cm²) registradas durante la etapa previa a cosecha (ver Materiales y Métodos para mas detalles) para los tres años de estudio. En las temporadas 2004/2005 y 2005/2006, no se encontraron diferencias significativas para éste parámetro entre el Control y los tratamientos con ABA, aunque dependiendo del año se observaron en todos o algunos de los tratamientos hormonales menores valores de áreas foliares. Estas tendencias durante el año 2006/2007 alcanzaron a ser significativas entre el tratamiento Control y ABA 1st. En cuanto al análisis de los tratamientos con ABA entre si para este año existieron diferencias importantes registrándose las mayores AF en el tratamiento ABA 2nd que alcanzaron a ser significativas respecto a las de los otros dos tratamientos hormonales. En el análisis del seguimiento de las tasas semanales de crecimiento realizadas en las dos primeras temporadas (datos no mostrados) si bien las diferencias no alcanzaron a ser significativas entre los tratamientos en las fechas se observó que las plantas con ABA mostraron en valores absolutos las menores tasas y sumado a esto detenían anticipadamente su crecimiento vegetativo respecto al Control. En correspondencia con estos resultados, las mismas tendencias y diferencias entre tratamientos se manifiestan en las mediciones de Largo de brote a cosecha donde se manifiestan diferencias entre el Control y ABA 1st en la tercera temporada de estudio. Para este año también se diferenció estadísticamente el tratamiento ABA 2nd, respecto a ABA 1st y ABA 3rd que tuvieron los brotes mas cortos de todos los tratamientos ensayados el año 2006/2007 (Figura 10).

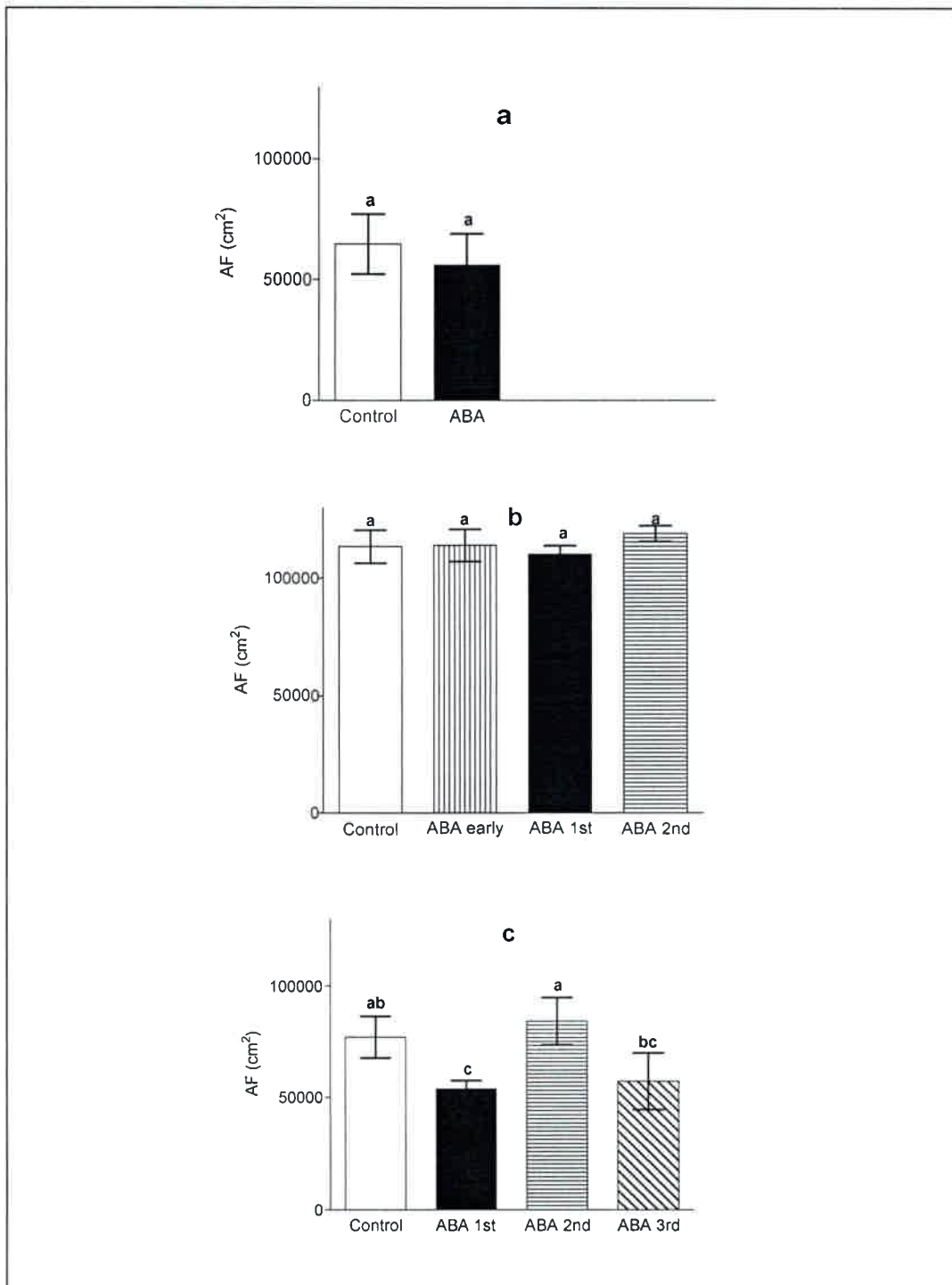


Figura 9. Área foliar (AF, cm²) de plantas de vid en etapas previas a cosecha, para las temporadas 2004/2005 (a), 2005/2006 (b) y 2006/2007 (c). Letras distintas indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

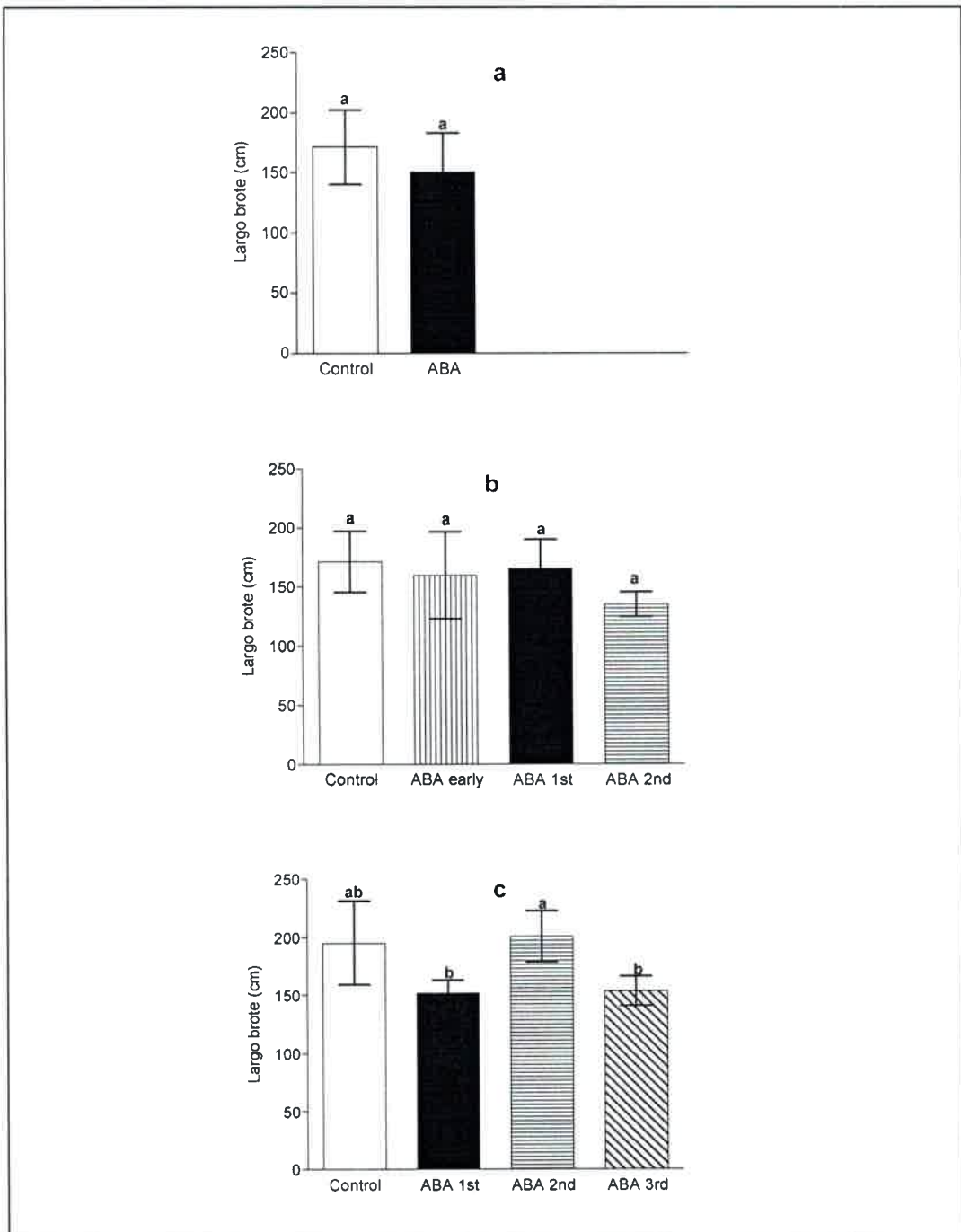


Figura 10. Largo de brote (cm) de plantas de vid en etapas previas a cosecha, para las temporadas 2004/2005 (a), 2005/2006 (b) y 2006/2007 (c). Letras distintas indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

Debido al régimen semanal de riego las plantas de todos los tratamientos mantuvieron durante las tres temporadas de estudio Ψ_w relativamente altos en horas de mediodía, cuando normalmente las condiciones ambientales determinan que la cantidad de agua transpirada excede la capacidad de absorción del sistema radical, a lo largo de toda la experiencia. Durante el año 2004/2005 si bien las plantas tratadas con ABA mostraron (en valores absolutos) mayores Ψ_w que el Control sólo se diferenciaron estadísticamente en la última fecha muestreada. Los potenciales mediodía para la segunda temporada de estudio se mantuvieron mas homogéneos entre si que el año anterior, encontrándose diferencias estadísticas a favor de los tratamientos hormonales en dos de las seis fechas muestreadas, entre los tratamientos ABA early y ABA 2nd frente al Control durante las determinaciones del mes de febrero y ABA 1st y el Control en marzo. Durante la última temporada evaluada no se observó en ninguna fecha diferencias entre los tratamientos y fue el año en que los valores de potencial agua mediodía para todos los tratamientos fueron los mas altos y homogéneos de los tres años estudiados, con cuantías entre -0,7 y -0,8 Mpa (Figura 11).

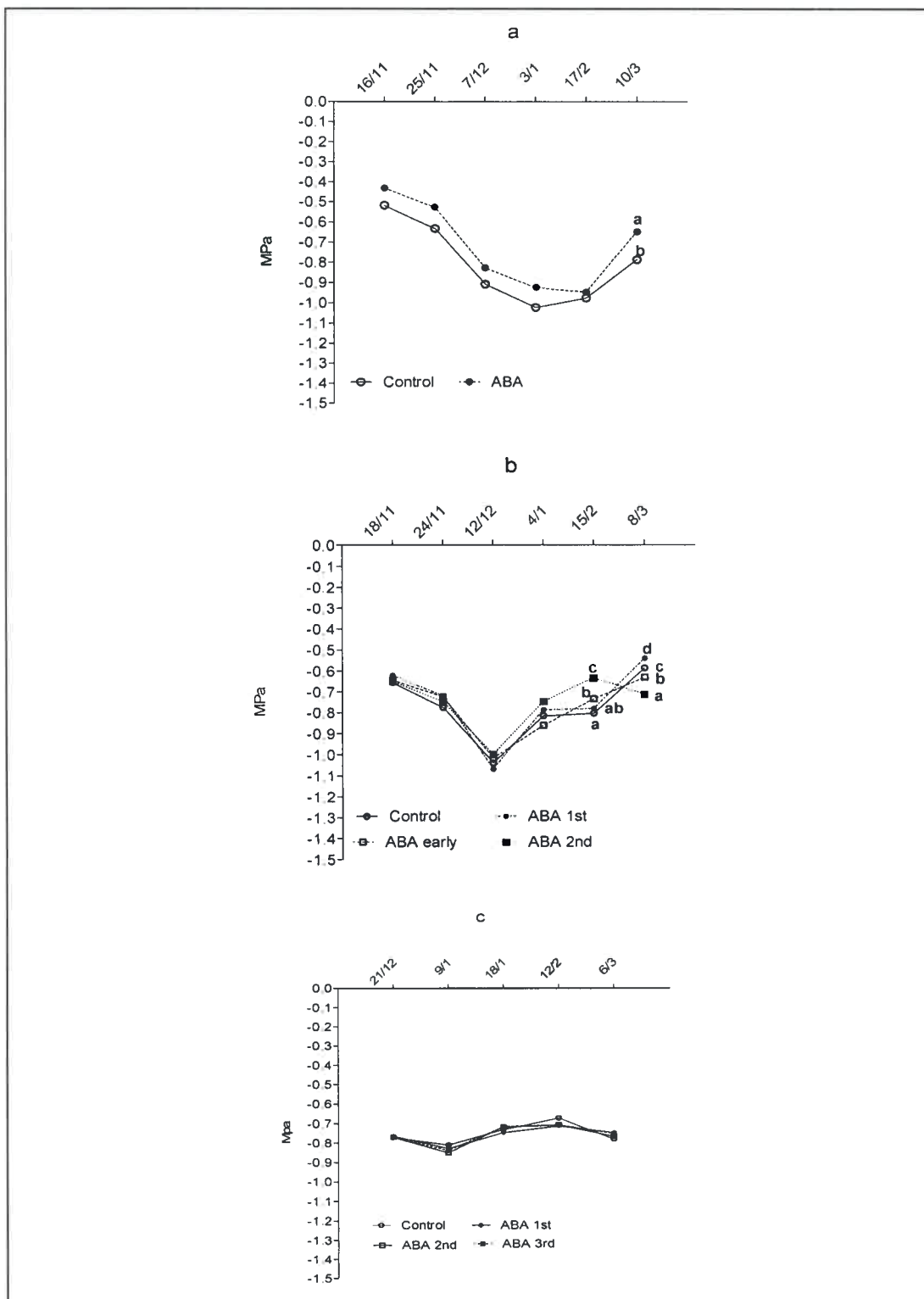


Figura 11. Potencial agua mediodía (Ψ_w , MPa) de plantas de vid, para las temporadas 2004/2005 (a), 2005/2006 (b) y 2006/2007 (c). Letras distintas indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

En cuanto al análisis de la tasa fotosintética (TF, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) y conductancia estomática (g , $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) medidas al mediodía durante la temporada 2004/2005, la g de las plantas de ambos tratamientos no se diferenciaron significativamente, traduciéndose además tal comportamiento en las TF que para las plantas Control y con ABA tampoco variaron, aunque se observó que en el 58% de las determinaciones los valores absolutos de TF para las plantas con ABA fueron superiores, y alcanzaron significancia estadística al 90% durante la medición del 7 de enero de ese año (Figura 12a).

En concordancia con los resultados del año anterior, en 2005/2006 las plantas de los 3 tratamientos asperjados con ABA mostraron la misma tendencia (mayores valores absolutos de TF comparadas con las Control) y expresaron diferencias estadísticamente significativas para el tratamiento ABA 1st durante el mes de Enero, cerca de la fecha de envero y momento en que las condiciones ambientales fueron mas extremas para el cultivo y una de las mas importantes etapas fenológicas estaba en proceso (Figura 12b). En función a estos resultados es posible que el mejor estado hídrico tanto de fuentes como de destinos mejorara el transporte de fotoasimilados y activara así indirectamente la actividad fotosintética. En cuanto a las g para esta temporada, se observó que estas fueron similares en la mayoría de las determinaciones y alcanzaron diferencias significativas en favor del tratamiento ABA 2nd respecto al Control para el 19 de enero y el 10 de febrero, sin traducirse tal condición en mejores TF para las plantas.

Durante la última temporada de estudio (2006/2007) se reitera el comportamiento en las plantas asperjadas con ABA de una tendencia superior en los valores de TF, aunque para este año tales variaciones fueron las menores registradas durante los tres años de estudio entre los tratamientos hormonales y el Control y sólo para el 6 de marzo fueron significativas en favor de ABA 1st. En cuanto a las g para este año si bien en varias de las fechas el Control tiene mayores valores que las plantas con ABA, sólo en dos de las ocho fechas alcanza a diferenciarse significativamente de alguno o todos los tratamientos con ABA (Figura 13c). Resultan interesantes estos resultados ya que si bien el Control para el 2 y 12 de febrero tiene las mayores g respecto a

las plantas con ABA, esta condición no alcanzaría para mejorar su fotosíntesis, por lo que volvería a tener sustento la hipótesis de que aún con los estomas más cerrados las plantas tratadas con ABA son igual o mas eficientes que el Control para realizar fotosíntesis (Figuras 13c y 12c).

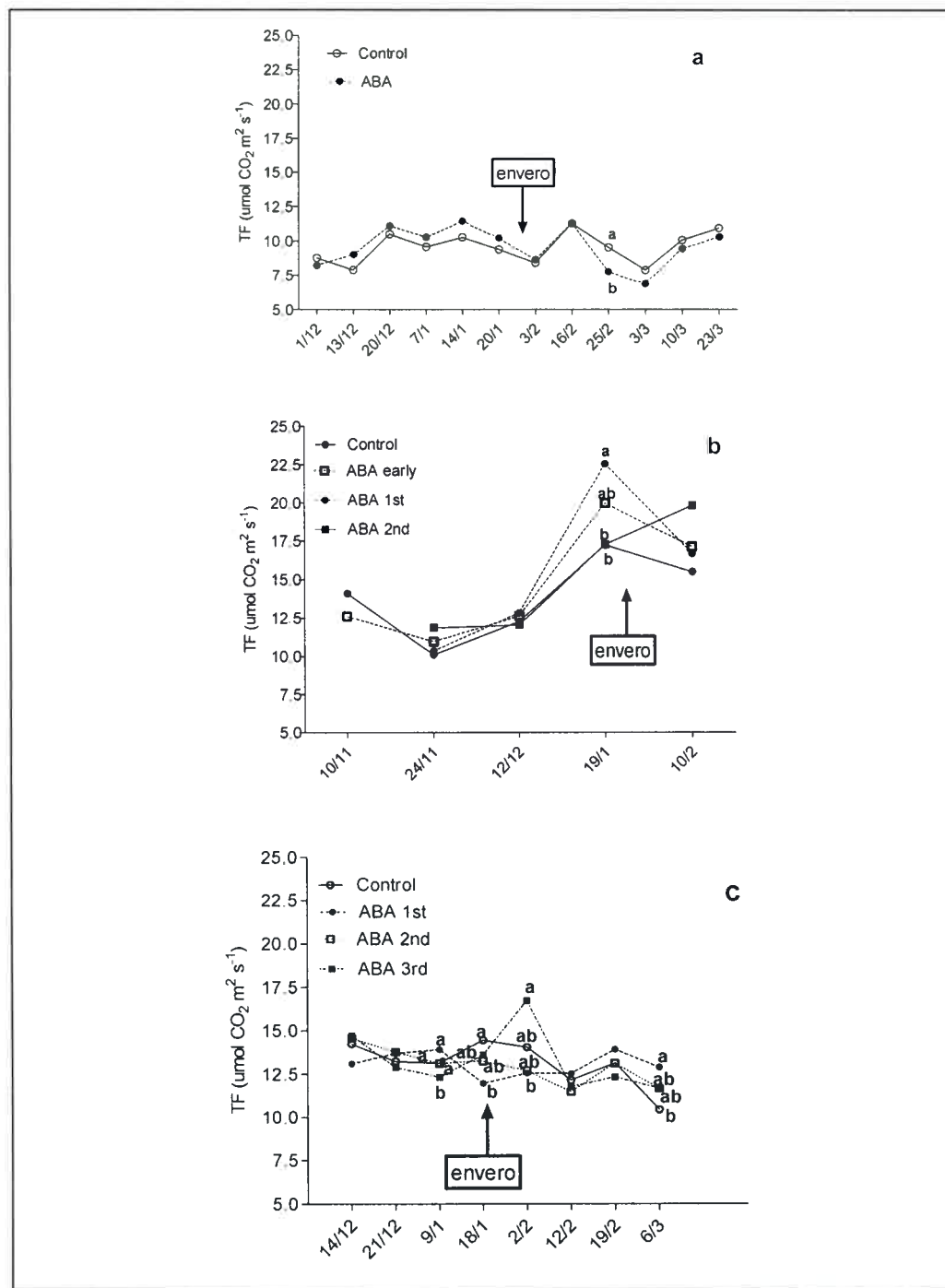


Figura 12. Tasa fotosintética mediodía (TF, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) de plantas de vid (ver Materiales y Métodos por detalles), para las temporadas 2004/2005 (a), 2005/2006 (b) y 2006/2007 (c). Letras distintas indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

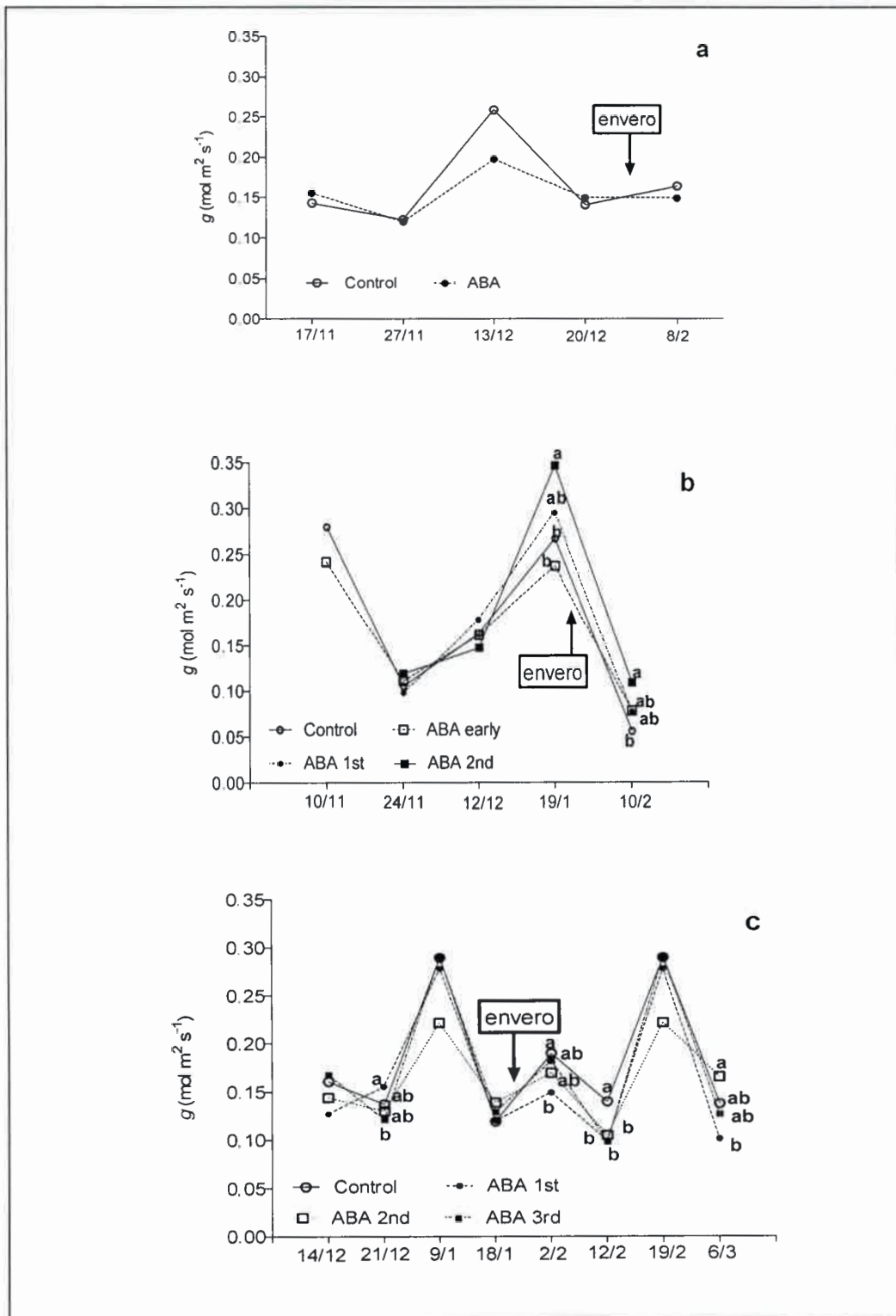


Figura 13. Conductancia estomática (g , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en plantas de vid (ver Materiales y Métodos por detalles), para las temporadas 2004/2005 (a), 2005/2006 (b) y 2006/2007 (c). Letras diferentes indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

La Tabla 1 muestra los parámetros de rendimiento para los tres años del estudio. Los tratamientos con ABA fueron efectivos en incrementar las medidas de kg de uva por planta, con significancia estadística para ABA (2004/2005), ABA 1st y ABA 2nd (2005/2006), y ABA 3rd (2006/2007). El resto de los tratamientos con ABA también mostraron aumentos respecto a los Controles, aunque las diferencias tienen una probabilidad menor al 95%. De igual modo hay una clara tendencia de ABA a incrementar rendimiento, en un rango entre el 48 al 103% de incremento de rendimiento para los datos significativos.

El número de bayas por racimo fue el componente del rendimiento que evidenció las mayores diferencias significativas y que determinó la performance de rendimiento de las plantas tratadas con ABA durante las tres temporadas. Más bayas por racimo determinaron incrementos en peso de racimo y kg por planta. El tamaño de las bayas, medidas como volumen o peso, no mostraron diferencias entre tratamientos.

Una consecuencia estimada de un incremento en el número de bayas por racimo podría ser una baja concentración de antocianinas y polifenoles, lo que determinaría una disminución de la calidad de las bayas para vinificación. Sin embargo los resultados graficados en la Figura 14 muestran los contenidos de antocianinas para los diferentes tratamientos para las tres temporadas, que no se vieron afectados negativamente o bien fueron levemente incrementados.

No existieron disminuciones en el contenido de antocianos para ninguno de ellos, es más en la temporada 2004/2005 se midieron significativos incrementos en los contenidos de antocianinas (Figura 14a). Los valores de índice de polifenoles totales no fueron diferentes para ninguno de los tratamientos en las tres temporadas (Figura 15).

Tabla 1. Parámetros de rendimiento en plantas de vid a campo años 2004/2005, 2005/2006 y 2006/2007.

Tratamiento	Kg por planta	Racimos por planta	Peso de Racimo (g)	Bayas por racimo	Peso de una baya (g)	Volumen de una baya (mL)
2004/2005						
Control	2.376 b	41.8 a	53.4 b	67.3 b	0.794 a	1.088 a
ABA	4.822 a	46.2 a	82.1 a	131.3 a	0.622 a	1.007 a
2005/2006						
Control	2.536 c	31.2 ab	81.5 b	86.2 b	0.97 a	1.16 a
ABA early	3.125 abc	34.5 ab	92.2 ab	98.2 b	1.04 a	1.13 a
ABA 1 st .	4.188 a	40.2 a	107.7 a	137.3 a	0.81 a	1.13 a
ABA 2 nd .	3.758 ab	39.2 ab	97.1 ab	120.4 ab	0.82 a	1.09 a
2006/2007						
Control	2.737 b	36.1 a	77.5 b	78.05 b	0.99 a	1.07 a
ABA 3 rd .	4.191 a	37.3 a	112.2 a	114.3 a	0.99 a	1.00 a
ABA 2 nd .	3.773 ab	41.3 a	92.2 ab	104.1 ab	0.88 a	1.05 a
ABA 1 st .	3.308 ab	36.1 a	93.1 ab	103.8 ab	0.90 a	0.94 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para $P \leq 0.05$ para la misma temporada.

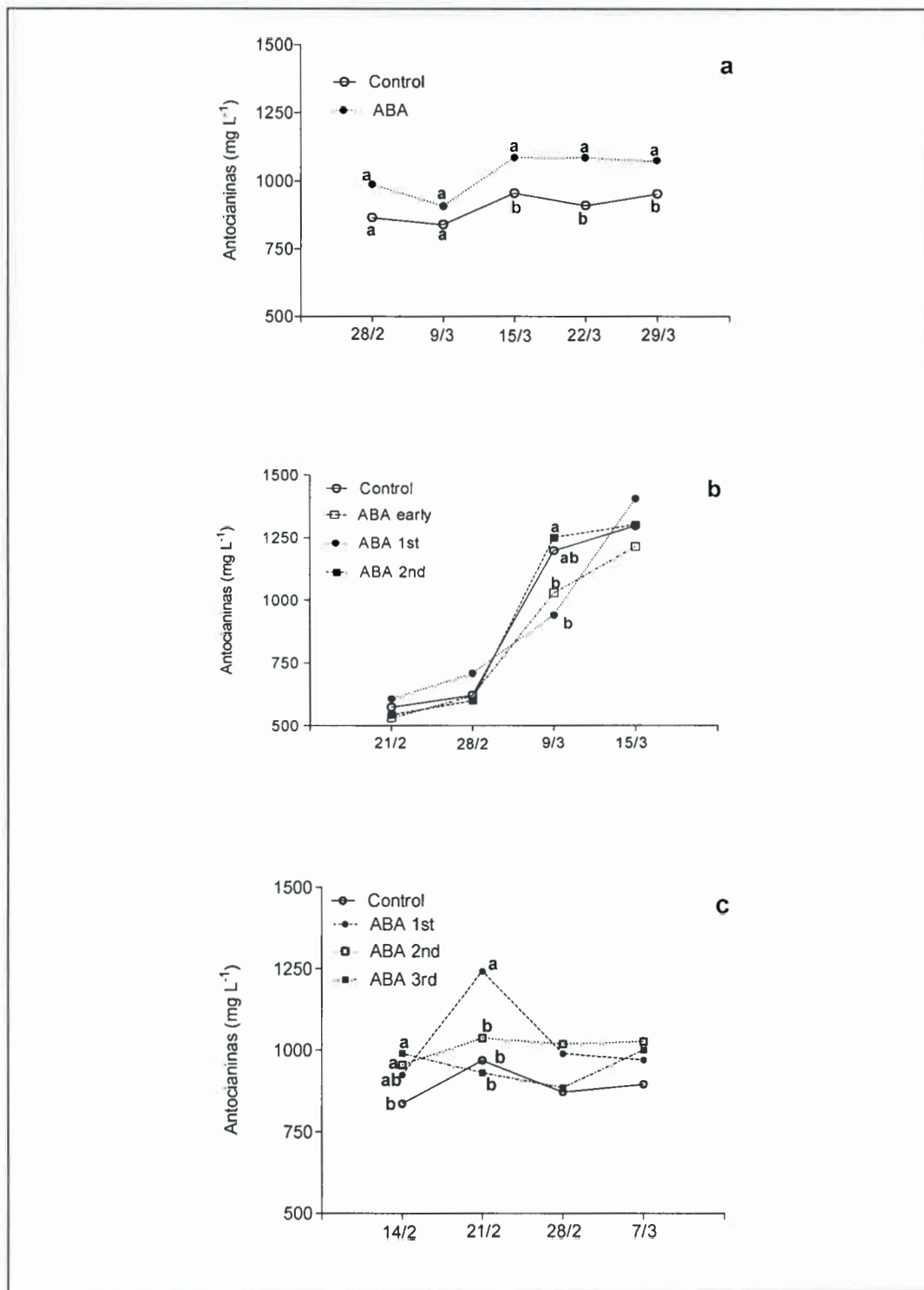


Figura 14. Contenido de Antocianinas según el método de Riou and Asselin (1996, ver Materiales y Métodos por detalles) en bayas desde envero hasta cosecha, para las temporadas 2004/2005 (a), 2005/2006 (b) y 2006/2007 (c). Letras distintas para la misma fecha indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

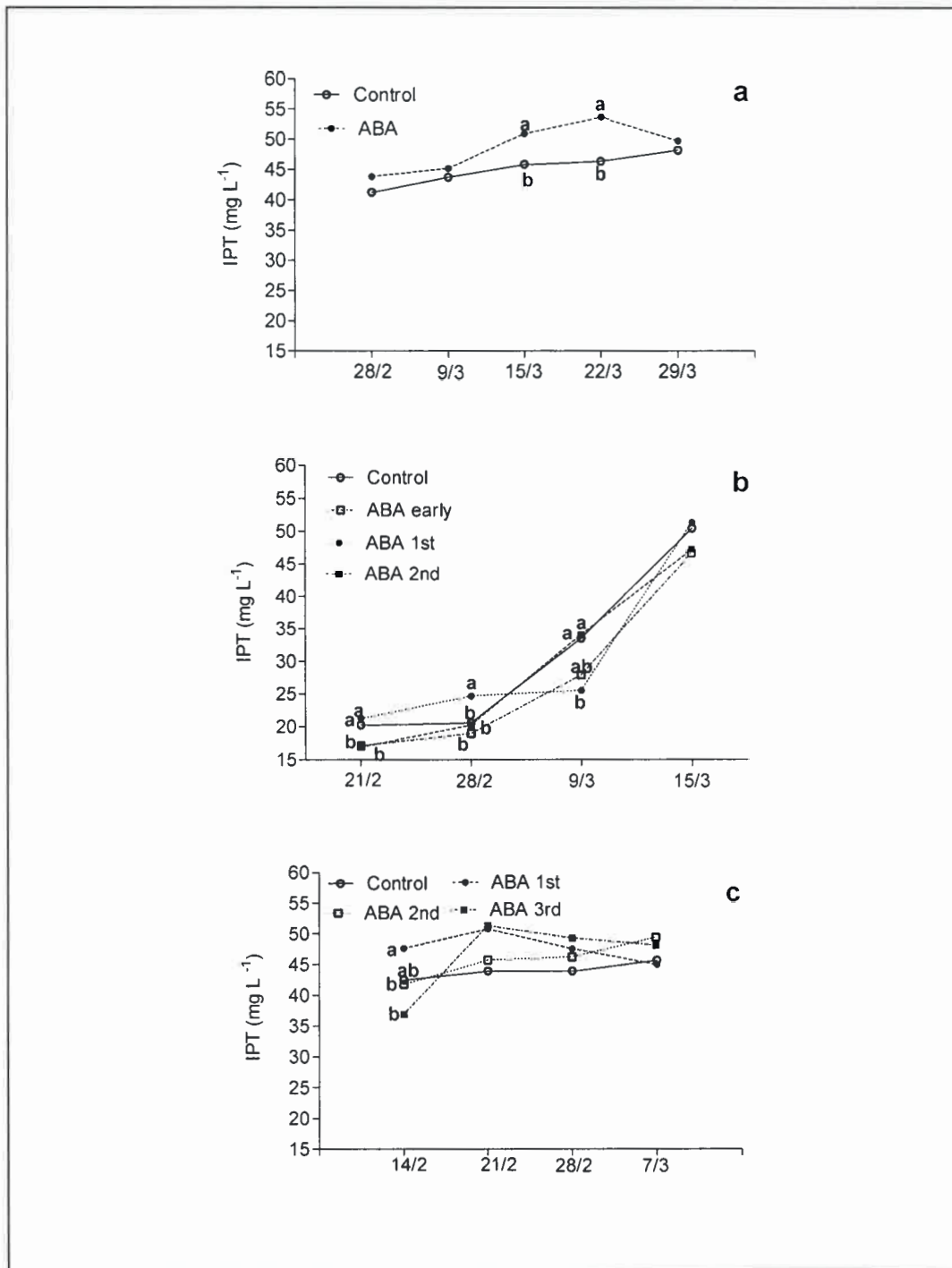


Figura 15. Índice de polifenoles totales (IPT) según el método de Riou and Asselin (1996, ver Materiales y Métodos por detalles) en bayas desde envero hasta cosecha, para las temporadas 2004/2005 (a), 2005/2006 (b) y 2006/2007 (c). Letras distintas para la misma fecha indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

Cuando se elaboro el vino a partir de las bayas cosechadas para las dos temporadas iniciales del ensayo (2004/2005 y 2005/2006), se observaron diferencias significativas en el contenido de antocianos en las vinificaciones del año 2004/2005 (tales diferencias fueron encontradas en las bayas y se trasladaron al vino). En cuanto al índice de polifenoles totales para ese año y el siguiente no existieron variaciones entre los tratamientos y en cuanto a los contenidos de antocianos para la temporada 2005/2006 tampoco se registraron diferencias entre las plantas Control y tratadas con ABA (Figuras 16a y b).

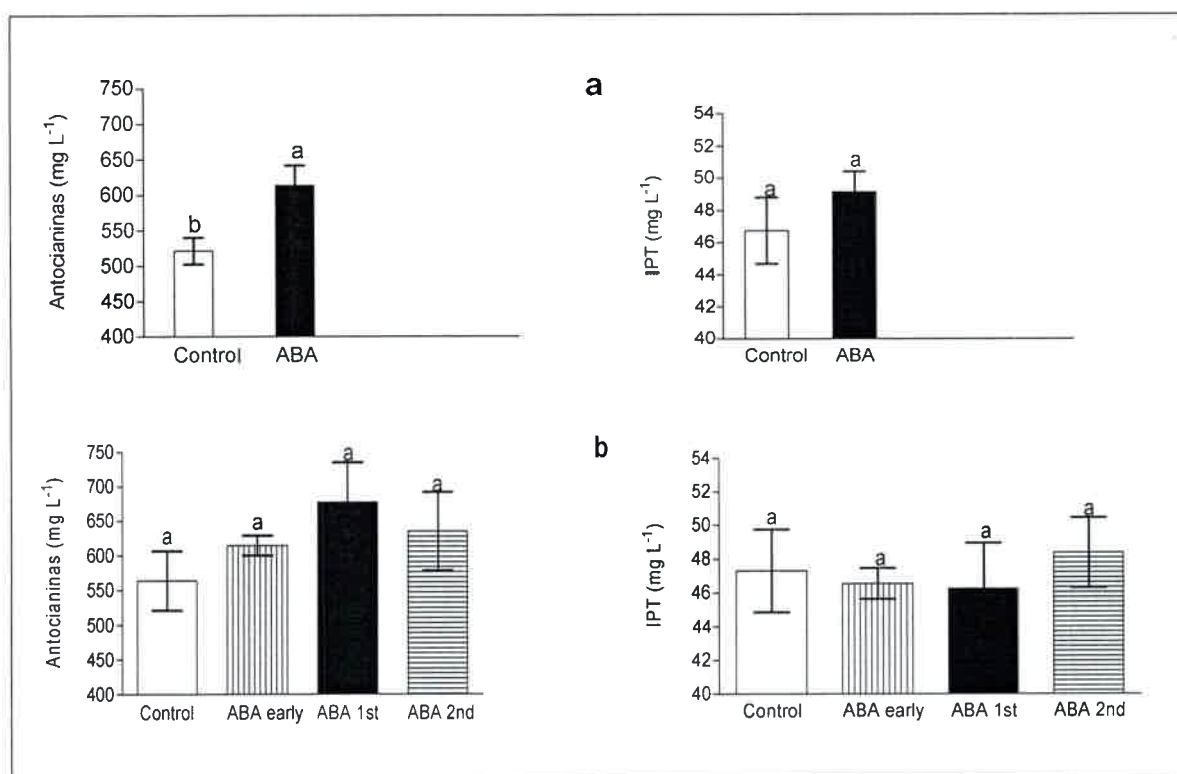


Figura 16. Contenido de antocianinas (izquierda) e índice de polifenoles totales (IPT, derecha) en vinos elaborados a partir de uvas cosechadas, para las temporadas 2004/2005 (a) y 2005/2006 (b). Letras distintas indican diferencias significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



CAPÍTULO III

**MECANISMOS DE ACCIÓN DE ÁCIDO
ABSCÍSICO Y 1-METILCICLOPROPENO EN
VIDES CULTIVADAS EN CONDICIONES DE
CAMPO**

CAPITULO III
MECANISMOS DE ACCION DE ÁCIDO ABSCÍSIICO Y 1-
METILCICLOPROPENO EN VIDES CULTIVADAS EN CONDICIONES DE
CAMPO

El crecimiento del fruto de la vid y su regulación

La mayoría de los cultivares de la vid son altamente floríferos y las inflorescencias se forman en la mayoría de los nudos del sarmiento (a excepción de Thompson seedles o Sultanina en la que los nudos basales del sarmiento son por lo general vegetativos). Según el cultivar, cada yema latente contiene hasta tres inflorescencias y cada inflorescencia puede contener miles de flores. De estas flores, 70 – 80% normalmente no llegan a desarrollar en frutos maduros; se marchitan y caen. El término “cuaje” se puede referir tanto al porcentaje de flores en una inflorescencia que se transforman en fruto (comúnmente 20 – 30%) como al proceso fisiológico que ocurre en los primeros estados del crecimiento del fruto (Williams et al., 1994).

En variedades con semilla, el crecimiento de la baya se inicia con la polinización y fecundación. Las flores que no son polinizadas, o que fallan al ser fecundadas, se marchitan y mueren. En las restantes, hay una reanudación de la división celular en el pericarpio y las bayas comienzan a crecer. No obstante, muchas de estas bayas desarrolladas son desprendidas durante las próximas dos o tres semanas por procesos de abscisión. Entre ellas hay bayas que han sido polinizadas adecuadamente y fecundadas y que se encontraban en activo crecimiento. El cuaje en la vid el cuaje se completa en dos o tres semanas desde la anthesis y el fruto que permanece desarrollará normalmente hasta la madurez. No existen por otra parte períodos bien definidos de abscisión de frutos, tal como ocurre en las pomáceas sino que la abscisión de las bayas puede ocurrir como resultado de condiciones ambientales desfavorables tales como el estrés hídrico (Mullins et al., 1992).

En resumen, los procesos que constituyen el cuaje son 1) reanudación de la división celular en el pericarpio, y 2) prevención de la activación de una capa de abscisión en la base del pedicelo. Estos procesos a su vez parecen

estar controlados independientemente. La caída de frutos en activo crecimiento, y de bayas inmaduras se pueden reanudar en un racimo sin completar su normal desarrollo y crecimiento. Esto es característico del desorden conocido como "corrimiento".

La estimulación del cuaje es un medio disponible de aumentar la producción, y ha inspirado el desarrollo de muchas investigaciones sobre el uso de reguladores de crecimiento en viticultura (Considine, 1983). Con relación a la regulación endógena, los conceptos actuales no son muy diferentes a los de 20 años atrás (Mullins, 1967; Bottrill et al., 1970; Coombe, 1973). El cuaje esta sujeto a cada grupo principal de sustancias de crecimiento naturales; hay reportes de promoción del cuaje por aplicación de auxinas, citocininas, giberelinas y diversos retardantes del crecimiento. Existen interacciones de genotipo, ambiente y reguladores de crecimiento que hacen difícil atribuir roles específicos a compuestos individuales. Una hipótesis unificada es que las sustancias de crecimiento, endógenas o exógenas, influyen en el cuaje mediante efectos sobre la partición de nutrientes orgánicos (Coombe, 1973). Esto es consistente con la promoción del cuaje mediante el pellizco, despunte o remoción de hojuelas, que son tratamientos que reducen el los números de sumideros en competencia (Paleg, 1962). La promoción del cuaje mediante diversos metabolitos esta también de acuerdo con el fenómeno de transporte hormonal directo en el cual se supone que las hormonas originadas en las semillas o pericarpio dirigen la importación de nutrientes de otras partes de la planta.

La evidencia disponible soporta el punto de vista que el cuaje en la vid esta sujeto a un control correlativo. Es posible en uvas de Cabernet Sauvignon alcanzar un aumento sustancial en el cuaje a proveer condiciones ideales para la polinización y fecundación y al reducir el número de sumideros en competencia, pero no ha sido posible hasta ahora obtener un nivel de cuaje que exceda el 65%. Aún bajo las circunstancias más favorables hay una pérdida considerable de flores aparentemente funcionales, y ello sugiere que puede haber diferencias en el potencial de las flores a ser transformadas en frutos. De acuerdo a Luckwill (1957) el desarrollo del fruto comienza en el

momento de la formación del primordio de gineceo y los factores que operan durante la etapa de diferenciación floral pueden predeterminar, en mayor o menor medida, la capacidad de las flores de transformarse en bayas.

En trabajos previos realizados en Mendoza en plantas de vid cv Cabernet Sauvignon se observó que aplicaciones de 250 ppm de Ácido Abscísico (ABA) sobre la canopia incrementaron los rendimientos y esto estaba directamente relacionado con un mayor número de bayas por racimo (Quiroga et al., 2009).

Biosíntesis y función de Etileno

El etileno, es una de las hormonas de estructura más simple, gaseoso, al ser un hidrocarburo, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Es una olefina con una estructura simple de dos átomos de carbono, que cumple con la función de ser un potente modulador del crecimiento y desarrollo de plantas (Ecker, 1995). Aunque se ha sabido desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta los años 1960s que se empezó a aceptar como una hormona vegetal. Esta relacionado con muchos aspectos del ciclo de vida de las plantas, incluyendo germinación de semillas, desarrollo de raíces y nodulación, senescencia de flores, abscisión y madurez de frutos (Johnson y Ecker, 1998). La producción de etileno es finamente regulada por señales internas durante el desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales desde estreses bióticos (por ej. ataque de patógenos) y abióticos, como heridas, hipoxia, ozono, bajas temperaturas o heladas (Wang et al., 2002).

Bioquímica y síntesis de etileno

La bioquímica de la biosíntesis de etileno ha sido objeto de intensos estudios en la fisiología de las hormonas en las plantas (Kende, 1993). La mayor dificultad en la ruta de síntesis de etileno fue determinar que la S-adenosilmetionina (S-AdoMet) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) son los precursores de etileno (Figura 17) (Yang y Hoffman, 1984). Sobre la base de estos conocimientos, las enzimas que catalizan estas

reacciones fueron caracterizados y purificados usando herramientas de la bioquímica. El primer acierto en el clonado molecular de genes que regulan la síntesis de ACC sintasa (ACS) (Sato y Theologis, 1989) y ACC oxidasa (ACO) (Hamilton et al., 1991; Spanu et al., 1991) llevaron a la demostración que estas enzimas pertenecen a una familia multigénica y son regulados por una compleja red de señales de desarrollo y ambientales que responden a estímulos internos y externos (Johnson y Ecker, 1998). El etileno deriva de los C3 y C4 de la metionina, que pasa, con gasto de ATP, a S-adenosilmetionina (SAM), por acción de una enzima pasa a ácido aminociclopropano- 1 carboxílico (ACC) y por oxidación de este y por la ACC oxidasa se forma etileno. Una característica de esta hormona es que posee acción autocatalítica, esto se debe a que la presencia de etileno activa la acción del gen que codifica la enzima que pasa de ACC a etileno.

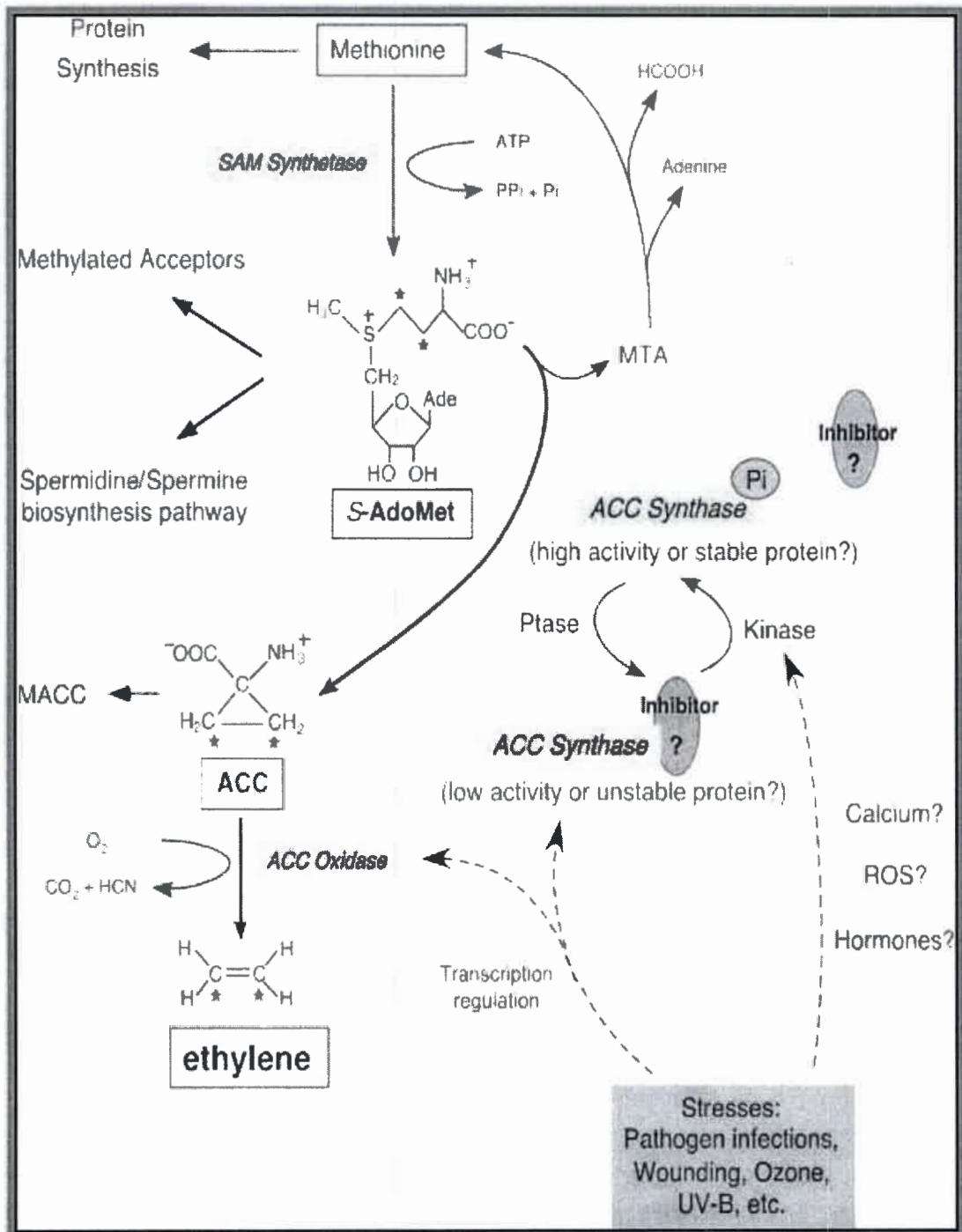


Figura 17. Ruta biosintética y regulación de etileno. Extraída de Wang et al., 2002.

Factores que afectan la biosíntesis de etileno

El etileno parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejido específico y su estado de crecimiento y desarrollo. Las tasas de síntesis varían desde rangos muy bajos (0.04-0.05 $\mu\text{l/kg-hr}$) en blueberries (*Vaccinium* sp.) a extremadamente elevadas (3.400 $\mu\text{l/kg-hr}$) en flores devanecientes de orquídeas *Vanda* (Azcon-Bieto y Talón, 2000).

Modo de acción

Su acción se da principalmente porque:

- * Se une a receptores del tipo proteico que reconocen moléculas pequeñas de doble ligadura
- * Deber ser una metalproteína que contiene CU o Zn
- * Los receptores de etileno son una de cuatro familias de proteínas kinasas de residuos de Histidina (His) encontrados en plantas (Hwang et al., 2002). Ellos son subdivididos en dos subfamilias (Schaller y Kieber, 2002). ETR1 y ERS1 conforman la primera subfamilia; estas dos proteínas tienen completa la conservación de motivos de la proteína His Kinasa y cada uno tiene tres dominios de membrana amino terminales. Los otros tres receptores (ERS2, EIN4 y ETR2) son parte de la segunda subfamilia, con cuatro dominios de membrana amino terminal transmembrana (Davies 2005b).
- * Actúan en la traducción y amplificación de la señal de la hormona, al unirse el etileno a sus receptores, se desencadenan las reacciones que llevan a la respuesta al etileno.
- * En general se observa un aumento en la síntesis de enzimas

Efectos Fisiológicos

En las plantas se encuentra relacionado con los siguientes procesos: maduración de frutos, senescencia de órganos, epinastia, tigmomorfogénesis o perturbación mecánica, hipertrofias, exudación de resinas, latex y gomas, promoción o inhibición de los cultivos de callos in Vitro, inhibición de la embriogénesis somática, apertura del gancho plumular, inducción de raíces,

inhibición del crecimiento longitudinal, incremento del diámetro caulinar (Azcon-Bieto y Talón, 2000).

Uso de 1-Metilciclopropeno como inhibidor específico de etileno

La posibilidad de controlar el proceso de madurez y extender la vida útil es un objetivo primario en la industria frutícola y una herramienta para ello, en frutos climatéricos es el uso de inhibidores de la acción de etileno. Afectar la transducción de señales desde el primer paso (por ejemplo los receptores) parece ser un camino altamente efectivo de modular las respuestas a etileno. La historia de la introducción del uso comercial de 1-Metilciclopropeno (1-MCP) está estrechamente relacionado con sus efectos benéficos en plantas ornamentales etileno-sensibles (Reid y Staby, 2007).

El 1-MCP es un gas a temperatura ambiente y presión atmosférica normal y se ha descrito como un inhibidor irreversible de los receptores de etileno, con una afinidad por los receptores diez veces mayor que el etileno (Blankenship y Dole, 2003). Se ha propuesto recientemente que prolonga la vida útil y retrasa la madurez en la etapa de poscosecha en frutas climatéricas (Sisler y Serek, 1997). Los efectos de la aplicación de 1-MCP en el desarrollo de los parámetros de madurez difieren en relación al número de factores endógenos y exógenos incluidos genotipo y etapa de madurez (Blankenship y Dole, 2003). Diferentes efectos del 1-MCP son particularmente evidentes cuando se comparan dos importantes cultivos como son la manzana y el durazno: la madurez es inhibida o retrasada por varios días y se prolonga el tiempo de almacenamiento en manzanas (Fan y Mattheis, 2002; Watkins et al., 2000; Jiang y Joyce, 2002; Bai et al., 2005). Por otro lado, 1-MCP parece tener efectos limitados en retardar lentamente la madurez de duraznos, en donde la producción de etileno no es inhibida (Mathooko et al., 2001; Fan et al., 2002; Ziliotto et al., 2003). Esta desigual respuesta del 1-MCP se debería en parte a diferencias en términos de tasa, patrones de expresión y/o *turn-over* de los receptores de etileno en estos dos cultivos (Dal Cin et al., 2006).

Etileno en vid

Hace algunos años atrás, en la década de 1970s, se pensaba que etileno tenía un rol muy limitado, si es que tenía alguno, en el proceso de madurez de frutos no climatéricos (Coombe y Hale 1973; Abeles et al., 1992). La clasificación de las uvas como frutos no climatéricos se debió mayormente a algunos datos que mostraban solo débiles cambios en los niveles de etileno en los momentos alrededor de la etapa de envero (Coombe y Hale 1973), una etapa del desarrollo en donde las bayas de vid comienzan a perder la acidez y a colorearse, en el caso de los cultivares tintos, entre otros cambios bioquímicos. De hecho, algunos autores (Coombe y Hale 1973; Alleweldt y Koch, 1977) encontraron que las cantidades endógenas de etileno producidas por las bayas fueron más pequeñas cuando se expresan como concentración por volumen de gas interno (menos que $0.5 \mu\text{l l}^{-1}$), pero cuando se expresa como la concentración por gramo de tejido, entonces se observa claramente un pico de etileno alrededor del momento de envero (Alleweldt y Koch, 1977).

En *Vitis vinífera* cv. Cabernet Sauvignon, Chervin et al. (2004) en ensayos a campo en los que utilizó 1-MCP como inhibidor de etileno confirmó el incremento de producción endógena de etileno durante el período de pre-envero que sería requerido en vid para al menos el incremento del diámetro, la disminución de la acidez y la acumulación de antocianinas durante la madurez de las bayas. En base a estos resultados se podría considerar que las uvas tienen una red funcional de señalización de etileno en los inicios de la maduración, y parte de este complejo es necesario para el proceso de madurez.

Estudios recientes de diversos laboratorios han enfocado sus investigaciones en la evaluación de la especificidad de la hormona etileno y su extensa integración de señales hormonales y *crosstalk* a lo largo del período de crecimiento vegetal regulado por hormonas (Achard et al., 2003, 2006; Fu y Harberd, 2003; Gazzarrini y McCourt, 2003; Nakamura et al., 2006; Halliday, 2004; Rolland y Sheen, 2005).

Se ha visto que los tratamientos hormonales disparan diversos efectos sobre el metabolismo hormonal. Hay una amplia evidencia también de que los

genes que regulan una hormona están envueltos en el metabolismo de otra hormona. Este fenómeno ha sido sugerido y está particularmente bien documentado para la producción de etileno debido a tratamientos con ácido indol acético (AIA) (Alonso y Ecker, 2001), ACC sintasa (ACS) que cataliza la tasa de la biosíntesis de etileno y varias hormonas en donde se ha demostrado que afectan los niveles de los genes ACS (Wang et al., 2002). En estudios realizados por el grupo de investigación de Joanne Chory (Nemhauser et al., 2006) se vio que genes de la cascada de señales de etileno fueron regulados positiva y negativamente por la hormona ABA. Por lo tanto la compleja red de tales interacciones sugieren que los efectos a largo tiempo de todos los tratamientos con hormonas tendrían un “efecto dominó”, replanteando muchos de los sistemas dentro de la planta.

Teniendo en cuenta estos aspectos antes mencionados relacionados al *crosstalk* entre hormonas y en función a los resultados expuestos en el Capítulo II de esta tesis, surge una hipótesis derivada relacionada con que ABA en alguna medida podría tener influencia sobre la acción/síntesis de etileno y esto encontrarse relacionado con la persistencia de bayas en el racimo de vid cv. Cabernet Sauvignon. Por lo que el objeto de lo expuesto en el presente Capítulo III busca solventar o desestimar dicha hipótesis.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Consideraciones generales

El ensayo se realizó en un viñedo de la cultivar Cabernet Sauvignon, de 12 años conducido en espaldero alto y podado en cordón bilateral ubicado en la finca "San Antonio" de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo en el departamento de Lujan de Cuyo, provincia de Mendoza, Argentina ($33^{\circ} 0' 37.38''$ latitud sur, $68^{\circ} 52' 37.69''$ longitud oeste, 920 m sobre el nivel del mar).



Figura 7. Foto satelital donde se muestra en detalle la ubicación de la parcela experimental establecida en la Finca San Antonio de la Facultad de Ciencias Agrarias (Fuente: GoogleEarth 2007).



La parcela experimental se ubicó en un sector seleccionado por homogeneidad de plantas (elegidas en función a la altura y tamaño del tronco) en la zona central de cada hilera para disminuir las diferencias o errores por el tipo de riego.

Las plantas, conducidas en espaldera con una distancia de plantación de 1,5 m entre plantas y 2,2 m entre hileras, fueron regadas gravitacionalmente por surcos, con desagüe al pie con una frecuencia semanal. Todas las plantas monitoreadas están distribuidas en 3 hileras con orientación Norte – Sur y se encuentran protegidas con malla antigranizo para evitar los daños que se pudieran ocasionar durante los meses de verano.

Los tratamientos fueron sorteados y se identificó cada planta al pie un cartel indicador de madera.

Diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques completamente aleatorizados y la unidad experimental de 2 plantas en cada uno de los bloques (repeticiones). La toma de datos se realizó sobre la cara Este de las plantas y se estableció que las mediciones no destructivas se realizarían en la planta Norte. La planta Sur se utilizó para las mediciones destructivas.

Tratamientos

Para la presente temporada se plantearon los siguientes tratamientos:

- 1) Control
- 2) MCP 1 (1-MCP 100 ppm): una única aplicación al momento de floración plena.
- 3) MCP 6 (1-MCP 100 ppm): 6 aplicaciones con régimen semanal iniciando desde el momento de floración plena.
- 4) ABA 50, (ABA 50 ppm): aplicaciones semanales desde floración plena hasta cosecha (temporada completa)

5) ABA 250, (ABA 250 ppm): 6 aplicaciones con régimen semanal iniciando desde el momento de floración plena.

6) ABA 250 TC, (ABA 250 ppm): aplicaciones semanales desde floración plena hasta cosecha (temporada completa).

La distribución de los tratamientos en la parcela experimental se realizó según el diseño que muestra la Figura 18.

Las soluciones de aspersión se distribuyeron exclusivamente sobre los racimos hasta goteo (200 mL/planta) con soluciones que en el caso del Control estaban compuestas por: agua destilada, Triton X100 0.1% como tensioactivo y etanol 0.1%. Para el caso de los tratamientos con ABA las soluciones estaban compuestas por: agua destilada, ABA (en distintas concentraciones), Triton X100 0.1% como tensioactivo y etanol 0.1% como disolvente de la hormona utilizando en estos casos para su traslado a campo bidones opacos. Para minimizar la degradación de ABA por UV-B y asegurar la incorporación del producto las aplicaciones se hicieron al crepúsculo.

Considerando que 1-MCP a presión normal y temperatura ambiente es un gas la solución de aplicación se preparó en el campo para aplicar inmediatamente ya que una vez solubilizado el principio activo la velocidad de volatilización del producto es muy rápida. Para estas aplicaciones también se tuvo en cuenta que 1-MCP es sensible a las altas temperaturas por lo que se hicieron a primera hora de la mañana una vez que superado el punto de rocío. Las soluciones se prepararon en aspersores de 800 mL de la siguiente manera:

- 1) Agua destilada 70%,
- 2) Aceite 1%,
- 3) Agua destilada 30%,
- 4) 1-MCP 100 ppm
- 5) Silwet 0,05% (tensioactivo)

ABA 50	ABA 250 TC	1-MCP (1 Aplicación)	BLOQUE 6
ABA 50	ABA 250 TC	1-MCP (1 Aplicación)	
1- MCP (6 Aplicaciones)	CONTROL		
1- MCP (6 Aplicaciones)	CONTROL	ABA 250 (6 Aplicación)	
		ABA 250 (6 Aplicación)	
ABA 250 (6 Aplicación)	1-MCP (1 Aplicación)	ABA 250 TC	BLOQUE 5
ABA 250 (6 Aplicación)	1-MCP (1 Aplicación)	ABA 250 TC	
	1- MCP (6 Aplicaciones)		
ABA 50	1- MCP (6 Aplicaciones)	CONTROL	
ABA 50		CONTROL	
ABA 250 TC	ABA 50	1-MCP (1 Aplicación)	BLOQUE 4
ABA 250 TC	ABA 50	1-MCP (1 Aplicación)	
	ABA 250 (6 Aplicaciones)	1- MCP (6 Aplicaciones)	
CONTROL	ABA 250 (6 Aplicaciones)	1- MCP (6 Aplicaciones)	
CONTROL			
ABA 250 (6 Aplicaciones)	ABA 250 TC	1-MCP (1 Aplicación)	BLOQUE 3
ABA 250 (6 Aplicaciones)		1-MCP (1 Aplicación)	
ABA 50	CONTROL		
ABA 50	CONTROL	1- MCP (6 Aplicaciones)	
ABA 250 TC		1- MCP (6 Aplicaciones)	
CONTROL	1- MCP (6 Aplicaciones)	1-MCP (1 Aplicación)	BLOQUE 2
CONTROL	1- MCP (6 Aplicaciones)	1-MCP (1 Aplicación)	
	ABA 50		
ABA 250 (6 Aplicaciones)	ABA 50	ABA 250 TC	
ABA 250 (6 Aplicaciones)		ABA 250 TC	
ABA 250 TC	1-MCP (1 Aplicación)	ABA 250 (6 Aplicaciones)	BLOQUE 1
ABA 250 TC		ABA 250 (6 Aplicaciones)	
1-MCP (1 Aplicación)	ABA 50		
1- MCP (6 Aplicaciones)	ABA 50	CONTROL	
1- MCP (6 Aplicaciones)		CONTROL	

Figura 18. Distribución de los distintos tratamientos en la parcela experimental.

Mediciones realizadas en campo y laboratorio

Desde el momento de envero (50 % de las plantas con esta condición) y hasta cosecha se determinó semanalmente en bayas:

- 1) **Concentración de sólidos solubles (°Brix)** en bayas mediante un refractómetro digital portátil, rango de medición de 0.0-53.0 °Brix, precisión de 0.1 Brix (Pocket Refractometer PAL-1.ATAGO).
- 2) **Volumen de las bayas** mediante probetas graduadas con agua, midiendo el volumen de agua desplazada por las bayas al introducirlas en la probeta.
- 3) **Peso fresco (PF)** de las bayas mediante una balanza analítica, precisión de 0.001 g (SCALTEC).
- 4) Contenido de **antocianos** en los hollejos de las bayas, mediante un espectrofotómetro UV-Visible-NIR (Cary50/WinUV-VARIAN), siguiendo la técnica descrita por Riou y Asselin (1996), la cual es una modificación de la técnica de Puissant-Léon.
- 5) **Índice de polifenoles totales (IPT)** en los hollejos de las bayas, mediante un espectrofotómetro UV-Visible-NIR (Cary50/WinUV-VARIAN), siguiendo la técnica descrita por Riou y Asselin (1996), la cual es una modificación de la técnica de Puissant-Léon.

El momento en el que las bayas alcanzaron el grado de madurez óptimo para el cultivar (23-24 °Brix) se estableció como momento de cosecha (27 de Marzo de 2008). La misma se realizó en todas las plantas del ensayo, pero para la confección de los datos de rendimiento ($\text{kg uva.planta}^{-1}$) solo se tienen en cuenta aquellos que provienen de las plantas Norte, donde no se realizó extracción de material durante la temporada. En esta etapa se midió:

- 1) contenido de sólidos solubles, 2) evolución de antocianos e IPT, 3) $\text{kg uva.planta}^{-1}$, 4) n° de racimos. planta^{-1} , 5) peso de racimos, 6) n° de bayas. racimo^{-1} , 7) peso fresco de bayas, 8) volumen de bayas.

Determinaciones a cosecha

El momento en el que las bayas alcanzaron el grado de madurez óptimo para el cultivar (23-24 °Brix) se estableció como momento de cosecha. La misma se realizó en todas las plantas del ensayo, pero para el dato de rendimiento (kg uva planta) solo se tiene en cuenta aquel que proviene de las plantas en las que se realizaron los análisis no destructivos (planta Norte). En esta etapa se midió: kg uva. planta⁻¹, n° de racimos.planta⁻¹, peso de racimos, n° de bayas.racimo⁻¹, peso fresco de bayas, volumen de bayas y contenido de sólidos solubles.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) considerando a los tratamientos y los bloques como factores principales usando el programa STATGRAPHICS PLUS 5.1. Se utilizó el Test de Fisher's (LSD) para discriminar entre las medias por la mínima diferencia ($P \leq 0.05$). Para la confección de los gráficos se utilizó el programa GRAPHPAD Prisma 5.1.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se detallan los rendimientos registrados durante la temporada 2007/2008, donde los mayores kg de uva planta se obtuvieron en los tratamientos MCP 6, MCP 1 y ABA 250 TC que alcanzaron diferencias significativas respecto al Control. En el caso del tratamiento MCP 6 dichas diferencias se explican por un mayor número de bayas por racimo que determinan un mayor peso de racimo que en ambos casos se diferencian estadísticamente frente al Control. Tal incremento del rendimiento responde en los tratamientos MCP 1 y ABA 250 TC a un aumento respecto al Control de dos de los componentes principales del rendimiento en vid en el número de bayas y el peso de los racimos, con diferencias significativas al 90% para el caso del tratamiento con ABA.

Tabla 2. Parámetros de rendimiento a cosecha año 2007/2008. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$. LSD test).

Tratamientos	Kg por planta	Racimos por planta	Peso racimo (g)	Bayas por racimo	Peso baya (g)	Volumen baya (mL)
Control	1,57 b	29,2 a	54,1 b	65,6 b	0,96 a	1,18 a
MCP 1	2,11 a	32,5 a	64,7 ab	66,9 b	0,98 a	0,98 ab
MCP 6	2,33 a	30,3 a	77,5 a	85,2 a	0,94 a	0,91 b
ABA 50	1,91 ab	29 a	66,5 ab	67,1 b	0,99 a	0,93 b
ABA 250	1,75 ab	29,5 a	60,9 ab	75,7 ab	0,80 a	0,77 b
ABA 250 TC	2,01 a	31 a	65,4 ab	76,6 ab	0,85 a	0,77 b

En cuanto a la evolución del contenido sacarino en bayas durante la temporada de estudio en la Figura 19 se observa que a cosecha el tratamiento MCP 6 alcanzó los mayores valores de °Brix pero sólo se diferenció estadísticamente de ABA 50. Además se observa que si bien durante las 3 fechas anteriores a cosecha existieron diferencias significativas entre las bayas de MCP 6 y MCP 1 y ABA 250, estas diferencias no se mantuvieron a cosecha. En este período tampoco existieron diferencias entre los tratamientos Control y asperjados con ABA; ni entre el Control y los tratados con MCP.

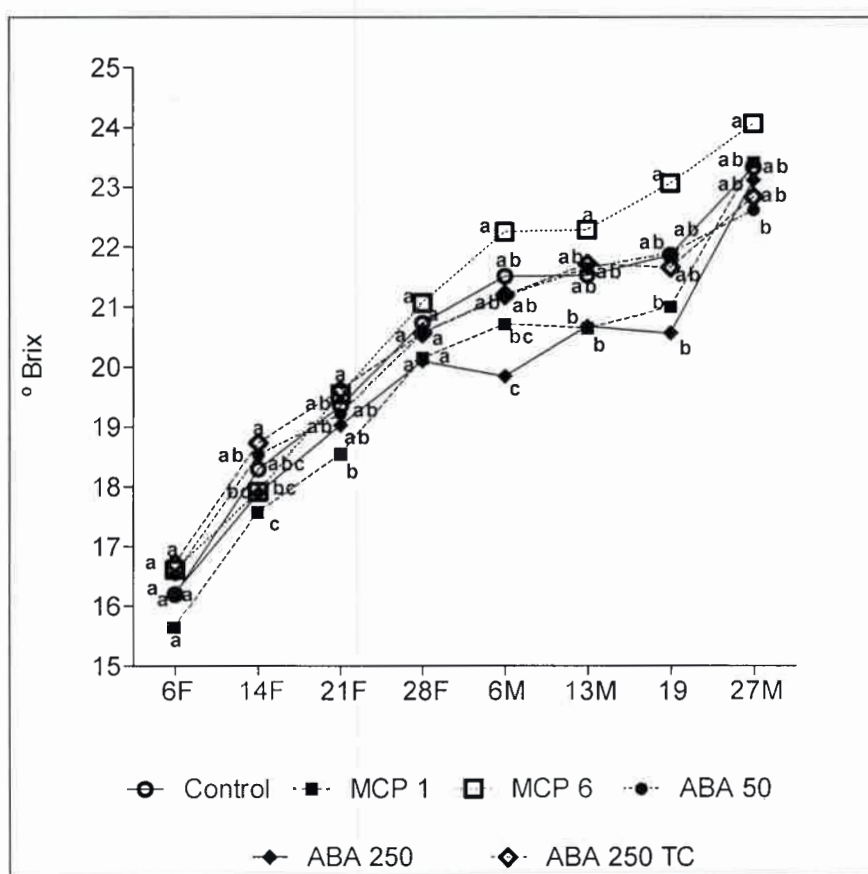


Figura 19. Evolución del contenido sacarino en bayas de vid cv Cabernet Sauvignon año 2007/2008. Letras distintas en la misma fecha indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$, LSD test).

En cuanto a los parámetros de calidad a cosecha medidos como antocianos e IPT se observa que el momento óptimo o máximo en cuanto a

estos índices no coincide con el momento óptimo de cosecha en función al contenido de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), sino que el pico máximo de polifenoles se produce 2 semanas previas a la cosecha (Figuras 20 y 21).

El tratamiento ABA 250 TC manifestó durante toda la etapa de madurez y a cosecha los mayores contenidos de antocianos con diferencias estadísticamente significativas respecto al Control, los tratamientos con MCP y el resto de los tratamientos con ABA.

Del mismo modo los valores de IPT de ABA 250 TC fueron significativamente superiores durante toda la madurez y a cosecha respecto al Control. También existieron diferencias significativas entre este tratamiento y los de MCP, ABA 50 y ABA 250 al momento de cosecha y en el resto de las fechas medidas exceptuando la medición del 14 de febrero (Figuras 20 y 21).

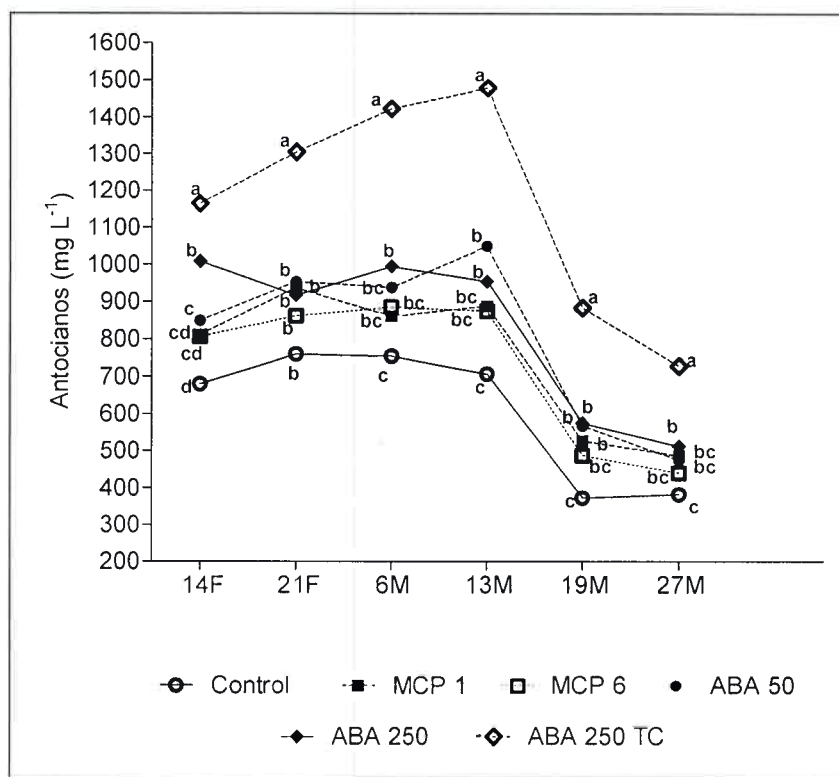


Figura 20. Evolución del contenido de antocianos en bayas de vid cv Cabernet Sauvignon año 2007-2008. Letras distintas en la misma fecha indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$. LSD test).

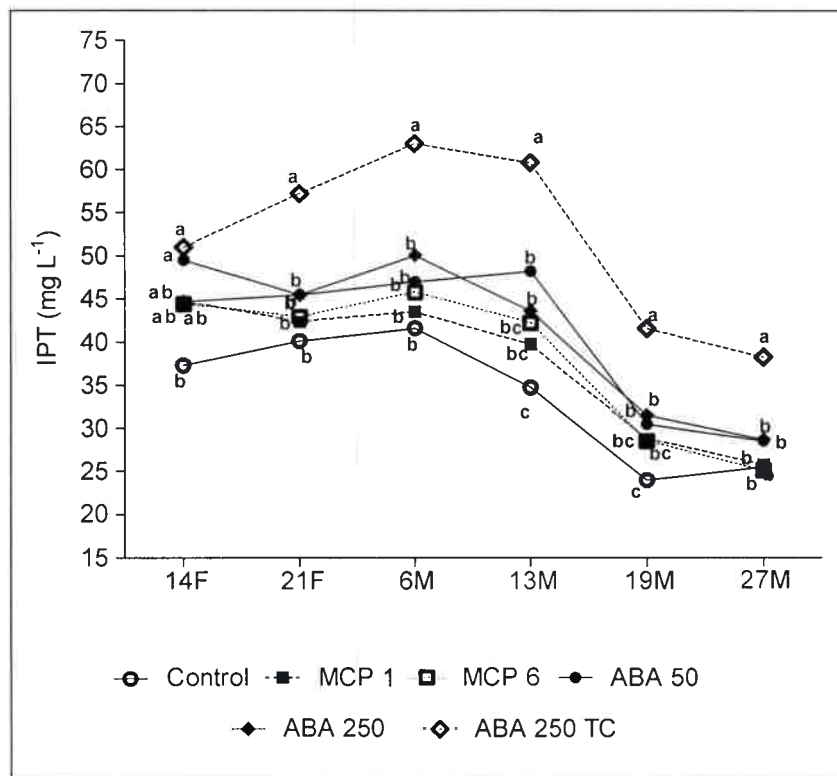


Figura 21. Evolución del contenido de IPT en bayas de vid cv Cabernet Sauvignon año 2007/2008. Letras distintas en la misma fecha indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$. LSD test).

Si bien estos resultados permitirían obtener conclusiones generalizadas y podrían sugerir que el mayor establecimiento de bayas por ABA opera, al menos parcialmente, inhibiendo acción y/o síntesis de etileno, estudios más detallados a nivel metabólico son necesarios para afirmar dicha hipótesis. Lo que sí es posible destacar es que ABA además de los posibles efectos sobre el establecimiento de bayas tendría además efectos bioquímicos adicionales sobre el metabolismo de antocianos y polifenoles.

En función a este último aspecto destacado y a los resultados obtenidos durante tres años consecutivos a este análisis (Capítulo II), obtener un perfil polifenólico que permita identificar individualmente aquellos polifenoles que podían ser metabólicamente influenciados resulta interesante. Por ello el análisis de los distintos compuestos fenólicos (perfil de compuestos fenólicos)

mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se realizó con muestras extraídas para el momento de cosecha durante la presente temporada (para detalles de técnica de procesamiento de muestras ver Materiales y Métodos-Capítulo IV).

Al analizar el perfil polifenólico de bayas colectadas al momento de cosecha mediante GC-MS se evaluó la presencia/ausencia de los siguientes 7 polifenoles: ácido gálico, malvidina, quercetina, catequina, resveratrol, ácido cafeico y ácido cinámico. Como se observa la Tabla 3 solo detalla las concentraciones de aquellos metabolitos que pudieron ser detectados y cuantificados en las muestras analizadas.

Tabla 3. Contenidos de quercetina, resveratrol y ácido cinámico en hollejos de bayas determinados mediante GCMS. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

Tratamientos	Quercetina (mg / g hollejo)	Resveratrol (mg / g hollejo)	Ácido Cinámico (mg / g hollejo)
Control	1,99 <i>f</i>	0,79 <i>e</i>	1,31 <i>c</i>
MCP 1	4,11 <i>d</i>	0,79 <i>e</i>	0,75 <i>c</i>
MCP 6	3,38 <i>e</i>	1,31 <i>a</i>	1,37 <i>a</i>
ABA 50	4,95 <i>c</i>	0,81 <i>d</i>	1,01 <i>d</i>
ABA 250	5,88 <i>b</i>	0,88 <i>c</i>	1,01 <i>d</i>
ABA 250 TC	8,01 <i>a</i>	0,97 <i>b</i>	1,35 <i>b</i>

Los resultados expuestos con esta metodología corroboran lo indicado por el método espectrofotométrico de análisis de fenoles graficados en las Figuras 20 y 21 en donde se observa que todos los tratamientos con ABA incrementan los contenidos en polifenoles y particularmente por GC-MS se pudo establecer que se diferencian significativamente del Control respecto a quercetina y resveratrol; ampliando estas diferencias se destaca el tratamiento ABA 250 TC que se diferenció del Control no solo para los mencionados fenoles sino que también para ácido cinámico. En cuanto a los tratamientos con

1-MCP si bien los contenidos de polifenoles totales determinados por espectrofotómetro no indicaron diferencias entre las plantas con 1 o 6 aplicaciones del regulador respecto al Control, los análisis de GC-MS indican que el tratamiento MCP 6 supera significativamente al Control en cuanto a los contenidos de quercetina, resveratrol y ácido cinámico. Respecto a los tratamientos con ABA si bien en cuanto al índice de polifenoles totales los contenidos eran similares o en algunos casos inferiores (Figura 21), el análisis por GC-MS indica que MCP 6 en particular muestra contenidos mayores de resveratrol y ácido cinámico al momento de cosecha. Para el tratamiento MCP 1 las diferencias con el Control alcanzan a ser significativas analizadas al 95% sólo para quercetina; y en cuanto a la comparación con los tratamientos con ABA tiene menores contenidos de quercetina y resveratrol, mientras que en contenidos de ácido cinámico MCP 1 es superior solo para los tratamientos ABA 50 y ABA 250 al momento de cosecha.

1. Introduction

The following table shows the results of the experiment. The data indicates that the system is highly accurate and efficient. The results are consistent across different test cases, demonstrating the reliability of the method. Further analysis of the data points shows a strong correlation between the variables studied, suggesting a clear underlying mechanism at work. The overall performance is excellent, meeting the objectives of the study.

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DEL PERFIL POLIFENÓLICO DE PLANTAS TRATADAS CON ABA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

CAPÍTULO IV
DETERMINACION DEL PERFIL POLIFENOLICO DE PLANTAS TRATADAS
CON ABA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El vino es probablemente uno de los mas antiguos alimentos naturales, y es el resultado de un armonioso blend entre naturaleza, arte y ciencia (Pretorius y Hoj, 2005). La vid (*Vitis vinifera* L.) y el vino son una valiosa fuente de recursos nutracéuticos. Se ha demostrado que la relación observada entre el consumo de vino y los beneficios para la salud humana es atribuible a la fracción polifenólica de los vinos tintos (Iriti y Faoro, 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Los vinos son una fuente rica de polifenoles, incluidas las antocianinas, flavonoles y ácidos benzoicos. En estos últimos años los compuestos polifenólicos presentes en varios alimentos han sido el objeto de intensas investigaciones debido a sus beneficios potenciales para la salud humana. Las propiedades biológicas de aquellos alimentos funcionales y bebidas ricas en polifenoles son diversas, pudiendo mencionarse entre alguna de las características de estos farmaconutrientes a las antioxidantes (Soleas et al., 2002; Damianaki et al., 2000; Cook et al., 1995), antihipertensivas, cardioprotectoras (Iriti y Faoro, 2006), antiinflamatorias, bactericidas, antialérgicas, antimutagénicas y antitumorales (Williams y Iatropoulas, 1997; Psarra et al., 2002; De Beer et al., 2003).

La composición y concentración de los polifenoles en bayas y vinos son influenciados por diferentes factores incluyendo entre ellos la variedad de la uva, las condiciones edafoclimáticas y las prácticas culturales y tecnológicas (Gonzales-Sanjose et al., 1991; Stockley et al., 2005). Los compuestos polifenólicos son metabolitos muy importantes en vinos por diversas razones. Ellos contribuyen a las propiedades sensoriales del vino, y son responsables por el color de los vinos tintos, el flavour, la astringencia y los sabores amargos y son considerados como componentes esenciales durante la preservación del vino y su añejamiento (Glories, 1984; Robichaud y Noble, 1990).

Se ha demostrado que la acumulación de fenoles es incrementada por la hormona de las plantas, ácido abscísico (ABA) y suprimida por auxinas sintéticas, alta temperatura y baja intensidad de luz (Jeong et al., 2006; Cantos et al., 2000; Pezet et al., 2003). Además se ha visto también que la respuesta al tratamiento hormonal y de estrés sobre la síntesis y estabilidad de compuestos fenólicos es dependiente de la variedad y el terroir.

Tomando en consideración los beneficios sobre la salud humana y el impacto sobre la calidad del vino, un gran esfuerzo se ha llevado a cabo durante los últimos años para el desarrollo de métodos analíticos que resulten confiables, sensibles, robustos, versátiles y efectivos para la determinación simultánea de compuestos fenólicos en muestras de interés enológico.

La espectrometría UV-Vis posterior a la precipitación de estándares o los procedimientos de extracción por solventes es la técnica más usada en la determinación del contenido de fenoles totales en vino y baya. Tales análisis proveen una respuesta rápida y apropiada a los requerimientos de manufactura de los vinos, pero no es usada como una herramienta para identificar y cuantificar individualmente los compuestos fenólicos (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Vrhovsek et al., 2001).

Considerando que otros compuestos presentes en la matriz pueden contribuir a la absorbancia, estos métodos son caracterizados por una pobre especificidad. Por estos días, un número de métodos analíticos están disponibles para la determinación de fenoles de bayas y vinos incluyendo la Cromatografía gaseosa y líquida (GC, HPLC) y la Electroforesis Capilar (CE) (Burns et al., 2002; Herderich y Smith, 2005; Sáenz-Lopez et al., 2004; Castellari et al., 2002; Vitrae et al., 2002). Tales métodos son comúnmente usados para determinar cualitativamente y cuantitativamente fenoles individuales. Sin embargo, las últimas técnicas cromatográficas todavía producen resultados relativamente limitados y en muchos casos el análisis estructural permanece poco claro.

La cromatografía gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) ha facilitado ampliamente la identificación y cuantificación de fenoles en materiales biológicos (Dugo et al., 2001; Soleas y Goldberg, 1999; Karagiannis

et al., 2000; Spranger et al., 2004). Sin embargo, extensas metodologías de extracción de fase líquido-líquido o sólido (SPE) seguidas por procesos de derivatización son usualmente aplicados previos al análisis de GC-MS (Soleas et al., 1997).

En la espectrometría de masas se introduce una cantidad pequeña de un compuesto a un instrumento llamado espectrómetro de masas, donde se vaporiza y después se ioniza (de cada molécula se elimina un electrón). La ionización puede realizarse de varias maneras. En un método frecuente las moléculas vaporizadas se bombardean con un haz de electrones de alta energía. Se puede variar la energía del haz, pero suele ser de unos 70 electrones volts (1614 kcal/mol). Cuando el haz de electrones choca con una molécula, expulsa de ella un electrón y produce un ión molecular. Un ion molecular es un catión radical, una especie con un electrón no apareado y una carga positiva (Yurkanis Bruice, 2008).

En el bombardeo con electrones se inyecta tal cantidad de energía cinética a los iones moleculares que la mayor parte de ellos se rompen en cationes más pequeños, en radicales, en moléculas neutras y en otros cationes radicales. No es de sorprender que los enlaces que se rompen con más probabilidad sean los más débiles y los que causan la formación de los productos más estables. Todos los fragmentos con carga positiva de las moléculas se hacen pasar entre dos placas con carga negativa, que los aceleran y mandan al tubo analizador (Figura 22). Los fragmentos neutros no son atraídos a las placas con carga negativa y en consecuencia no se aceleran. Terminan por ser evacuados del espectrómetro. El tubo analizador esta rodeado por un electroimán cuyo campo magnético desvía los fragmentos con carga positiva y los hace tomar una trayectoria curva.

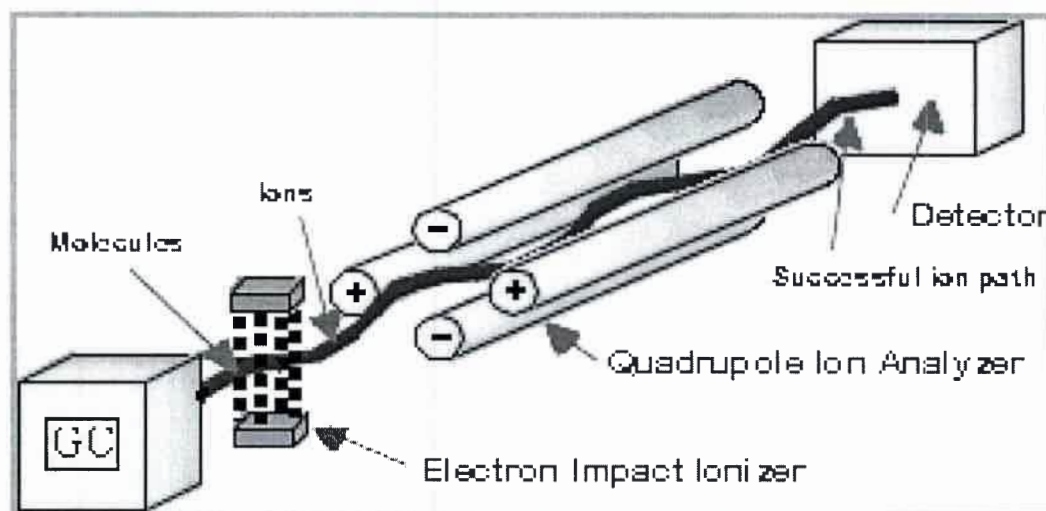


Figura 22. Esquema de un espectrómetro de masas

A determinada intensidad del campo magnético, el grado con el que se desvía la trayectoria depende de la relación de masa entre carga (m/z) del fragmento: la trayectoria de un fragmento con menor valor de m/z se desvía más que la de un fragmento de mayor masa. De esa forma se pueden separar las partículas con los mismos valores de m/z de todas las demás. Si la trayectoria de un fragmento coincide con la curvatura del tubo analizador, el fragmento pasará por el tubo y saldrá por la rendija de salida de iones. Un detector registra la cantidad relativa de fragmentos con determinada relación de m/z que pasan por la rendija. Mientras más estable es el fragmento, es más probable que llegue al detector sin seguirse rompiendo. La fuerza del campo magnético se incrementa en forma gradual para que los fragmentos con valores de m/z cada vez mayores sean guiados a través del tubo y salgan por la rendija de salida al detector.

El espectrómetro de masas registra un espectro de masas; es un espectro que muestra la abundancia relativa de cada fragmento, graficada en función de su valor de m/z . Debido a que la carga (z) de casi todos los fragmentos que llegan al detector es de +1, el valor de m/z es la masa molecular (m) del fragmento (Yurkanis Bruce, 2008).

En este capítulo se propone evaluar mediante la utilización de un método simple y rápido la determinación simultánea de importantes

compuestos fenólicos en bayas y vinos provenientes de plantas tratadas con ABA en condiciones de campo, con el objeto de evaluar el efecto de dicha hormona en la bioquímica de estos metabolitos. La etapa de extracción es mediada por ultrasonido. La metodología optimizada se aplicó en muestras de vides crecidas en condiciones de campo (cv. Cabernet Sauvignon) provenientes de un viñedo establecido en Mendoza. Los vinos analizados se han elaborado mediante microvinificaciones realizadas con tales bayas y el contenido individual en bayas y vinos fueron correlacionados con tratamientos hormonales con el objeto de evaluar las respuestas fisiológicas y sus roles en la calidad del vino.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio desarrollado en el presente Capítulo se realizó con el material vegetal y los vinos elaborados provenientes del ensayo realizado durante la campaña 2005/2006 (Capítulo II). Por lo que el detalle de las condiciones de cultivo y experimentales y los tratamientos realizados pueden revisarse en detalle en Materiales y Métodos descriptos en dicho Capítulo.

En cuanto a las condiciones para realizar el análisis mediante Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) las condiciones experimentales fueron las siguientes.

Extracción de muestras

Por unidad experimental se colectaron 50 bayas en bolsas de nylon (10 bayas por racimo tomadas de la parte superior, media e inferior del mismo) al momento de cosecha, cuando el contenido sacarino de las bayas alcanzó los 24° Brix. En el campo, las muestras fueron mantenidas en hielo para prevenir la deshidratación y disminuir el metabolismo enzimático. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron congeladas y conservadas en freezer a -20°C hasta su análisis.

Para las mediciones en vino los resultados se obtuvieron a partir del análisis de los vinos tintos provenientes de las microvinificaciones realizadas con las bayas de cada tratamiento.

Procedimiento para la extracción asistida con ultrasonido

Para el caso del análisis de bayas la metodología que se siguió fue la siguiente:

- 1) Se preparó un set de 3 tubos Khan por cada muestra y se los identificaba con el tratamiento y el número 1, 2 o 3.
- 2) En el tubo 1 se colocó en cada caso 4 mg dicloruro de sodio (NaCl) + 4 mg de metabisulfito de sodio (Na (MeBS)).

3) Se sacó del freezer 3 bayas/tratamiento y con bisturí se separó el hollejo de cada una de ellas con la precaución de no arrastrar restos de pulpa. Se secó con papel tissue, y en papel de aluminio cada una de estas secciones separadas se cortó en pequeños trozos que luego se agregó en el tubo 1 junto con los reactivos antes citados hasta alcanzar un total de 10 mg de material vegetal.

4) Se realizaron 3 extracciones sucesivas con 600 ul de Acetato de etilo acidificado (EtAC). Para mejorar la extracción se sonicó en un equipo de Ultrasonido durante un intervalo de 7 min a temperatura ambiente.

5) Concluidas las tres extracciones se filtró el extracto a través de lana de vidrio silanizada con una "camita" de sulfato de sodio (Na_2SO_4).

6) El líquido recogido durante la filtración se secó bajo una corriente continua de N_2 gaseoso y se llevó a sequedad total (el fondo del tubo alcanzaba una coloración rojiza).

7) Un vez seco se procedió a la derivatización mediante el agregado a cada tubo de 30 ul de Piridina + 70 ul de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA).

8) Luego de esto cada tubo se llevó a 70° C aproximadamente en baño de arena y se dejó reaccionar durante 60 min.

9) Al cabo de este tiempo la muestra estaba lista para seguir con el procedimiento cromatográfico en GC-MS.

Todos los pasos se realizaron al abrigo de la luz.

Para las muestras de vinos la metodología que se llevó a cabo fue la siguiente:

1) Se preparó un set de 3 tubos Khan por cada muestra y se los identificó con el tratamiento y el número 1, 2 o 3.

2) Para cada tratamiento en el tubo 1 se tomaron 0,2 ml de vino y se agregaron 4 mg NaCl + 4 mg Na (MeBS)

3) Se realizaron luego 3 extracciones sucesivas con 600 ul de EtAC acidificado utilizando vortex 3 veces durante 1 min y ultrasonido durante un intervalo de 7 min en cada ocasión.

4) A continuación se siguió el mismo procedimiento descrito para bayas desde el punto 5 al 9.

Preparación de muestras para inyección en GC-MS

Concluida la etapa descrita anteriormente del procesado de las muestras, con una jeringa Hamilton el contenido de cada tubo fue transferido a un inserto de vidrio y éste colocado en un vial color caramelo con tapa a rosca e inyectado en el GC-MS modelo Clarus 500 Mass Spectrometer - Perkin Elmer® *precisely* (Figura 23).

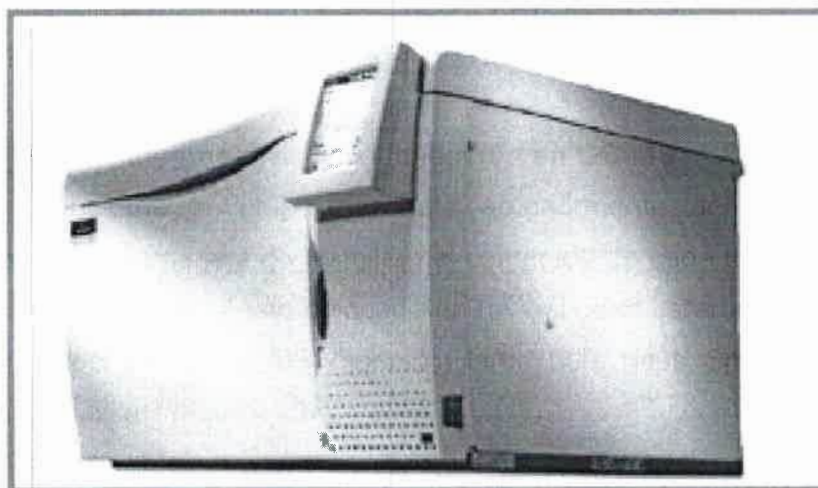


Figura 23. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas Clarus 500 Mass Spectrometer - Perkin Elmer® *precisely*.

Las condiciones y características del cromatógrafo durante la etapa de inyección fueron las siguientes:

- temperatura de inyección 300° C;
- volumen de inyección: 2 ul (Splitless);
- las características de la Columna fueron: largo 30 mt, ID 0,25 mm, 0,25 µm diámetro de pared;

- Programa de inyección: Polifenoles → Rampa: 80 ° C _ 1 min; Rampa 1 : 20 ° C/ min hasta 250° C hold 1 min; Rampa 2 – 6 ° C/ min hasta 300° C hold 2 min; Rampa 3 20 ° C/ min hasta 320° C hold 24 min;
- Se utilizó como gas Carrier Helio 1 mL/min - Split;
- Temperatura de la interface 280° C;
- Temperatura de la fuente 260° C;
- el calibrado del GC-MS se hizo a 70 eV.

Productos químicos y reactivos

Los estándares de ácido gálico, ácido cafeico, malvidina, resveratrol, vainillina, ácido trans-cinámico, ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico utilizados fueron del laboratorio Sigma Chemical co. (St. Louis, Mo) y los estándares de (+)-catequina y quercetina del laboratorio Extrasynthese (Genary, France). Los agentes derivatizantes N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) fueron de SUPELCO (Bellefonte, USA) y la piridina fue del laboratorio Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Todos los demás reactivos y solventes empleados durante los procesos de extracción fueron de calidad de grado analítico.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando que entre los objetivos principales de este capítulo uno de ellos fue probar la aplicabilidad de la metodología propuesta para diferentes tipos de muestras de interés enológico incluyendo vino y sus precursores, en función a los resultados obtenidos podemos concluir que la presente metodología puede ser aplicada para el monitoreo de rutina de los compuestos fenólicos durante todo el proceso de vinificación (desde la etapa de madurez en campo hasta el añejado del vino en bodega). El desarrollo, la optimización y validación de la presente técnica fue definitivamente necesaria para evaluar las respuestas fisiológicas de las plantas de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon sometidas a tratamientos con ABA.

Los analitos estudiados fueron elegidos en base no solo a su representatividad en el vino sino también por su importancia en función a su incremento luego de los tratamientos a campo. El entendimiento de los resultados analíticos son el punto de partida de una correcta y objetiva evaluación de la calidad del vino y de la eficiencia de los tratamientos.

Con la intención de proponer una correcta y específica forma de analizar los compuestos fenólicos de manera individual en hollejos y vinos por GC-MS, fue esencial encontrar las mejores condiciones experimentales en donde los analitos pudieran ser identificados y separados entre sí. La optimización fue desarrollada usando una mezcla sintética de resveratrol, ácido gálico, ácido cafeico, (+) catequina, vainillina, ácido trans-cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, cianidina y malvidina. La Figura 24 muestra a modo de ejemplo el cromatograma de una muestra de hollejo de baya y el espectro de masas de ácido gálico trimetilsililado. En la Figura 25 se observa el cromatograma de un extracto de muestra de vino.

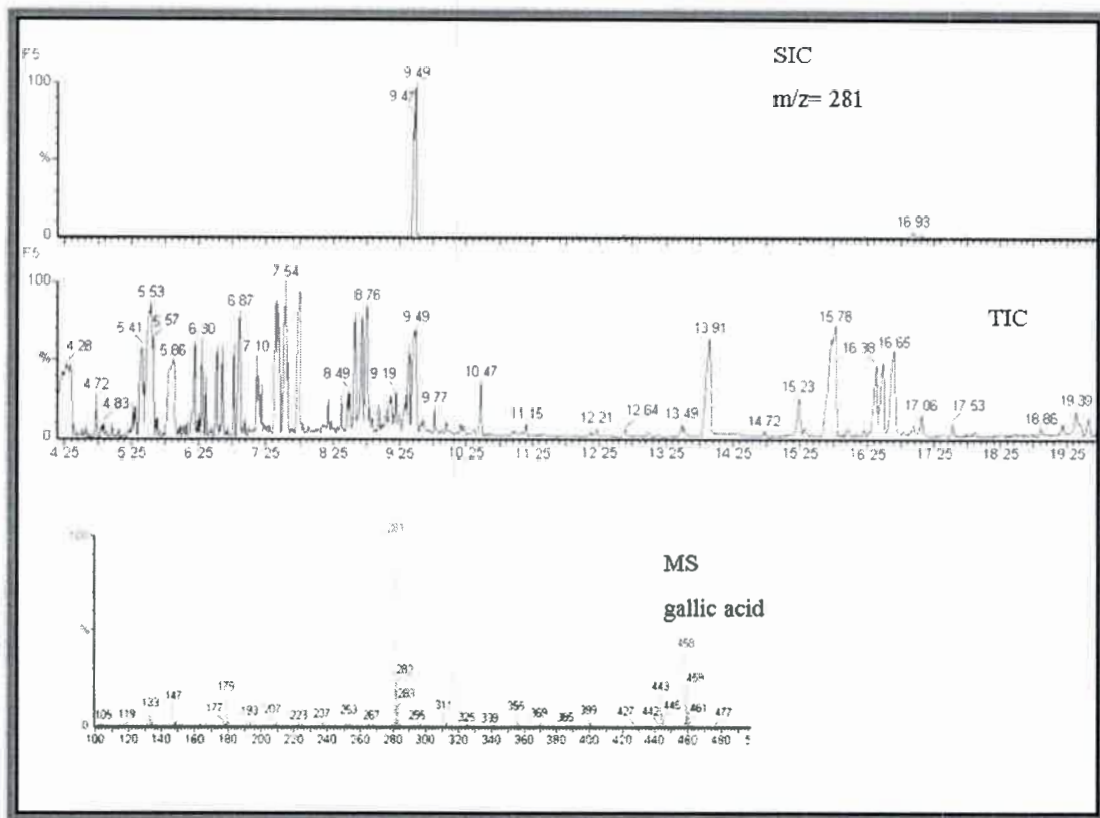


Figura 24. Cromatograma de una muestra de hollejo de baya y el espectro de masas de ácido gálico trimetilsililado. Las condiciones experimentales son descriptas en la sección Materiales y Métodos del Capítulo II. MS: espectro de masas de ácido gálico trimetilsililado; TIC: cromatograma de iones totales de una muestra de hollejo de bayas; SIC: cromatograma de un solo ion extraído del TIC.

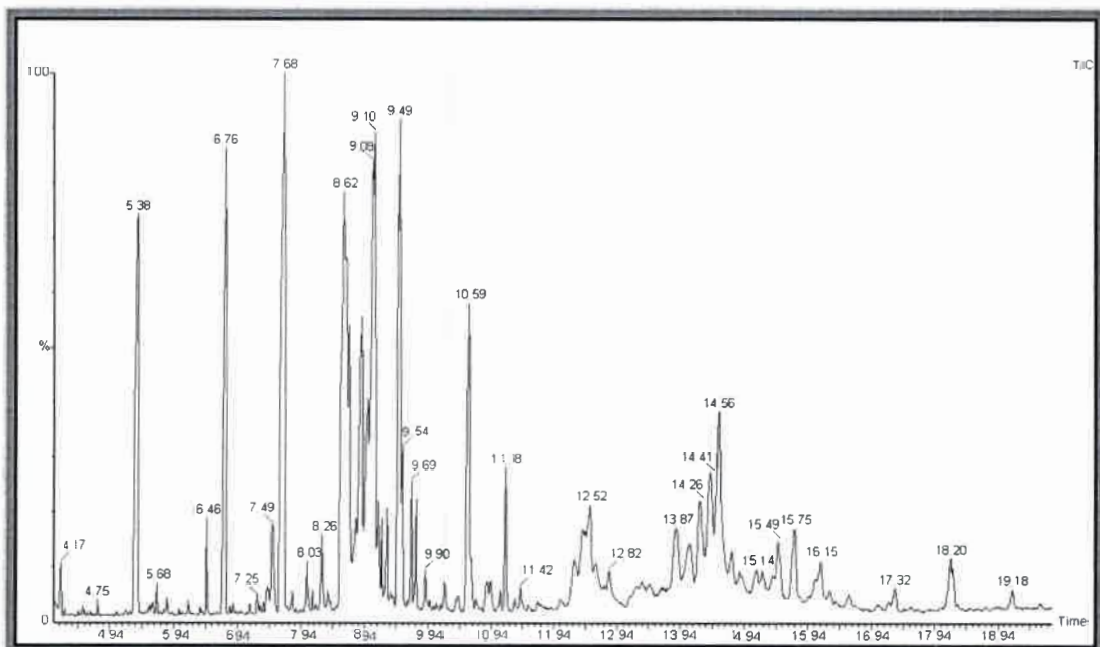


Figura 25. Cromatograma de un extracto de muestra de vino.

La Tabla 4 muestra los tiempos de retención del GC, el ion principal y los demás iones que permiten la identificación para cada estándar derivatizado trimetilsililado (TMS). Los siguientes parámetros fueron consecutivamente optimizados: inyección, interface y temperatura de la fuente, presión del gas carrier y programa del horno.

Tabla 4. Tiempos de retención del GC, ion principal y otros iones para cada estándar derivatizado trimetilsililado (TMS).

Estándar	TMS PM ^a	t _R (min)	Ion principal (m/z)	Otros Iones (m/z)
Ácido gálico	458	9,74	281	458, 443
Malvidina	619	21,2	619	589, 295
Cianidina	574	19,27	574	645, 556, 392
(+)-Catequina	650	16,64	650	368, 355, 267
Quercetina	662	19,41	647	575, 559, 487
Resveratrol	444	15,17	429	444, 147
Ácido cafeico	396	10,48	396	381, 307
Ácido cinámico	220	7,29	220/221	220, 205, 161

^apeso molecular del estándar derivatizado trimetilsililado (TMS).

En la Tabla 5 se detallan los resultados del perfil polifenólico obtenido en el análisis realizado a los hollejos de las bayas Control y tratadas con ABA al momento de cosecha durante el año 2005/2006. Tales concentraciones se expresan en mg / g hollejo a fin de una mejor interpretación. Cabe destacar que

en todos los tratamientos evaluados fue posible identificar y cuantificar mediante GC-MS los siete polifenoles propuestos para este estudio.

Tabla 5. Detalle del perfil y contenido de polifenoles determinado por GC-MS en bayas del cv Cabernet Sauvignon al momento de cosecha (año 2005/2006). Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test).

Tratamiento	Acido Gálico (mg. g hollejo)	Malvidina (mg.g hollejo)	Catequina (mg.g hollejo)	Quercetina (mg.g hollejo)	Resveratrol (mg.g hollejo)	Acido Cafeico (mg. g hollejo)	Acido Cinámico (mg. g hollejo)
Control	1,84 a	2,4 c	1,15 a	0,62 a	1,24 b	0,98 d	3,67 b
ABA early	0,78 c	2,1 d	0,24 b	0,61 a	1,58 ab	1,16 c	2,86 c
ABA 1st	1,44 b	3,2 a	1,14 a	0,72 a	1,83 a	2,38 a	5,16 a
ABA 2nd	1,56 ab	2,7 b	0,45 b	0,21 b	1,64 ab	2,16 b	2,34 d

Como se demostró en capítulos anteriores de esta tesis mediante métodos de determinación espectrofotométricos, se ratifica y demuestra mediante GC-MS que los tratamientos con ABA tendrían efectos bioquímicos en la biosíntesis de antocianos y polifenoles para las condiciones de cultivo del presente ensayo. Además se pudo lograr mediante la presente metodología un detalle completo del perfil de todos los polifenoles presentes y una cuantificación de cada uno de los mismos, en aquellas plantas que han sido tratadas con ABA, datos que mediante las técnicas de rutina usadas comúnmente para estas determinaciones no son posibles de obtener.

Como se observa en la Tabla 5 al momento de cosecha y para la temporada 2005/2006 se observó que las mayores diferencias en cuanto al perfil polifenólico con el Control las expuso el tratamiento ABA 1st que incrementó significativamente los contenidos de malvidina, resveratrol, ácido

cafeico y ácido cinámico. ABA 2nd sólo supero al control en contenidos de malvidina y ácido cafeico en bayas y en cuanto al tratamiento ABA early se observó que las diferencias fueron mayores y significativas a favor de este tratamiento únicamente para el análisis de ácido cafeico.

En la Tabla 6 se observa el detalle del perfil y los contenidos de polifenoles de vinos Cabernet Sauvignon de la temporada 2005/2006 luego de tratamientos exógenos con ABA.

Tabla 6. Detalle del perfil y contenido de polifenoles determinado por GC-MS en vinos Cabernet Sauvignon cosecha 2005/2006. Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas para $P \leq 0.05$ (LSD test)

Tratamiento	Ac. Galico (mg. L ⁻¹)	Malvidina (mg. L ⁻¹)	(+)Catequina (mg. L ⁻¹)	Quercetina (mg. L ⁻¹)	Resveratrol (mg. L ⁻¹)	Ac. Cafeico (mg. L ⁻¹)	Ac. Cinámico (mg. L ⁻¹)
Control	13,00 d	3,40 b	0,81 b	0,12 b	1,65 b	10,00 c	ND
ABA early	25,00 c	4,00 b	16,19 a	1,21 a	1,80 b	15,00 b	ND
ABA 1st	44,00 a	8,10 a	16,21 a	1,22 a	2,10 a	16,00 a	ND
ABA 2nd	31,00 b	8,80 a	17,00 a	1,42 a	2,15 a	15,80 ab	ND

Como puntualiza la Tabla 6 se puede observar que si bien los tratamientos ABA 1st, ABA 2nd y ABA early afectan diferencialmente la concentración de cada metabolito en particular, todos los tratamientos con ABA durante la temporada 2005/2006 respondieron incrementando sustancialmente sus contenidos en los vinos evaluados.

En particular el tratamiento ABA 1st se destacó entre todos los tratamientos con ABA superando significativamente al Control en cuanto a los contenidos de todos los polifenoles evaluados. Resulta interesante y necesario destacar también que los tratamientos ABA 1st, ABA 2nd y ABA early tuvieron los mayores contenidos y se diferenciaron significativamente del Control en particular respecto de ácido gálico, quercetina, catequina y ácido cafeico.

Considerando que malvidina es el metabolito que se considera esta presente en mayor proporción entre los compuestos antociánicos en vid y que la presencia de resveratrol en vinos esta relacionado con los efectos benéficos de éste sobre la salud humana; y que dichos metabolitos son considerados referentes importantes (entre otros factores) para determinar calidad en vinos tintos, son mas que significativos los resultados hallados en los vinos de los tratamientos ABA 1st y ABA 2nd (plantas con uno y dos años de aplicaciones), a partir de los cuales se puede establecer que el tratamiento exógeno con ABA aplicado a plantas de vid del cv Cabernet Sauvignon influye de manera positiva en la síntesis de estos compuestos ya que incrementa significativamente sus cantidades respecto a los tratamientos Control y ABA early (plantas con una única aplicación de ABA en etapa temprana del desarrollo).

Con estas experiencias desarrolladas a campo en la provincia de Mendoza se ha demostrado que es posible incrementar calidad en bayas y vinos tintos con aplicaciones de ABA que simularían los efectos dados en la cadena de señales bioquímicas por el estrés hídrico, sin las consecuencias negativas que acarrea esta práctica agronómica en la supervivencia del viñedo.

Sumado a esto un aspecto importante de la metodología propuesta de determinación de polifenoles mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas es el bajo consumo de solventes orgánicos, que determina que ésta sea una técnica de bajo costo y amigable con el ambiente.

Además, la optimización de esta técnica ha demostrado además que el método que se plantea es robusto, sensible, efectivo en cuanto a costos y versátil para la determinación simultánea de compuestos fenólicos en diferentes muestras de interés enológico durante todo el proceso de vinificación y añejamiento de vinos (desde el campo a la botella).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

CAPITULO V

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este manuscrito demuestran que las aplicaciones exógenas de ABA lograron incrementar efectivamente los rendimientos en vid, observándose un aumento en el número de bayas por racimo. Una posible explicación es que ABA alivia el estrés hídrico temporal logrando mejorar el crecimiento como ocurre en *Ilex paraguariensis* (Sansberro et al., 2004). Teniendo en cuenta que el estudio se condujo sin ningún tipo de estrés hídrico impuesto; la necesidad de alivio a la planta durante las horas de mayor demanda atmosférica fue mínima, o nula. De hecho, solo en algunos pocos casos se encontraron diferencias estadísticas en el Ψ_w medido al mediodía. Adicionalmente, no se observaron existieron diferencias significativas en crecimiento medido al final del experimento. En cuanto a los parámetros que determinan el rendimiento en vid durante el estudio, un mayor número de bayas fueron abastecidas por una maquinaria fotosintética de proporciones similares dado que no existieron diferencias en AF entre los tratamientos. En función a éstos resultados sería factible esperar que un mayor número de bayas llenadas por una maquinaria fotosintética de similar tamaño podrían acumular menos azúcares solubles debido a un mayor número de destinos mas débiles que podrían demandar menores cantidades. Sin embargo, los resultados muestran que las bayas de los tratamientos con ABA acumulan la misma cantidad de azúcares que el control, ya que no se observan diferencias en °Brix entre tratamientos.

En función a lo anteriormente mencionado sería razonable esperar una menor concentración en el contenido de polifenoles o antocianos en las bayas. Sin embargo, los incrementos en rendimiento se obtuvieron sin disminuir la calidad de las bayas para vinificación.

Una posible explicación para estos resultados es que ABA incrementa la eficiencia fotosintética, por ejemplo aumentando los pigmentos protectores del aparato fotosintético (carotenos, Travaglia et al., 2007). Sin embargo durante el

presente trabajo no se encontraron mejoras significativas en la TF luego de las aplicaciones de ABA.

Por otro lado, al igual que en trigo (Travaglia et al., 2007) y arroz (Yang et al., 2006), ABA podría aumentar la localización de carbohidratos. Los datos colectados solventan dicha hipótesis dado que más bayas fueron abastecidas con suficientes carbohidratos provenientes de una fuente de igual tamaño. Si bien un estudio de los residuos de poda se llevo a cabo durante las temporadas para corroborar los efectos de acumulación de carbohidratos en las plantas tratadas (datos no mostrados) los resultados no mostraron diferencias entre tratamientos, aunque para éste caso los brotes jóvenes pueden no ser la fuente principal para las reservas. Existe la posibilidad de que menos carbohidratos sean localizados en raíces y troncos, hecho que establece un interesante punto para desarrollar investigaciones futuras. Por otro lado, ABA promueve la biosíntesis de polifenoles y/o antocianinas. Esto es posible ya que el incremento en la biosíntesis de antocianos por ABA se ha demostrado por aplicaciones directas a los hollejos de las bayas (Jeong et al., 2004). También es posible que ABA promueva la combinación de alguno o todos los factores antes mencionados en una forma aditiva o pleiotropica, como la promoción de la producción-traslación de carbohidratos y/o la biosíntesis de antocianinas.

En conclusión, luego de tres temporadas de experimentos, se demostró que ABA incrementó los rendimientos en vides del cv. Cabernet Sauvignon cultivadas en condiciones de campo. La principal razón para dicho incremento es que las aplicaciones exógenas de ABA favorecerían el cuaje. En relación a esto se podría considerar que ABA mejora el cuaje de flores en si mismo, o bien ABA favorece la persistencia de las pequeñas flores cuajadas y/o de las pequeños frutos en desarrollo. Estos resultados se correlacionan con otros previos citados por Mullins y Osborne (1970) en plantas de Cabernet Sauvignon crecidas en macetas, donde ABA aplicado sobre las hojas mejoró el crecimiento de las inflorescencias.

Es importante enfatizar que los resultados obtenidos durante la última temporada de estudio (2007/2008) coinciden con lo informado por Chervin et al. (2004) en vides del cv. Cabernet Sauvignon cultivadas a campo,



corroborándose que 1-MCP aplicado en racimos durante la etapa de floración, cuaje y postcuaje de flores de vid resulta eficaz en evitar el proceso de abscisión de pequeños frutos comandada por la hormona etileno. Además, por cuarta temporada consecutiva se logra mediante la aplicación exógena de ABA incrementar los rendimientos en vid debido a un mayor número de bayas por racimo y en este caso se mejora sustancialmente la calidad de las bayas mediante una mejora en el contenido de antocianos y polifenoles totales durante toda la etapa de madurez de la uva. Por lo tanto y si bien estos resultados sugieren que el mayor establecimiento de bayas por ABA operaría, al menos parcialmente, inhibiendo acción y/o síntesis de etileno; no es posible en base a estos resultados obtener conclusiones generalizadas sobre la interacción de ABA en el metabolismo de etileno por lo que estudios mas detallados y con resultados sólidos en esta materia son necesarios realizar para corroborar tal hipótesis.

Por lo antes expuesto se puede concluir que los resultados obtenidos en este trabajo proveen información de interés para el desarrollo del cultivo de vid en la provincia de Mendoza ya que con aplicaciones de ABA se logran incrementos sustanciales en los rendimientos en vides en condiciones de campo, sostenidas a través de varias temporadas, sin afectar y aún mas incrementando la calidad organoléptica de las bayas destinadas a vinificación.

Sumado a lo anteriormente dicho si bien son interesantes y destacables los resultados obtenidos con las aplicaciones de 1-MCP en estas condiciones de cultivo donde el regulador actuó favorablemente reteniendo bayas durante la floración y también en la etapa de cuaje, son contundentes los efectos positivos del asperjado de ABA en plantas de vid donde la hormona no sólo promueve cuaje y producción, sino que además tiene influencia especialmente notoria en la promoción de algunos metabolitos secundarios de interés muy especial para la vitivinicultura.

Como consideración final es importante expresar que los resultados obtenidos permiten aceptar la hipótesis de que ABA *per se* tiene efectos positivos sobre el metabolismo de antocianos y polifenoles; que si bien no fueron sustanciales los incrementos en la actividad fotosintética originadas por

ABA, es posible que las plantas tratadas mantuvieran un mejor estado hídrico tanto de fuentes como de destinos, esto mejorara el transporte de fotoasimilados, activara indirectamente la actividad fotosintética y finalmente esto se tradujera en incrementos en el rendimiento a cosecha. Si bien es necesario complementar estos resultados con otros estudios, es posible también solventar la hipótesis de un posible efecto de ABA en la disminución de la caída de flores y/o la mejora de la persistencia de las mismas en el racimo, que se relacionaría en alguna medida con una posible influencia o *crosstalk* entre las dos hormonas que estarían vinculadas durante estos procesos, ABA y etileno; con lo que se podría plantear una nueva herramienta de manejo para el cultivo de vid que permitiría mediante el control del factor de abscisión de flores o pequeños frutos, por aplicaciones exógenas de ABA y/o 1-MCP el incremento de rendimientos de vid a campo, asociado esto a un incremento en la calidad de las bayas para vinificación.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N.A., Coombe, B.G. y Williams, P.J. 1991. The Contribution of Hydrolyzed Flavor Precursors to Quality Differences in Shiraz Juice and Wines: An Investigation by Sensory Descriptive Analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (3), 167-174.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. y Saltveit Jr., M.E. 1992. Ethylene in Plant Biology, second ed., Academic press Inc., 1992, p.581.
- Achard, P., Vriezen, W.H., Van Der Straeten, D. y Harberd, N.P. 2003. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 15, 2816–2825.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. y Harberd, N.P. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* 311, 91–94.
- Alleweldt, G. y Koch, R. 1977. Ethylene content in ripening grape berries. *Vitis* 16, 263-271.
- Azcon-Bieto, J. y Talón, M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Mc Graw Hill Interamericana, Madrid.
- Bai, J.H., Baldwin, E.A., Goodner, K.L., Mattheis, J.P. y Brecht, J.K. 2005. Response of four apple cultivars to 1-methylcyclopropene treatment and controlled atmosphere storage. *HortScience* 40, 1534-1538.
- Beaudoin, N., Serizet, C. Gosti, F. y Giraudat, J. 2000. Physiologists Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades. *Plant Cell*. 12, 1103-1116.
- Blankenship, S.M. y Dole, J.M. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 28, 1-25.
- Boido, E.; Alcalde-Eon, C.; Carrau, F.; Dellacassa, E. y Rivas-Gonzalo, J. C. 2006. Aging Effect on the Pigment Composition and Color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat Wines. Contribution of the Main Pigment Families to Wine Color. *Agric. Food Chem.* 54 (18), 6692 -6704.

- Bottrill, D.E., Possingham, J.V. y Kriedemann, P.E. 1970. The effect of nutrient deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. *Plant and soil*. 32, 424-438.
- Bowler, C., Montagu, M. V. y Inze, D. 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 43, 83-116.
- Branas, J., 1974. *Viticulture*. Editions Déhan, Montpellier, France, 990 pp.
- Bravdo B, Hepner Y, Loinger C, Cohen S, Tabacman H. 1985. Effect of Irrigation and Crop Level on Growth, Yield and Wine Quality of Cabernet Sauvignon. *Amer J Enol Vitic* 36 (2), 132-139.
- Bray, E. A. 1988. Drought- and ABA-Induced Changes in Polypeptide and mRNA Accumulation in Tomato Leaves. *Plant Physiol*. 88, 1210-1214.
- Bray, E. A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*. 2 (2), 48-54.
- Burns J, Gardner PT, McPhail DB, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, Luster C, Matthews D, MacLean MR, Lean MEJ, Duthie GG, Crozier A. 2000. *J. Agr. Food Chem*. 48, 220.-399.
- Burns, J., Mullen, W., Landrault, N., Teissedre, L., Lean, M. y Crozier, A. 2002. Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem*. 50, 4096-4102.
- Candolfi-Vasconcelos, M.C. y Koblet, W. 1990. Yield fruit quality, bud fertility and starch reserves of the wood as a function of leaf removal in *Vitis vinifera*-evidence of compensation and stress recovering. *Vitis*. 29 (4), 199-221.
- Cantos, E., García-Viguera, C., de Pascual, T. y Tomás-Barberai, F.A. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on Resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem*. 48, 4606-4612.

- Carbonneau, A. 1998. Irrigation, vignoble et produit de la vigne. In *Traité d'irrigation*. J. R. Tiercelin (Ed.), pp. 257-298. Lavoisier Tec & doc, Paris.
- Castellari, M., Sartini, E., Fagiani, A., Arfelli, G., Armati, A. 2002. A analysis of wine phenolics by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column *J. Chromatogr. A.* 973, 221-227.
- Champagnol, E. 1998. Critères de qualité de la vendange. In: Flanzky, C. (Ed.); *oenologie, Fondements Scientifiques et technologiques*, 653-659. Lavoissier Tec & Doc.
- Chervin C., El-Kereamy, A., Roustan, JP., Latché, A., Lamon, J. y Bouzayen, M. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climateric fruit, *Plant Science* 167, 1301-1305.
- Clouse, S.D. y Sasse, J.M. 1998. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 49, 427-451.
- Considine, J.A. 1983. Concepts and practice of use of plant growth regulating chemicals in viticulture. Chapter 6 in *Plant Growth Regulating Chemicals*, Vol I, Louis G. Nickell, ed. CRC Press, pp 89-96.
- Cook, J.D., Reddy, M.B. y Hurrell, R.F. 1995. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (4), 800-804.
- Coombe, B.G. 1973. The regulation of set and development of the grape berry. *Acta Horticulturae* 34, 261-272.
- Coombe, B.G. y Hale, C.R. 1973. The hormone content of ripening grape berries and the effect of growth substance treatments, *Plant Physiol.* 51, 629-634.
- Crozier, A., Burns, J., Aziz, A.A., Steward, A.J., Rabiasz, H.S., Jenkins, G.I., Edwards, C.A. y Lean M.E.J. 2000. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages; measurements and bioavailability. *Biol Res* 33, 79-88.
- Dal Cin, V., Rizzini, F.M., Botton, A. y Tonutti, P. 2006. The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by

- 1-MCP in apple and peach fruit. *Postharvest Biology and Technology* 42, 125-133.
- Damianaki, A., Barkogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hutzoglou, A., Pangiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P-M. y Castanas, E. 2000. *J. Cell. Biochem.* 78, 429.
 - Davies P. 1995. The plant hormones. Their nature, occurrence and functions. En: *Plant hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Davies P.J., (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 1-12.
 - Davies, P.J. (Ed.). 2005a. *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Kluwer Acad Publ., Dordrecht, p. 750.
 - Davies, P.J. (Ed.). 2005b. *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Chapter D4: Ethylene signal transduction in stem elongation. Nehring, R.B. y Ecker, J.R. Kluwer Acad Publ., Dordrecht, p. 352.
 - Davies, W.J. y Zhang, J. 1991. Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42, 55-76.
 - De Beer, D., Jonbert, E., Gelalerblom, W.C.A. y Manley, M. 2003. Antioxidant Activity of South African Red and White Cultivar Wines: Free Radical Scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 51 (4) 902-909.
 - Deis L, Cavagnaro JB, Bottini R, Astorga N, Nosal L. 2004. *Actas XXV Reunión Argentina Fisiología Vegetal*, Santa Rosa, La Pampa, Argentina.
 - Dry, P. R., Loveys, B. R. y Düring, H. 2000a. Partial drying of the rootzone of grape. I. Transient changes in shoot growth and gas exchange. *Vitis* 39, 3-7.
 - Dry, P. R., Loveys, B. R. y Düring, H. 2000b. Partial drying of the rootzone of grape. II. Changes in the pattern of root development. *Vitis* 39, 9-12.
 - Dry, P. R., Loveys, B. R., Stoll, M., Stewart, D. y McCarthy, M. G. 2000c. Partial rootzone drying –an update. *Aust Grapegr Winem* 438, 35-39.

- Dry, P.R. y Loveys, B.R. 1999. Grapevine shoot growth and stomatal conductance are reduced when part of the root system is dried. *Vitis* 38 (4), 151-156.
- Dugo, G., Saitta, M., Salvo, F., Ragusa, M., Manzo, G., Bambara, G. 2001. Characterization of Sicilian wines. 1: Determination of phenolic compounds in Sicilian red wines by a HRGC-MS/MS. *Vignevini*. 28 (10), 81-85.
- Ecker, J.R. 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268, 667-675.
- Estruch R., 2000. Wine and cardiovascular disease. *Food Research International* 33, 219–226.
- Eze, J.M.O., Dumbroff, E.B. y Thompson, J.E. 1983. Effects of temperature and moisture stress on the accumulation of abscisic acid in bean. *Physiol. Plant.* 58, 179-183.
- Fan, X. y Mattheis, J.P. 2002. Impact of 1-methylcyclopropene and methyl jasmonate on apple volatile production. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2847-2853.
- Fan, X., Argenta, L. y Mattheis, J.P. 2002. Interactive effects of 1-MCP and temperature on 'Elberta' peach quality. *HortScience* 37, 134-138.
- Finkelstein R.R y Rock C.D. 2002. Abscisic acid biosynthesis and response. En: CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pgs. 1-52.
- Finkelstein R.R, Gampala S.S y Rock C.D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14, S15-S45.
- Flexas, J., Escalona, M.J. y Medrano, H. 1998. Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Australian Journal of Plant Physiology* 25(8), 893- 900.
- Freeman, B. M. y Kliewer, W. M. 1983. Effect of irrigation, crop level and potassium fertilization on Carignane vines. II. Grape and wine quality. *Am. J Enol. Vitic.* 34, 197-207.
- Fryer, M.J. 1992. The antioxidant effect of thylakoid vitamin E (α-tocopherol). *Plant Cell Environ* 15, 381–392.

- Fu, X. y Harberd, N.P. 2003. Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421, 740–743.
- Gazzarrini, S. y McCourt, P. 2003. Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Ann. Bot. (Lond.)* 91, 605–612.
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y y McCourt P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117-2000.
- Gomez de Campo, M., Ruiz, C., Sotes, V. y Lissarrague, J.R., 1999. Water consumption of grapevines: influence of leaf area and irrigation. In: Ruhl, E.H., Schmid, J., (Eds.), Presented at the First ISHS Workshop on Water Relations of Grapevines, ISHS, Stuttgart, Germany, pp. 279–286.
- Gómez del Campo, M., Ruiz, C y Lissarrague, J.R. 2002. Effect of water stress on leaf area development, photosynthesis, and productivity in Chardonnay and Airén grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (2), 138-143.
- Gómez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons M.K y Ho T-H.D. 2001. Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13, 667-679.
- Gonzalez-Sanjose, M.L., Barron, L.J.R., Junquera, B. y Robredo, L.M. 1991. Application of principal component analysis to ripening indices for wine grapes. *J. Food Compos. Anal.* 4, 245-255.
- Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2e. Partie: Mesure, origine et interpretation. *Conn. Vigne Vin.* 18 (4), 253-271.
- Halliday, K. 2004. Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin. *Curr. Biol.* 14, R1008–R1010.
- Hamilton, A.J., Bouzayen, M., and Grierson, D. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7434–7437.
- Hardie, W. J. y Considine, J. A. 1976. Response of grapes to water-deficit stress in particular stages of development. *Am J Enol Vitic* 27 (2), 55-61.

- Haslam, E. 1974. Polyphenol-protein interactions. *Biochemistry Journal*. 139, 285-288.
- Herderich, M.J., y Smith, P.A. 2005. Analysis of grape and wine tannins: methods, applications and challenges. *Aust. J. Grape and Wine Res.* 11 (2), 05-214.
- Hertog, M.G.L. y Hollman, P.C. 1996. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr.* 50 (2), 63-71.
- Hertog, M.G.L. y Katan, M.B. 1998. Quercetin in foods, cardiovascular disease, and cancer. Citation: *Flavonoids in health and disease*. Pags. 447-467.
- Hidalgo Togores, J. 2006. La calidad del vino desde el viñedo. Madrid. Eds. Mundi-Prensa. pp. 237-242.
- Hsiao, T. 1973. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24, 519-570.
- Hwang, I., Chen, H.C. y Sheen, J. 2002. Two-component signaltransduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 500-515.
- Ingram, J. y Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerante in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 377-403.
- Iriti, M. y Faoro, F. 2006. Grape phytochemicals: a bouquet of old and new nutraceuticals for human Elath. *Med. Hypotheses* 67, 833-838.
- Jeong S.T., Goto-Yacamoto N., K. Hashizume y S. Esaka M. 2006. Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape. *Plant Science* 170, 61-69.
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., Esaka M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167, 247-252.
- Jiang, M. y Zhang, J. 2002. Role of abscisic acid in water stress induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Free Radical Res.* 36, 1001-1015.

- Jiang, Y. y Joyce, D.C. 2002. 1- Methylcyclopropene treatment effects on intact and fresh-cut apple. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 77, 19-21.
- Johnson, P.R. y Ecker, J.R. 1998. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32, 227-274.
- Kaiser, W.M., Kaiser, G., Schöner, S y Neimanis, S. 1981. Photosynthesis under osmotic stress. *Planta* 153 (5), 430-435.
- Kamande Ndung'u, C., Masumi, S., Okamoto, G. y Hirano, K. 1997. Abscisic Acid, Carbohydrates, and Nitrogen Contents of Kyoho Grapevines in Relation to Budbreak Induction by Water Stress. *Am. J. Enol. Vitic.* 48 (1), 115-120.
- Kaps, M.L. y Cahoon, G.A. 1992. Growth and fruiting of container-grown 'Seyval Blanc' grapevines modified by changes in crop level, leaf number and position, and light exposure. *Amer. J. Enol. Viticult.* 43, 191-199.
- Kataoka, I., Kubo, Y., Sugiura, A. y Tomana, T. 1984. Effects of temperature, cluster shading and some growth regulators on L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in black grapes. *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* 124, 35-44.
- Karagiannis, S., Economou, A. y Lanaridis, P. 2000. Phenolic and Volatile Composition of Wines Made from *Vitis vinifera* Cv. Muscat Lefko Grapes from the Island of Samos. *J. Agric. Food Chem.* 48 (11), 5369-5375.
- Keller, M. 2003. In: *Grapevine Anatomy and Physiology*. Course text for WSU Professional Certificate in Viticulture. Washington State University. Irrigated Agriculture Research and Extension Center. Prosser, WA. USA.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 283-307.
- Kende, H. y Zeevart, J.A.D. 1997. The five 'classical' plant hormones. *Plant Cell* 9, 1197-1210.
- Knekt, P. 1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 146 (3), 223-230.

- Koblet, W., Candolfi-Vasconcelos, M., Zweifel, W. y HOWEL, G. 1994. Influence of leaf removal, rootstock, and training system on yield and fruit composition of pinot noir grapevines. *Am. J. Enol.Vitic.* 45 (2), 181-187.
- Kliewer, W.M., Freeman, B.M y Hosssom, C. 1983. Effect of Irrigation, Crop Level and Potassium Fertilization on Carignane Vines. I. Degree of Water Stress and Effect on Growth and Yield *Am. J. Enol. Vitic.* 34 (3), 186-196.
- Knekt, P. et al.1997. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol* 146 (3), 223-230.
- Kutschera, U. y Schopfer, P. 1986. Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptiles. *Planta* 167, 527-535.
- Leung, J. y Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 199-222.
- Liu Y, Bergervoet J.H.W, Ric De Vos C.H, Hilhorst H.W.M, Kraak H.L, Karssen C.M y Bino R.J. 1994. Nuclear replication activities during inhibition of abscisic acid- and gibberellin-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Planta* 194, 368-373.
- Lovegrove, A y Hooley, R. 2000. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends in Plant Science.* 5, (3), 102-110.
- Luckwill, L.C. 1957. Studies of fruit development in relation to plant hormones. IV. Acidic auxins and growth inhibitors in leaves and fruits of the apple. *J. Hort. Sci.* 32, 18-33.
- Marais, J., Van Wyk, C. J. y Rapp, A. 1991. Carotenoid levels in maturing grapes as affected by climatic regions. *S Afr J Enol Vitic* 12, 64-69.
- Mathooko, F.M., Tsunasima, Y., Owino, W., Kubo, Y. y Inaba, A. 2001. Regulation of genes encoding ethylene biosynthesis in peach fruit by carbon dioxide and 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.* 21, 265-281.
- Matthews, M. A. y Anderson, M. M. 1988. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: Responses to seasonal water deficits. *Am J Enol Vitic* 39, 313-320.

- Mc Carthy, M.G., RM Cirami, R.M. y McCloud, P. 1983. Vine and fruit responses to supplementary irrigation and canopy management. *S Afr J Enol Vitic.* 4, 67-76.
- Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulias, J. y Flexas, J. 2002. Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany. Water Stress.* 89 (7), 895-905.
- Mullins, M., Bouquet, A. y Williams, L. 1992. *Biology of the Grapevine.* Cambridge University Press.
- Mullins, M., Bouquet, A. y Williams, L. 1992. The structure of the grapevine: vegetative and reproductive anatomy. *Biology of the Grapevine.* Cambridge University Press.
- Mullins, M.G. 1967. Morphogenetic effects of roots and of some synthetic cytokinins in *Vitis vinifera* L. *J. Exp. Bot.* 18, 206-214.
- Mullins, M.G., Osborne, D.J. 1970. Effect of abscisic acid on growth correlation in *Vitis vinifera* L. *Austral. J. Biol. Sci.* 23, 479-483.
- Nadal, M. y Arola, L. 1995. Effects of limited irrigation on the composition of must and wine of Cabernet Sauvignon under semi-arid conditions. *Vitis* 34 (3), 151-154.
- Nakamura, A., Nakajima, N., Goda, H., Shimada, Y., Hayashi, K., Nozaki, H., Asami, T., Yoshida, S. y Fujioka, S. 2006. Arabidopsis Aux/IAA genes are involved in brassinosteroid-mediated growth responses in a manner dependent on organ type. *Plant J.* 45, 193-205.
- Naor, A., Bravdo, B. y Gelobter, J. 1994. Gas exchange and water relations of field-grown Sauvignon blanc grapevines. *American Journal for Enology and Viticulture* 45, 423-427.
- Naor, A., Bravdo, B. y Hepner, Y. 1993. Effect of post-veraison irrigation level on Sauvignon blanc yield, juice quality and water relations. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 14, 19-25.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., Chory, J. 2006. Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell* 126 (3) 467-475.

- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., y Deloire, A. 2002. Influence of Pre- and Postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, (4) 261-267.
- Ojeda, H., Deloire, A., Carbonneau, A., Ageorges, A y Romieu, C. 1999. Berry development of grapevines: Relations between the growth of berries and their DNA content indicate cell multiplication and enlargement. *Vitis* 38 (4), 145-150.
- Paleg, L.G., Coombe, B.G. y Buttrose, M.S. 1962. Physiological effects of gibberellic acid. V. Endosperm responses of barley, wheat, & oats. *Plant Physiol.* 37 (6), 798–803.
- Passioura, J.B. y Stirzaker, R.J. 1996. The water relations of the root-soil interface. *Plant, Cell and Environment* 19, 201–208.
- Pérez Peña, J. 2000. Restricciones híbridas durante el desarrollo de la baya y su influencia en el crecimiento vegetativo, reproductivo, rendimiento y calidad enológica de la uva variedad Cabernet Sauvignon. Thesis of Magister Scientiae, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Argentina, pp 189.
- Perez Peña, J. y Tarara, J.M. 2004. A portable whole canopy gas exchange system for multiple mature field-grown grapevines. *Vitis* 43 (1), 7-14.
- Perez-Flores L, Carrari F, Osuna-Fernandez R, Rodriguez M.V, Enciso S, Stanelloni R, Sánchez R.A, Bottini R, Iusem N.D y Benech-Arnold R.L. 2003. Expression analysis of a GA 20-oxidase in embryos from two sorghum lines with contrasting dormancy: possible participation of this gene in the hormonal control of germination. *Journal of Experimental Botany* 54, 2071-2079.
- Petrie, P. R., Trought, M. C. T. y Howell, G. S. 2000. Fruit composition and ripening of Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf area. *Aus. J. of Grape and Wine Res.* 6 (46), 46-51.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J.B., Tabacchi, R., Gindro, K. y Vireto, O. 2003. α -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major

- stilbenes synthesized by stressed grapevines leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5488-5492.
- Pirie, A.G y Mullins, M.G. 1976. Change in anthocyanin and phenolic content of grapevine leaf and fruit tissue treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. *Plant Physiology* 58, 468-472.
 - Poni, S., Lakso, A. N., Turner, J. R. y Melious, R. E. 1994. Interactions of crop level and late season water stress on growth and physiology of field-grown Concord grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 252-258.
 - Popova L.P y Riddle K.A. 1996. Development and accumulation of ABA in fluridone-treated and drought-stressed *Vicia faba* plants under different light conditions. *Physiologia Plantarum* 98, 791-797.
 - Pretorius, I.S. y Hoj, P.B. 2005. Grape and wine biotechnology: challenges, opportunities and potential benefits. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11 (2), 83-108.
 - Price, S. F., Breen, P. J., Valladao, M. y Watson, B. T. 1995. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 187-194.
 - Psarra, E., Mackris, D.P., Kallithraca, S. y Kefalas, P. 2002. Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *J. Sci. Food Agric.* 82 (9), 1014-1020.
 - Quiroga, A.M., Berli, F., Moreno, D., Cavagnaro, J.B. and Bottini, R. 2009. Abscisic acid sprayed to the leaves increases yield in field-grown grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon by augmenting berry set and without affecting anthocyanin content and total polyphenol index. *J. Plant Growth Regul.* 28, 28-35.
 - Raz, V., Bergervoet, J. y Koornneef, M. 2001. Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development* 128, 243-252.
 - Reid, M. y Staby, G.F. 2007. A brief history of 1-MCP. *HortScience* 43, 83-85.
 - Riberau-Gayon, P. 1982. The anthocyanins of grapes and wines. *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press: New York.

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdieu D. 1998. *Traite d'œnologie*. Tomo 1: Microbiologie du vin. Vinifications. Tomo 2: Chimie du vin. Stabilization et traitements. Editorial Dunod, Paris.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdieu D. 2006. Phenolic compounds. In *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*. Wiley, Chichester, U.K. Vol 2, Chapter 6, pp 141-203.
- Riou, V. y Asselin, C. 1996. Potentiel polyphénolique disponible du raisin. Estimation rapide par extraction partielle á chaud. *Progrés en Agriculture et Vitiviniculture* 113, 382-384.
- Robichaud, J. L. y Noble, A. C. 1990. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53 (3), 343–353.
- Rock, C. 2000. Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* 148, 357-396.
- Rolland, F., and Sheen, J. (2005). Sugar sensing and signalling Networks in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 269–271.
- Sáenz-Lopez, R., Fernández-Zurbano, P. y Tena, M.T. 2004. Análisis of aged red wine pigments by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* 1052, 191-197.
- Sansberro, P., Mroginski, L. y Bottini, R. 2004. Foliar sprays with ABA promote growth of *Ilex paraguariensis* by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation.* 42, 105-111.
- Santos Buelga, C y Scalbert, A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds--nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 80 (7), 1094-1117.
- Sato, T. y Theologis, A. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6621–6625.
- Schaller, G.E. y Kieber, J.J. 2002. Ethylene, *The Arabidopsis book*, eds C.R. Somerville y E.M. Meyerowitz, American society of Plant Biologist, Rockville, M.D, [Http://www.aspb.org/publications/arabidopsis](http://www.aspb.org/publications/arabidopsis).

- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E. y Hemmingsen, E. 1965. Sap pressure in vascular plants. Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148, 339-346.
- Schultz, H.R. y Matthews, M.A. 1988. Resistance to Water Transport in Shoots of *Vitis vinifera* L. Relation to Growth at Low Water Potential. *Plant Physiol.* 88 (3), 718–724.
- Schwartz, S.H., Qin, X. y Zeevaart, J.A.D. 2003. Elucidation of the indirect pathways of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131, 1591-1601.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular response to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 217-223.
- Sisler, E.C. y Serek, M. 1997. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiol. Plant.* 100, 577-582.
- Smart, R. E. 1974. Aspects of Water Relations of the Grapevine (*Vitis Vinifera*). *Amer. J. Enol. Viticult.* 25 (2) 84-91.
- Smart, R. E., Dick, J. K., Gravett, I. M. y Fisher, B. M. 1990. Canopy management to improve grape yield and wine quality – Principles and practices. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 11, 3-17.
- Smart, R.E. y Coombe, B. G. 1983. Water relations in grapevines. In T.T. Kozlowsky ed. *Water deficits and plant growth*. Academic Press Inc, New York. 3, 137-196.
- Smart, R.E., Smith, S.M. y Winchester, R.V. 1988. Light quality and quantity effects on fruit ripening for Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 250-258.
- Smith, M.A. 1990. The involvement of polyamines in the genetic and gibberellic acid control of internodal growth on peas. In: *Biochemistry, Physiology and Interactions Polyamines and Ethylene*. HE Flores, R N Allens, J C Shannon (eds). *Amer. Soc. Plant Physiol.* Pp. 101-111.
- Soleas, G.J., Goldberg, D.M., Ng, E., Karumanchiri, A., Tsang, E. y Diamandis, E.P. 1997. Comparative Evaluation of Four Methods for Assay of *cis*- and *trans*-Resveratrol. *Am. J. Enol. Vitic.* 48 (2), 169-176.

- Soleas, G.J. y Goldberg, D.M. 1999. Analysis of antioxidant wine polyphenols by gas chromatography-mass spectrometry *Methods Enzymol.* 299, 137-151.
- Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M. y Diamandis, E.P. 2002. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin. Biochem.* 35, 119-124.
- Spanu, P., Reinhardt, D. y Boller, T. 1991. Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* 10, 2007–2013.
- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L. y Ferguson, J.C. 2002. Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53 (3), 171-182.
- Spranger, M.I., Climaco, M.C., Sun, B., Eiriz, N., Fortunato, C., Nunez, A. Leandro, M.C., Avelar, M.L. y Belchior, A.P. 2004. Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Anal. Chim. Acta.* 513, 151-161.
- Steber, C.M y McCourt, P. 2001. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 125, 763-769.
- Stockley, C.S. y Hog, P.B. 2005. Better wine for better health: fact or fiction. *Aust. J. Grape and Wine Res.* 11, 127-138.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology Second Edition*. Chapter 25 Stress Physiology. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pp 725-757.
- Travaglia, C., Cohen, A., Reinoso, H., Castillo, C. y Bottini, R. 2007. Exogenous abscisic acid increases carbohydrate accumulation and redistribution to the grains in wheat grown under field conditions of soil water restriction. *J Plant Growth Regul* 26, 285-289.
- Vallone, R. 1998. Tesis de Magister Scientiae. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
- Vallone, R. C., Nijensohn, L., Cavagnaro, J. B., Merlo, E. E., Maffei, J. A. y Ojeda, H. 2004. Validation of a simple biological indicator of plant water

- status to determine irrigation timing of grapevines (*Vitis vinifera* L). *Acta Hort* 646, 77-89.
- Vallone, R.C., Perez Peña, J., Nijensohn, L. y Cavagnaro, J.B. 1997. Effects of water stress on vegetative and reproductive growth and the enologic quality on cv. Sangiovesse. *Proceeding XXI Congrès de la Vigne et du Vin*, Office International de la Vigne et du Vin, Buenos Aires Vol I: 361-376.
 - Vitrae, X., Monti, J-P., Vercauteren, J., Deffieux, G., Merillon, J-M. 2002. *Anal. Chim. Acta* 458, 103.
 - Volmaro, C., Pontin, M., Luna, V., Baraldi, R. y Bottini, R. 1998. Blue light control of hypocotyl elongation in etiolated seedlings of *Lactuca sativa* (L.) cv. Grand Rapids related to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA3 and abscisic acid. *Plant Growth Regulation* 26, 165–173.
 - Vrhovsek, U., Mattivi, F. y Watanabe, A.L. 2001. Analysis of red wine phenolics: comparison of HPLC and spectrophotometric methods. *Vitis* (2) 40, 87-91.
 - Wang, K.L.C, Li, H. y Ecker, J.R. 2002. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*, Supplement 2002, S131-S151.
 - Watkins, C.B., Nock, J.F. y Whitaker, B.D. 2000. Response of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Biol. Technol.* 19, 17-32.
 - Wery, J. 2005. Differential effects of soil water deficit on the basic plant functions and their significance to analyse crop responses to water deficit in indeterminate plants. *Australian Journal of Agricultural Research*. 56 (11), 1201–1209.
 - Westgate, M.E. y Boyer, J.S. 1985. Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta*. 164 (4), 540-549.

- Williams, G.M. y Iatropoulas, M.J. 1997. Anticarcinogenic effects of synthetic phenolic antioxidants in Oxidants, antioxidants and free radicals. New York: Taylor and Francis. 3, 41-351.
- Williams, L. E. y Matthews, M. A. 1990. In: Irrigation of agricultural crops. Pp 1019- 1055. Agronomy monograph no. 30. Amer. Soc. Agronomy, WI, USA.
- Williams, L.A., Dokoozlian, N. K. y Wample, R. 1994. Grape. Chapter 4: 85-133. In: Handbook of environmental physiology of fruit crops. Eds. B. Schaffer and P.C. Andersen. CRC Press Inc. Florida.
- Xu, N. y Bewley, J.D. 1995. The role of abscisic acid in germination, storage protein synthesis and desiccation tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, as shown by inhibition of its synthesis by fluridone during development. Journal of Experimental Botany 46, 687-694.
- Yang, J. y Zhang, J. 2006. Grain filling of cereals under soil drying. Transley Review. New Phytol 169, 223-236.
- Yang, S.F. y Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 35, 155-189.
- Yoshioka, T., Endo, T. y Satoh, S. 1998. Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. Plant Cell Physiology 39, 307-312.
- Yurkanis Bruce, P. 2008. Química Orgánica. Quinta edición. Pearson Education. Pp 513-515.
- Zeevaart, J.A.D. y Creelman, R.A. 1988. Metabolism and Physiology of Abscisic Acid. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 39, 439-473.
- Zhang, J. y Davies, W. 1990. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. Plant, Cell and Environment. 13, 277-285.
- Zhang, J. y Davies, W.J. 1989. Sequential Response of Whole Plant Water Relations to Prolonged Soil Drying and the Involvement of Xylem

- Sap ABA in the Regulation of Stomatal Behaviour of Sunflower Plants. *New Phytologist*. 113 (2), 167-174.
- Zhang, S. y Outlaw, W. Jr. 2001. Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard-cell apoplast and causes stomatal closure. *Plant Cell Environment*. 24, 1045-1054.
 - Ziliotto, F., Botton, A., Bonghi, C. y Tonutti, P. 2003. Effect of 1-MCP on nectarine fruit postharvest physiology. In: Vendrell, M., Klee, H., Pech, J.C., Romojaro, F. (Eds.), *Biology and Biotechnology of the Plant hormone Ethylene III*. IOS Press, pp. 457-458.
 - Zufferey, V. 2000. Echanges gazeaux des feuilles chez *Vitis vinifera* en fonction des parametres climatiques et physiologiques et des modes de conduite de la vigne. These présentée a l' Ecole Polytechnique Federale du Zurich.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



66200

66200

