

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**CONTENIDO DE PROTEÍNAS PATOGENICAS E INESTABILIDAD PROTEICA
DE JUGOS DE UVA BLANCA CV. SAUVIGNON BLANC Y CHARDONNAY (*Vitis
vinifera L.*): DIFERENCIA ENTRE CLONES, VARIEDADES Y ZONAS DE
PRODUCCION.**

CATALINA ALEJANDRA DÍAZ GUTIÉRREZ

Santiago, Chile

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**CONTENIDO DE PROTEÍNAS PATOGENICAS E INESTABILIDAD PROTEICA
DE JUGOS DE UVA BLANCA CV. SAUVIGNON BLANC Y CHARDONNAY (*Vitis
vinifera L.*): DIFERENCIA ENTRE CLONES, VARIEDADES Y ZONAS DE
PRODUCCION.**

CONTENTS OF PATHOGENICS PROTEINS AND PROTEIN STABILITY OF JUICE
OF WHITE GRAPE CV. SAUVIGNON BLANC Y CHARDONNAY (*Vitis vinifera L.*):
DIFFERENCE BETWEEN CLONES, VARIETIES AND PRODUCTION ZONES.

CATALINA ALEJANDRA DÍAZ GUTIÉRREZ

Santiago, Chile

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**CONTENIDO DE PROTEÍNAS PATOGÉNICAS E INESTABILIDAD PROTEICA
DE JUGOS DE UVA BLANCA CV. SAUVIGNON BLANC Y CHARDONNAY (*Vitis
vinifera L.*): DIFERENCIA ENTRE CLONES, VARIEDADES Y ZONAS DE
PRODUCCION.**

Memoria para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo, mención Enología y Vitivinicultura.

CATALINA ALEJANDRA DÍAZ GUTIÉRREZ

PROFESORES GUIAS	Calificaciones
Álvaro Peña Neira. Ingeniero Agrónomo Enólogo, Dr.	6,6
Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	7,0
PROFESORES EVALUADORES	
Eduardo Loyola Madariaga Ingeniero Agrónomo Enologo, Dr.	6,5
Jurij Wacyk Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	6,3

Santiago
2012

ÌNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Lugar de trabajo	9
Materiales y métodos	9
Obtención de jugos	10
Preparación de muestras.....	10
Análisis básicos.....	11
Estabilidad Proteica del jugo.....	11
Contenido de proteínas totales	11
Detección de proteínas	12
Identificación de proteínas tipo taumatina y quitinasa en geles de poliacrilamida-SDS	13
Determinación y cuantificación de proteínas tipo taumatina y quitinasa por Cromatografía Líquida de Fase Reversa	15
Diseño Experimental.....	17
Análisis estadístico.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
SUBCAPÍTULO 1. “Identificación de las proteínas patogénicas en los jugos obtenidos de los cv. Sauvignon blanc y Chardonnay del valle de Casablanca.”	19
1.1 Análisis por RP-HPLC.....	20
1.2 Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS.....	25
SUBCAPÍTULO 2 ... “Evolución de las proteínas patogénicas y su relación con el contenido total de proteínas y con la turbidez de jugos de Sauvignon blanc y Chardonnay de zona cálida y fría del valle de Casablanca durante la maduración”	32

2.1. Evolución de distintos clones del cv. Sauvignon blanc en la zona cálida del valle de Casablanca.	32
2.1.1.- Concentración de Proteínas Totales.....	32
2.1.2. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez.....	33
2.1.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración.	35
2.2. Evolución de distintos clones del cv. Sauvignon blanc en la zona fría del valle de Casablanca.	37
2.2.1.- Concentración de Proteínas Totales.....	37
2.2.2. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez.....	38
2.2.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración.	41
2.3. Evolución de distintos clones del cv. Chardonnay en la zona cálida del valle de Casablanca.	43
2.3.1 Concentración de Proteínas Totales	43
2.3.3. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez.....	44
2.3.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración.	47
2.4. Evolución de distintos clones del cv. Chardonnay en la zona fría del valle de Casablanca.	48
2.4.1. Concentración de Proteínas Totales	48
2.4.2. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez.....	49
2.4.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración	50
SUBCAPÍTULO 3_“Análisis general de las variedades”	52
CONCLUSIONES	54
APÉNDICE I.....	60
APÉNDICE II	64
ANEXOS	70

Con todo corazón para mi abuelo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis, y en forma muy especial:

- A mis padres, Camilo y Jimena, por todo su apoyo que me han brindado incondicionalmente, y sobre todo en este momento tan esperado y especial, la finalización de mis estudios profesionales.
- A mi familia por el ánimo y apoyo, a mis abuelos por sus consejos y sabiduría infinita. A mi hermano, Camilo, por su paciencia en mis cambios de humor en este proceso. A mis tíos, tías e infinitos primos que son parte de mi corazón y que de alguna forma han ayudado a concretar este proyecto.
- A mis profesores guías Álvaro Peña-Neira y Remigio López, por su paciencia, ayuda y disposición, sobretodo el profe Remigio, que fue un apoyo total, por su amistad, comprensión en tiempos difíciles y su ayuda infinita para conmigo. También a mi profesor consejero, Eduardo Loyola, por su apoyo y buenas conversaciones.
- A las personas que trabajan en el Departamento de Agroindustria y Enología, especialmente a Rosita, quien me dio un lugar de trabajo. Y a Lily, por su paciencia en este último tiempo.
- A mis amigos y compañeros, que me han apoyado a mi lado o a la distancia con su amistad y su preocupación.
- Finalmente, a los que no están pero que me han apoyado desde algún lugar, especialmente a mi abuelo Carlos que desde el cielo me ha ayudado, escuchado y apoyado, y me está esperando al final de este largo camino.

RESUMEN

Las proteínas de tipo taumatina y las quitinasas, familias de proteínas solubles presentes en la baya de *Vitis vinifera* son responsables de la formación de turbidez y sedimentos en vinos blancos embotellados. En consecuencia, estas proteínas relacionadas a la patogénesis tienen una gran influencia en la calidad del vino.

El principal objetivo de este estudio fue determinar el contenido de proteínas totales y específicas (taumatina y quitinasa), y la estabilidad proteica en jugos de uvas que fueron cosechadas en diferentes etapas de desarrollo (entre envero y cosecha). El estudio se realizó en variedades Sauvignon blanc (clon 1, 107 y 242) y Chardonnay (clon 4, 5 y Mendoza) provenientes de dos zonas de producción del Valle de Casablanca, Chile. El contenido de proteínas totales fue determinado mediante el método de Bradford y el contenido de proteínas específicas (tipo taumatina y quitinasa) fue detectado por RP-HPLC. La formación de turbidez o sedimentos en el jugo de uva libre es indicador de inestabilidad térmica. Los resultados indicaron que el contenido de proteínas totales y el contenido de proteínas específicas fueron proporcionales a la formación de turbidez o inestabilidad proteica del jugo obtenido durante todo el período de maduración estudiado, independiente de la variedad, clon, o zona de producción. En la mayoría de los casos el contenido de las proteínas taumatina y quitinasa aumenta con el tiempo de desarrollo de la baya.

Palabras clave: Proteínas patogénicas, Turbidez, Clones, Sauvignon blanc, Chardonnay.

ABSTRACT

Thaumatin-like proteins and chitinases, two soluble protein families occurring in *Vitis vinifera* grapes, have been associated to hazing in bottled white wines. Thus, these pathogenesis-related proteins have a major influence on wine quality.

The main aim of this study was to determine the content of total protein and the content of specific proteins (thaumatin-like and chitinase) as well as protein stability in the juice of grapes that were collected at various ripening stages between véraison and harvest. The study was conducted on the Sauvignon blanc (clones 1, 107 and 242) and Chardonnay (clones 4, 5 and Mendoza) *V. vinifera* varieties from two different production zones in the Casablanca Valley, Chile. Total protein content was determined by spectrophotometry using the Bradford's method. Contents of thaumatin-like and chitinase proteins were obtained by RP-HPLC analysis.

Hazing and sedimentation in the grape juice indicates thermal instability. In the study we observed that both the content of total protein and the content of the specific proteins in the grape juices vary in direct relationship with hazing or protein instability throughout the ripening period, regardless the grape variety, clone or production zone. Contents of thaumatin-like and chitinase proteins were usually found to increase with grape maturation.

Key words: Pathogenesis-related proteins, hazing, clone, Sauvignon blanc, Chardonnay.

INTRODUCCIÓN

La viticultura hoy en día es una de las actividades con mayor importancia en Chile, principalmente por los altos estándares de calidad de los productos y por los retornos económicos obtenidos. Las variedades tintas son las que representan la mayor producción nacional, aunque las variedades blancas han cobrado cada vez más relevancia, especialmente por la diversidad de tipicidades que se pueden obtener. De éstas las variedades más importantes en volumen de producción son Sauvignon blanc y Chardonnay.

La vinificación depende directamente de la calidad de la materia prima, por lo que cobran mucha importancia diversas decisiones relacionadas con el manejo del campo, tales como, la elección de los clones y portainjerto, aplicación de estrés hídrico, densidad de plantación, entre otros. Tales factores influyen directamente sobre el rendimiento, el crecimiento, el tamaño y la concentración de los componentes en la baya. Las técnicas de manejo del cultivo y la elaboración del vino pueden aprovechar muchas de las características de un clon, sobre todo aquellas que influyen en el estilo y calidad del vino (Hidalgo, 2006). Otro factor que afecta la calidad de los vinos es la zona de plantación, asociada al clima, ya que determina la madurez óptima del fruto, además de permitir una buena acumulación de azúcares, una buena acidez natural y el control de podredumbre de los frutos. Otro factor que afecta la calidad del vino es el proceso de vinificación: prensado, macerado pre y post fermentativo, temperatura, elección de levadura, entre otros son factores determinantes en el aprovechamiento de la materia prima (Zoecklein *et al.*, 2001).

El proceso de vinificación termina cuando se pasa por la etapa de post-fermentación, en la que se incluyen los procesos de estabilización y el tiempo en botella. Esta etapa es fundamental, ya que, una vez terminada la fermentación, los vinos se encuentran turbios o

con una gran cantidad de partículas tales como, restos de microorganismos, depósitos de azúcares, tartratos, pectinas, coloides de gran tamaño, entre otros (Siebert, 1999). Por ello, en algunos vinos, como blancos y rosé, los procesos de estabilización de tartratos a bajas temperaturas y clarificación, tienen como finalidad eliminar todas las partículas en suspensión (Blouin y Peynand, 2004). Todos los manejos que se realizan en esta etapa tienen como objetivo mantener la calidad de los vinos, condición que puede verse afectada por la presencia de sedimentos y enturbiamientos durante el embotellado (Waters *et al.*, 1991).

En los vinos blancos, y en ocasiones en los vinos rosé, los procesos de post fermentación tienen como finalidad adicional disminuir la probabilidad de que ocurran turbideces asociadas a la desnaturalización de proteínas inestables (Esteruelas *et al.*, 2009). Este tipo de turbidez se debe, principalmente, a la disminución de las interacciones entre ciertas proteínas con compuestos fenólicos (Zoecklein, 1991), ocasionadas por altas temperaturas durante periodos prolongados en el tiempo de almacenamiento (Sauvage *et al.*, 2010). El enturbiamiento o los flóculos producidos por la desnaturalización pasan a constituir un problema importante que involucra a los consumidores, quienes perciben los vinos como defectuosos o comercialmente inaceptables (Waters *et al.*, 1998; Maragon *et al.*, 2009), y porque reducen drásticamente el valor comercial de los vinos (Tattersall *et al.*, 2001).

Las proteínas son unos de las partículas coloidales con mayor presencia en los vinos. Tienen diversos orígenes pues pueden proceder de la uva misma, de las levaduras por autólisis y de los productos de clarificación o de los coadyuvantes de tiraje de naturaleza proteica (Zamora, 2003). Las concentraciones pueden variar entre 10 y 500 mg/L independiente del proceso de vinificación (Batista *et al.*, 2009). Sin embargo, es preciso considerar que el contenido total de proteínas no es un índice directo de estabilidad, y no se puede usar para predecir la inestabilidad proteica de los vinos (Zoecklein *et al.*, 2001).

Los enturbiamientos proteicos del vino son causados fundamentalmente por proteínas propias de la uva, a las que se ha denominado como Patogénicas. Éstas son sintetizadas desde la pinta (o envero) hasta la cosecha (Pocock *et al.*, 2000; Hayasaka *et al.*, 2001; Giribaldi *et al.*, 2007). En esta etapa se puede identificar un aumento importante en el contenido de proteínas totales, lo que finalmente se relacionaría con un aumento en el potencial grado de enturbiamiento (Monteiro *et al.*, 2007).

La concentración de las proteínas patogénicas va estar determinada por la variedad, cosecha, madurez, condición sanitaria, pH de la fruta y la vinificación de la misma (Zoecklein, 1991; Sauvage *et al.*, 2010), además de estar directamente relacionada con el clima de la zona de producción (Zoecklein *et al.*, 2001; Waters *et al.*, 2005). Estas proteínas son solubles en el jugo de uvas maduras y son muy simples, con un predominio de proteínas de bajo peso molecular (rango de 9-66kDa) y con puntos isoeléctricos entre 3 y 9 (Brissonnet y Maujean, 1993; Tattersall *et al.*, 1997; Sauvage *et al.*, 2010).

Según Van Loon y Van Strien (1990), las proteínas patogénicas son originadas como un mecanismo de defensa frente a distintos tipos de estrés. Entre estos están los estrés abióticos, como shock osmóticos, deficiencia o excesos hídricos, diferencias extremas de temperatura, entre otras, y estrés bióticos, como son principalmente el ataque de patógenos, insectos, nemátodos e incluso de herbívoros. Otro factor que influye en la síntesis de proteínas patogénicas es el estado sanitario de la uva, principalmente asociado a la presencia de *Botrytis cinerea*, ya que la uva contaminada presenta un mayor contenido de estas proteínas (Deytieux-Belleau *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha observado que uvas completamente sanas, sin haber sido afectadas por ningún ataque de patógenos o insectos, también presentan este tipo de proteínas (Waters *et al.*, 2005).

Estudios recientes han demostrado que estas proteínas también pueden originarse durante la cosecha al momento de cortar el pedicelo, y durante el periodo de transporte de la fruta a través de grandes distancias desde el viñedo hasta el lugar de prensado como respuesta a estrés. Se considera que a partir de la cosecha se requieren 24 horas para la activación de los genes que producen las proteínas (Pocock *et al.*, 1998).

Las proteínas patogénicas han sido clasificadas en cinco familias o grupos (Bol *et al.*, 1990). El primer grupo denominado PR-1 (16 kDa) carece de funciones conocidas, aunque Lawton *et al.*, (1993) han asignado funciones antifúngicas a proteínas específicas de este grupo. En el segundo grupo (PR-2) se ubican las glucanases (25-41 kDa) las cuales degradan las β -glucanases en las paredes celulares de los patógenos. El tercer grupo según Linthorst (1991), está compuesto por las quitinasas (28-34 kDa). El cuarto grupo comprende a proteínas de bajo peso molecular (13- 14,5 kDa) y sin funciones conocidas y finalmente el quinto grupo se subdivide en taumatinas (24 kDa) y otras proteínas (45 kDa) de funciones desconocidas. En este último grupo se han observado actividades sobre la permeabilidad de las membranas celulares y actividades antifúngicas.

Entre las proteínas patogénicas más predominantes durante la maduración de las uvas están las proteínas solubles, taumatina y quitinasa (Robinson y Davies, 2000). Estas proteínas son capaces de ser traspasadas desde la pulpa a los vinos, principalmente porque presentan características tales como ser resistentes a pH bajos, a la hidrólisis enzimática o a la degradación pectolítica (Tattersall *et al.*, 1997; Waters *et al.*, 1998; Pocock *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2004).

La taumatina y quitinasa son proteínas pequeñas. Sus pesos moleculares están en el rango de 24-25 kDa en el primer caso y 32-35 kDa en el segundo (Waters *et al.*, 1991; Pocock *et al.*, 2000). La presencia y concentración de este tipo de proteínas patogénicas puede variar

de acuerdo a la variedad de uva. Por ejemplo, en el caso de Sauvignon blanc la taumatina representa el 70% de la masa total de proteínas (Peng *et al.*, 1997). A pesar que su concentración puede variar, la taumatina es la proteína de mayor presencia en los vinos y la responsable en gran medida de los enturbiamientos (Waters *et al.*, 1996; Tattersall *et al.*, 1997; Høj *et al.*, 2000). Se ha señalado que a una misma concentración relativa, las proteínas de peso molecular 24 kDa causan hasta un 50% más de enturbiamiento en los vinos. Esto sugiere fuertemente que este tipo de proteína es la más importante en este problema (Waters *et al.*, 1992)

Tanto taumatina como quitinasa constituyen familias de proteínas. En el caso de la taumatina (TL) se ha identificadas tres subtipos de proteínas viníferas, denominadas VVTL1, VVTL2 y VVTL3. En el caso de la Quitinasa, se han identificados hasta seis subtipos en variedades viníferas denominadas ChitA, ChitB, ChitC, ChitD, ChitE y Chit F. En el caso del presente estudio la ChitA y ChitB, serian los de mayor importancia debido a que son los subtipos identificados en los variedades estudiados (Waters *et al.*, 1996).

A pesar que parecen perfectamente identificados los agentes causantes de la turbidez proteica, así como el origen de los mismos, todavía no está clara la relación entre su contenido y la producción de turbidez en mostos y en vinos blancos después del embotellado. En principio se ha señalado que la formación de turbidez no depende del contenido total de proteínas (Tattersall *et al.*, 1997). A nivel de vinos se sabe que a medida que aumenta el contenido total de proteínas patogénicas (del tipo taumatina y quitinasa) la formación de turbidez aumenta. En mostos, aún no está definido cual de las dos proteínas genera mayor grado de turbidez.

Aún queda mucho por conocer con respecto a los efectos de algunas condiciones agronómicas y enológicas sobre la presencia y concentración de las proteínas patogénicas

en el vino. El conocimiento de estas condiciones permitiría disminuir el uso desmedido de bentonita como clarificante y los efectos negativos que ésta ocasiona en la calidad de los vinos. Así que el mayor conocimiento de estas proteínas permitiría proponer una tecnología alternativa que reemplace o disminuya el uso de dicho clarificante (Salazar *et al.*, 2006, 2007a, 2007b y 2009). Por lo antes señalado, en este estudio se planteó los siguientes objetivos:

Objetivo principal:

Determinar el contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de jugos de uva de variedades Sauvignon blanc y Chardonnay durante diferentes estados de madurez.

Objetivos específicos:

Determinar el grado de inestabilidad proteica y el contenido total de proteínas en jugos de uva de los variedades Sauvignon blanc y Chardonnay en distintos estados de madurez.

Identificar y cuantificar las proteínas patogénicas presentes en jugos de uva de los variedades Sauvignon blanc y Chardonnay mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución y electroforesis en geles de poliacrilamida.

Relacionar el tipo de clon y la zona de producción (zona cálida y fría) con el contenido de proteínas patogénicas e inestabilidad proteica de los jugos de uva de los variedades Sauvignon blanc y Chardonnay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

Los análisis se realizaron en los Laboratorios de Química Enológica y Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas y en el Laboratorio de Biología Supramolecular (Programa de Biología Celular y Molecular) del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina, ambos de la Universidad de Chile.

Materiales y métodos

El estudio se realizó con muestras de uva de los cv. Sauvignon blanc y Chardonnay, del Valle de Casablanca, aportadas por las viñas Veramonte y Casas del Bosque, durante la vendimia 2009 (Cuadro1).

Se emplearon bayas de clones en distintos estados de madurez, obtenidas entre la etapa de envero (85% color de los racimos) y la etapa de cosecha. Las muestras se tomaron con intervalos de 10 días, efectuándose un mínimo de tres muestreos para cada clon estudiado.

El número de racimos utilizados para la elaboración de los jugos fue dependiente del tamaño del cuartel. Se eligieron dos hileras. Las plantas fueron marcadas y en las fechas de recolección se tomaron aproximadamente 40 bayas por hilera.

Cuadro 1. Resumen de las variedades, clones y zonas de producción consideradas en este estudio.

Zona de Producción	Variedad	Clon
Casablanca Alto (zona cálida, Veramonte)	Sauvignon blanc	242
		1
		107
Casablanca Bajo (zona fría, Casas del Bosque)	Sauvignon blanc	242
		1
		107
Casablanca Alto (zona cálida, Veramonte)	Chardonnay	4
		5
		Mendoza
Casablanca Bajo (zona fría, Casas del Bosque)	Chardonnay	75
		Mendoza

Obtención de jugos

Los jugos utilizados en el estudio fueron obtenidos por presión manual de las bayas. Se utilizó un paño fino de nylon como tamiz, con el fin de evitar el paso de partículas de gran tamaño.

Preparación de muestras

Los jugos fueron centrifugados a 7.000 rpm (9.800 x g) durante 30 minutos a 4°C, para esto se utilizó una centrifuga Eppendorf, modelo 5804R. Los sobrenadantes obtenidos fueron pasados por filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm con la ayuda de una bomba de vacío, Rocket, modelo 400, Arquimed, Chile. El filtrado resultante corresponde a las muestras de jugo de uva que fueron empleadas en los diversos ensayos. Estas muestras fueron guardadas en tubos Falcon de 50 mL y en alícuotas de 1mL a -20°C hasta el momento de su empleo.

Análisis básicos

Los análisis básicos de pH y sólidos solubles se realizaron según Bordeau y Scarpa (2000). Y se utilizó un refractómetro de bolsillo Atago, Pal-1, Japón y un peachímetro Hanna Instruments, modelo H1221, Rumania. Para su calibración se consideró sólo un punto y se utilizó un buffer pH 7,0, obtenido en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU.

Estabilidad Proteica del jugo

La estabilidad proteica (estabilidad térmica) fue determinada mediante una prueba descrita por Salazar *et al.*, (2006). Para ello, a cada muestra de jugo de uva se le determinó la turbidez inicial (T1). Luego, la muestra de jugo fue incubada en un baño termoregulado a 80°C por 2 horas y media. Luego de enfriar en agua fría se dejó reposar la muestra hasta que alcanzó la temperatura ambiente y, finalmente, se volvió a medir la turbidez (T2). La inestabilidad proteica es proporcional a la diferencia de turbidez (NTU) de la muestra antes del calentamiento (T2-T1). Las muestras de jugos son consideradas inestables proteicamente cuando el NTU resultante es mayor que 2.

La determinación de la estabilidad de los jugos se realizó con un turbidímetro Turbiquant modelo 1100 IR, Alemania. El baño termorregulador utilizado fue Memmert modelo WNB-7.

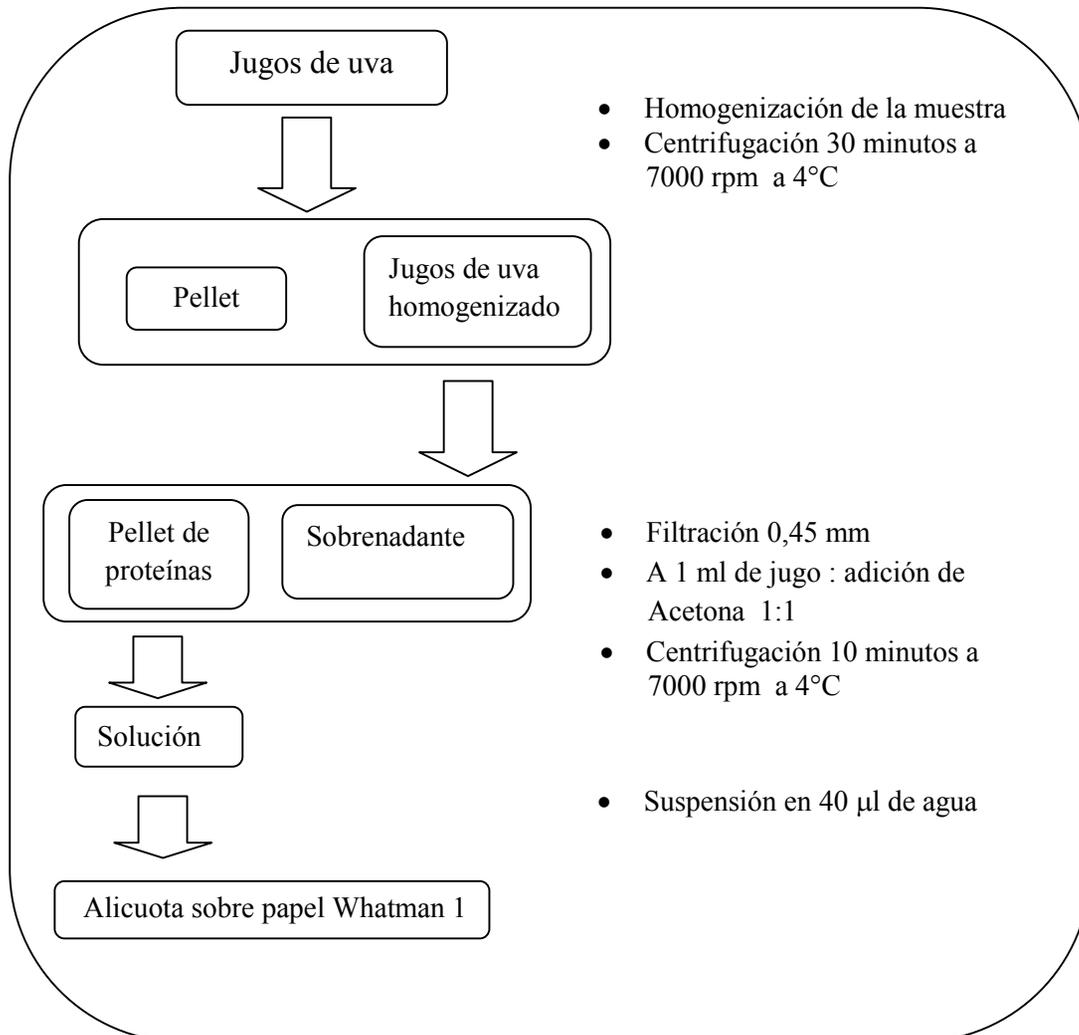
Contenido de proteínas totales

Las proteínas totales fueron determinadas mediante el método de Bradford (1976).

Se utilizó el método de estándar externo. Para ello se confeccionaron curvas de calibración empleando un estándar de seroalbúmina bovina (BSA) adquirido en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU. Las lecturas espectrofotométrica, tanto de la solución estándar como de las muestras, fueron realizadas a 595nm.

Detección de proteínas

Alicuotados de jugos fueron empleados para la realización de pruebas semicualitativas de detección. Con este fin, las proteínas de los jugos fueron concentradas por precipitación con acetona sobre una matriz de celulosa mediante fijación y tinción con un colorante selectivo para proteínas (Figura 1.1).



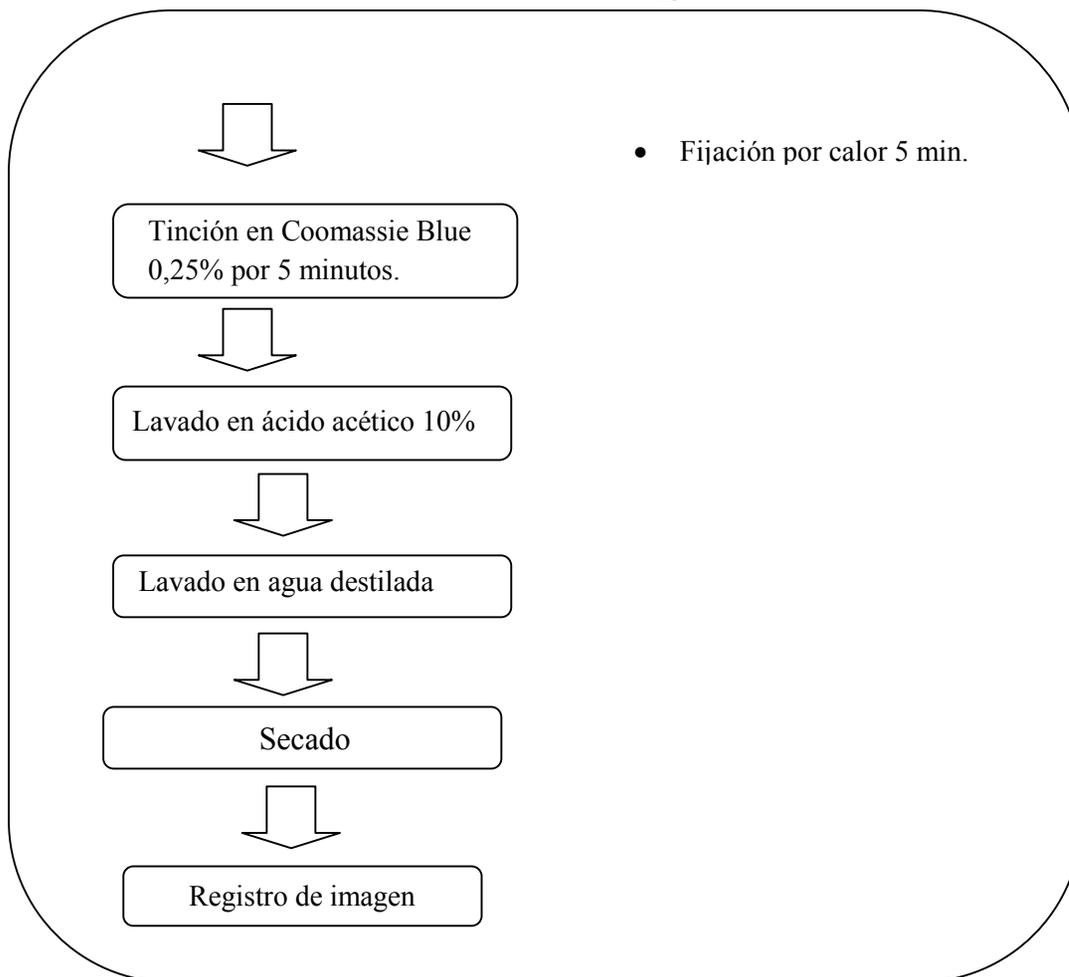


Figura 1.1. Preparación de las muestras para detección de proteínas.

Para la detección de proteínas en los jugos se utilizó el colorante Coomassie Blue R-250 adquirido en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU y laminas de celulosa Whatman 1 obtenidas de Whatman Ltd., Maidstone, England.

Identificación de proteínas tipo taumatina y quitinasa en geles de poliacrilamida-SDS

A partir de 10 mL de jugo se preparó un pellet de proteínas según la primera parte del procedimiento de la Figura 1.1. El pellet fue suspendido y disuelto en 30 μ L de un buffer

compuesto por agua destilada (425 μL), 0,5M Tris-HCl (pH 6,8) (125 μL), glicerol (100 μL), SDS 10% (200 μL), β -mercaptoetanol (100 μL) y 0,05% (p/v) azul de bromofenol (50 μL). A este buffer se agregó 40 μL de β -mercaptoetanol adicionales (reductor y disociador de los enlaces disulfuro de las estructuras proteicas) justo antes de su uso. La mezcla proteína-buffer fue calentada a 100°C por 5 minutos, inmediatamente antes de colocar las muestras en los geles (Laemmli, 1970).

Para el fraccionamiento de las proteínas, se confeccionó un gel compuesto por dos partes: un gel superior de concentración (pH 6,8; T=5%; C=2,43%) y un gel inferior de separación a pH 8,73 (T=13% y un C=2,42%). Considerando que las proteínas tipo taumatina y quitinasa poseen pesos moleculares en el rango de 24 -32kDa (Tattersall *et al.*, 1997, Waters *et al.*, 1991) y que el tamaño de los poros del gel puede ser ajustado para optimizar la separación de la muestras, se preparó los geles con un porcentaje relativamente alto de acrilamida (13-15%). Estas concentraciones son adecuadas para la separación de proteínas de pequeño tamaño (menores de 50 kDa), mientras que geles con porcentajes menores de acrilamida (<10%T) son indicados para la separación de proteínas mayores (García, 2000). Las dimensiones de los geles fue de 11x12x0,2 cm. Cada carril del gel fue cargado con un volumen equivalente a 20 μL de muestra. La corrida electroforética vertical se realizó a amperaje constante. Durante el paso del azul de bromofenol por el gel de concentración se aplicaron 25 mA durante un tiempo aproximado de 15 minutos. Una vez que el colorante indicador de avance alcanzó el gel de separación, el amperaje fue elevado a 35 mA durante un tiempo aproximado de 45 minutos, tiempo necesario para que la línea de avance migrara hasta aproximarse del borde inferior del gel. Finalizada la corrida electroforética, los geles fueron fijados durante 2 horas en una solución de isopropanol, ácido acético y agua (15%, 10% y 75% v/v, respectivamente), seguidos de una tinción en una solución 0,25% p/v de Azul de Coomassie R-250 disueltos en isopropanol y ácido acético (45% y 10% v/v respectivamente) durante 8 horas. Los geles fueron desteñidos en una solución de isopropanol- ácido acético- agua (10%, 10% y 80% v/v, respectivamente). Finalmente, los geles fueron lavados brevemente (5 minutos) en agua destilada, para luego ser digitalizados. Los geles fueron calibrados mediante el fraccionamiento de una mezcla de

proteínas de peso molecular conocido. Se busco identificar la presencia de bandas de geles en el rango entre 24-32 kDA.

Para los geles de poliacrilamida-SDS utilizados en la identificación de proteínas patogénicas se empleó Acrilamida, Bis-acrilamida (NN'-methyl-bis-acrylamide), Tris (2-hydroxymethyl-2-methyl-1,3-propanediol), SDS (sodiumdodecyl sulfate), TEMED (N.N.N'.N'-Tetra-methylethylenediamine), Persulfato de amonio, 2-mercaptoetanol, Glicerol, Azul de bromofenol, Glicina, Ácido clorhídrico y Beta-mercaptoetanol. Las proteínas estándar de peso molecular utilizadas correspondieron a la mezcla BenchMark™ Protein Ladder número 10747-012. Todos los reactivos señalados fueron adquiridos en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU. El fraccionamiento electroforético de proteínas se hizo en una cámara BioJSP, Santiago, Chile asociada a una fuente de poder Haake Bushler 1300. Para la tinción de los geles se empleó Comassie Blue R-250 adquirido en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU. La digitalización de las imágenes de los geles se realizó mediante un escáner Epson Perfection 4490 Photo.

Determinación y cuantificación de proteínas tipo taumatina y quitinasa por Cromatografía Líquida de Fase Reversa.

El fraccionamiento de proteínas de jugo se realizó también mediante cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC) de acuerdo al método descrito por Peng *et al.*, (1997), con modificaciones descritas a continuación.

Las muestras de jugo (20 μ L) fueron cargadas en una columna de fase reversa de tamaño de partícula de 3,5 mm, equilibrada en una mezcla de 17% de solvente A [80% (v/v) acetonitrilo, 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético] y 83% de solvente B [8% (v/v) acetonitrilo, 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético] a 35°C y un flujo de 0,2 mL/min. Las proteínas eluidas fueron detectadas a 210 y 220 nm. La identificación de los picos se efectuó mediante la comparación de los tiempos de retención con los obtenidos de

proteínas puras comerciales y los reportados en estudios previos (Waters *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997; Pocock *et al.*, 1998; Waters *et al.*, 1998; Pocock *et al.*, 2000). La cuantificación de las proteínas individuales se realizó mediante la utilización de curvas de calibración confeccionadas a partir de albumina de suero de bovino como proteína estándar.

Para el uso de cromatografía líquida de fase reversa se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) como estándar la que fue adquirida en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU. Para el fraccionamiento por cromatografía HPLC se uso una columna XBridge TM BEH300 C4 de 2,1 x 150 mm Waters, Massachussets, EEUU y un equipo Unicam, modelo Helios Gamma. Los reactivos para las soluciones empleadas en este método fueron adquiridos en Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, EEUU.

Diseño Experimental

El ensayo se realizó considerando dos zonas del Valle de Casablanca, tomando las variedades de Sauvignon blanc y Chardonnay y los clones descritos anteriormente (Cuadro 1). Se estudiaron muestras con distintas etapas de maduración y considerando dos hileras por cada clon y muestreo.

La unidad experimental para el estudio fueron los jugos obtenidos de la recolección de 6 racimos de 6 plantas por cada hilera de los cuarteles correspondientes a los clones estudiados. La unidad muestral, volumen de muestra utilizada para realizar los análisis y correspondieron a cuatro tubos Falcon de 50 mL de jugo. Cada análisis se realizó en duplicado.

Análisis estadístico

Para buscar la relación entre las zonas de producción, variedades, clones, tipo de proteínas y formación de turbidez o inestabilidad proteica, se aplicó un análisis de varianza (*ANDEVA*) de un factor usando el programa STATGRAPHICS Plus 5.1.

Para detectar diferencias estadísticas, se utilizó el test de comparación de Duncan, considerando un nivel de significancia de 5%.

Para el análisis de discriminantes se utilizó el software SPSS v. 17, con el cual se permitió examinar la influencia de la zona de producción, la variedad de uva, el clon o la concentración y tipo de las proteínas patogénicas relacionadas con la estabilidad de las proteínas de los jugos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio consistió en caracterizar las proteínas patogénicas y la inestabilidad proteica que presentaron los jugos obtenidos de muestras de los variedades Sauvignon blanc (clones 1, 107 y 242) y Chardonnay (Mendoza, 4, 5 y 75) durante la temporada 2009, a partir de muestras obtenidas del valle de Casablanca. Para esto se determinó la cantidad de proteínas totales, la concentración de proteínas patogénicas (fraccionamientos por RP- HPLC y por electroforesis en geles de poliacrilamida), y se evaluó la estabilidad proteica.

Las muestras provinieron de dos zonas del valle de Casablanca: zona cálida, viña Veramonte (latitud 33°22'12.69" S y longitud 71°17'40.49" W,) y zona fría, viña Casas del Bosque (latitud 33°19'07.12" S y longitud 71°26'07.12" W). Ambas zonas de producción pertenecen a la serie de suelo Casablanca, caracterizada por ser un Inceptisol, es decir, un suelo con débil desarrollo de los horizontes, pobre y con una baja cantidad de materia orgánica (Anexo 1). En cuanto al clima, la zona se caracteriza por presentar temperaturas medias altas con un promedio de 25°C en verano y una temperatura media anual de 14,4°C¹ (durante el periodo 2009). Las precipitaciones se concentran entre los meses de Mayo y Octubre, con una media anual de 450 mm. Los meses de Noviembre a Abril son considerados secos. La zona cálida de producción corresponde al agroclima Tapihue y muestra en las temperaturas minimas medias, y promedio de temperaturas medias absolutas es 2 y 3°C superiores a la macrozona de Casablanca, zona fría de producción, la cual al ser más baja, resulta ser más fría, con mayor número de heladas y de mayor intensidad, y con mas horas de neblina.

La presentación de los resultados se ha hecho en capítulos independientes. En el primer capítulo se muestra la caracterización de las proteínas patogénicas para cada una de las

¹ Fuente: Agroclima.cl

variedades al momento de la cosecha; en el segundo capítulo se presenta un análisis del total de proteínas totales y específicas (taumatina y quitinasa) en relación a la turbidez que presentaron los jugos en los distintos estados de madurez y, finalmente, en el tercer capítulo se hace un análisis general entre las variedades y clones considerando las variables analizada.

SUBCAPÍTULO 1.

“Identificación de las proteínas patogénicas en los jugos obtenidos de los cv. Sauvignon blanc y Chardonnay del valle de Casablanca.”

En esta parte del estudio se presentan los análisis realizados principalmente en la etapa de cosecha de cada uno de los clones de ambas variedades de *Vitis vinifera*, principalmente por ser la fecha de mayor importancia durante la maduración y por ser la etapa en la que se presenta la mayor concentración de proteínas patogénicas (Pocock *et al.*, 2000). El análisis de los resultados obtenidos se realizó por variedad y zona de producción.

La identificación de las proteínas patogénicas presentes en los jugos de *Vitis vinifera* de las variedades antes mencionadas, se realizó por análisis de RP-HPLC y por electroforesis. Este doble abordaje aseguró que los picos obtenidos por RP-HLPC correspondieran a proteínas con los pesos moleculares esperados según determinación por electroforesis en geles de policrilamida-SDS.

1.1 Análisis por RP-HPLC

Se han identificado dos tipos principales de proteínas patogénicas en vegetales: tipo taumatina y quitinasa. La proteína tipo taumatina, nominada con el símbolo TL, ha sido identificada como la proteína patogénica de mayor concentración en los jugos de uva (Tattersall *et al.*, 1997). En *Vitis vinifera* existen tres tipos de proteínas de tipo taumatina a las que se ha denominado VVTL1, VVTL2 y VVTL3 (Pocock *et al.*, 2000). Tattersall *et al.*, (1997) identificaron a VVTL1 como la proteína patogénica que se presenta en mayor proporción en los jugos libres de uva. Por otra parte, aunque se han identificado hasta seis tipos de quitinasa, nuestro estudio se ha enfocado, principalmente en dos tipos (ChitA y ChitB), atendiendo a su mayor relevancia en las variedades estudiadas (Waters *et al.*, 1996).

En el presente estudio la identificación de las proteínas patogénicas en el jugo libre de uva se uso como referencia el tiempo de retención de un estándar de taumatina, proteína aislada de *Thaumatococcus danielli*. Por otra parte, en nuestro estudio se realizó la cuantificación de las proteínas patogénicas mediante la comparación de áreas de los distintos picos de elución correspondientes al fraccionamiento de distintas cantidades de la proteína albumina serica bovina. Con esta proteína (tiempo de elución 10,9 minutos) se preparó una curva de calibración lineal en el rango de concentraciones entre 5 y 300 mg/L de proteína. Además, para identificar el orden de elución de las proteínas patogénicas se usaron los tiempos de retención de los picos obtenidos en el fraccionamiento por RP-HPLC realizado en este estudio, con los reportados en trabajos análogos anteriores. En aquellos estudios los tiempos de liberación están en el rango son entre 10,9 y 11,2 minutos para VVTL1, entre 12 y 12,5 minutos para VVTL2+VVTL3, entre 15 y 15,7 minutos para ChitA y entre 15, y 16,1 minutos para ChitB. En el presente estudio, los tiempos de retención para las quitinasas (entre 18 y 25 minutos) fueron menores a las señaladas en publicaciones

anteriores, debido a la modificación del protocolo de elución de la columna de HPLC de fraccionamiento total desde 20 a 30 minutos (Peng *et al.*, 1997; Waters *et al.*, 1998; Pocock *et al.*, 2000; Pocock y Waters, 2006).

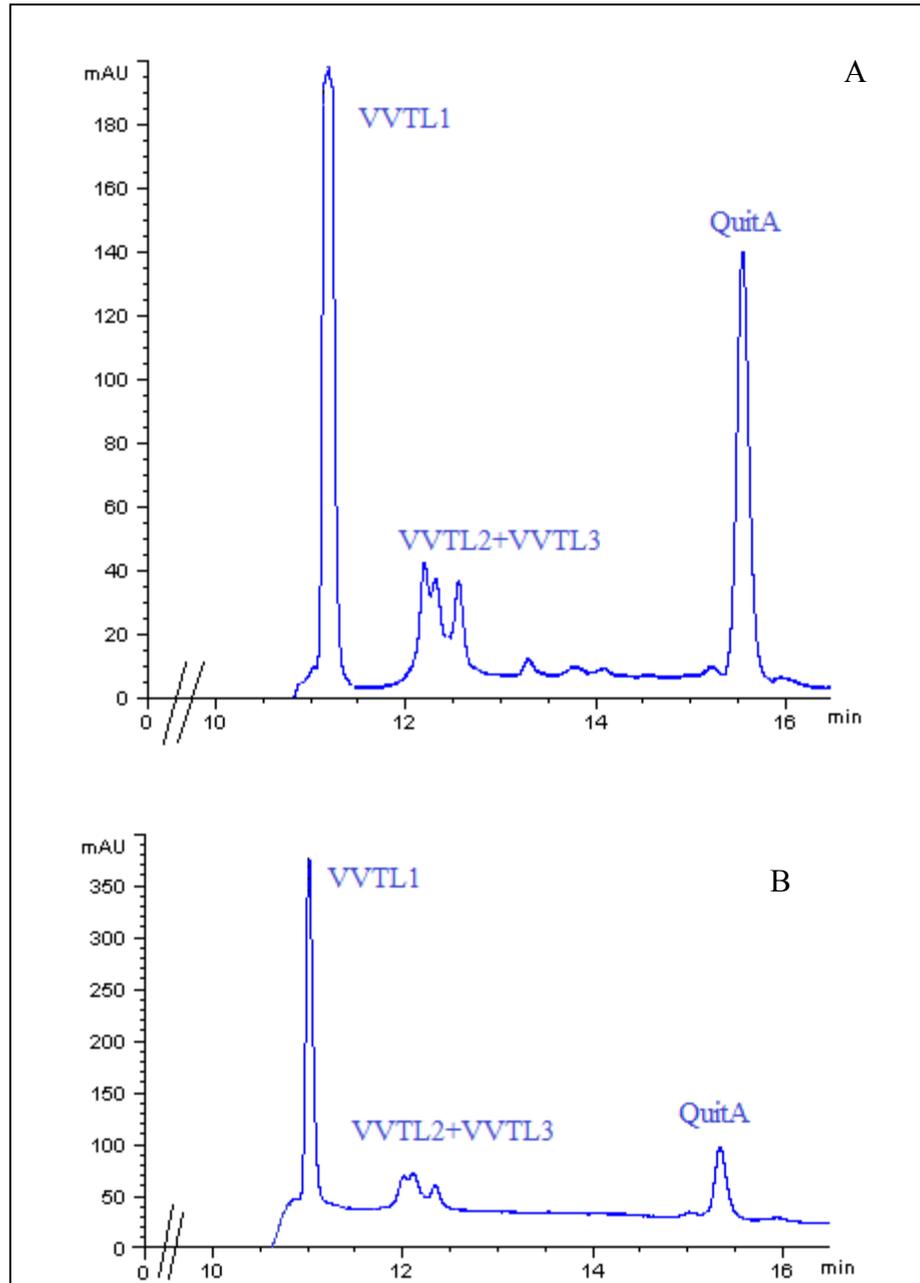


Figura 2.1. Cromatogramas de RP-HPLC de proteínas patogénicas de jugo de Sauvignon blanc del clon 242 de las zonas cálida (A) y fría (B) del valle de Casablanca. Las bayas fueron recolectadas en el tiempo de cosecha.

La Figura 2.1. muestra los cromatogramas de RP-HPLC de la muestra de jugo de uva del c.v. Sauvignon blanc clon 242 de las zonas cálida y fría de producción del valle de Casablanca durante la etapa de cosecha. En ésta se pudo apreciar, al igual que en todos los clones de este cultivar, los tres tipos de TL (VVTL1, VVTL2 y VVTL3) y sólo un tipo de quitinasa (QuitA). En el apéndice I de la tesis, se presentan los cromatogramas correspondientes a los demás clones considerados en este estudio (Figuras 3.1 y 4.1).

A

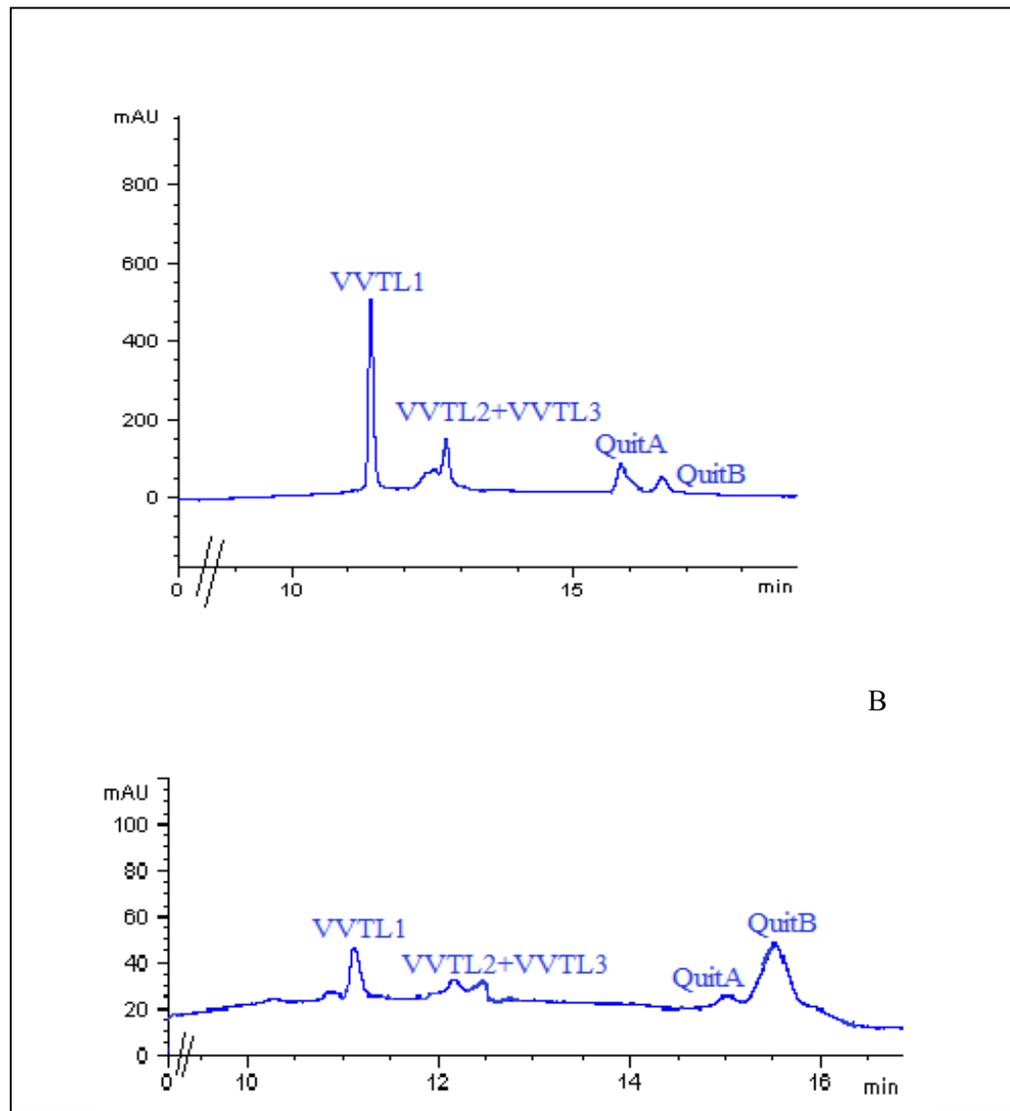


Figura 5.1. Cromatogramas de RP-HPLC de proteínas patogénicas de jugo de Chardonnay del clon Mendoza de las zonas cálida (A) y zona fría (B) del valle de Casablanca. Las bayas fueron recolectadas durante el periodo de cosecha.

En la Figura 5.1. se presentan los cromatogramas correspondientes a las muestras del clon Mendoza del cv. Chardonnay. En ellos se puede distinguir los tres tipos de taumatina (TL), pero a diferencia de lo observado en los jugos del cultivar Sauvignon blanc, se puede apreciar la presencia de quitinasa de tipo B. En este estudio se observó una diferencia importante en las concentraciones de proteínas entre ambas zonas de producción, siendo considerablemente mayor en la zona cálida ($p < 0,05$). En el apéndice I se presentan los cromatogramas del resto de los clones de este del cultivar (Figuras 6.1, 7.1).

Cuadro 1.1. Contenido de proteínas patogénicas de tipo taumatina (VVTL1, VVTL2+VVTL3) y quitinasa (ChitA y ChitB) de los clones de Sauvignon blanc.

		Proteínas patogénicas (BSA mg/L)							
		Taumatina				Quitinasa			
Zona	Clon	VVTL1		VVTL2+VVTL3		Chit A		Chit B	
Cálida	1	59,41p	± 22,74	21,39	± 6,60	40,06	± 14,95	n.d.	
	107	29,33	± 18,95	10,55	± 2,83	10,56	± 9,83	n.d.	
	242	53,90	± 3,30	24,43	± 1,40	54,93	± 4,50	n.d.	
Fría	1	2,80	± 0,28	3,06	± 0,64	2,3	± 0	n.d.	
	107	24,43	± 1,10	16,81	± 0,43	11,96	± 1,23	n.d.	
	242	64,11	± 3,01	43,83	± 2,74	50,24	± 1,34	n.d.	

P: promedio ± DS, 4 repeticiones. n.d. no detectado.

En el Cuadro 1.1. se presentan los contenidos de los distintas proteínas patogénicas del jugo de uvas de Sauvignon blanc de ambas zonas de producción. En todos los casos, VVTL1 fue la proteína más abundante. Según Peng *et al.*, (1997), esta proteína patogénica representa el 47% del total de proteínas presentes en los jugos, independientemente de la zona de producción.

Cuadro 2.1. Contenido de proteínas patogénicas tipo taumatina (VVTL1, VVTL2 + VVTL3) y quitinasa (ChitA y ChitB) de los clones de Chardonnay.

		Proteínas patogénicas (BSA mg/L)							
		Taumatina				Quitinasa			
Zona	Clon	VVTL1		VVTL2+VVTL3		Chit A		Chit B	
Cálida	Mendoza	40,81p	± 1,57	13,14	± 0,37	14,11	± 0,37	4,24	± 0,37
	4	4,95	± 1,34	3,21	± 2,98	3,30	± 2,83	1,74	± 0,94
	5	43,88	± 52,45	20,90	± 23,26	1,22	± 0,24	2,92	± 2,69
Fría	75	14,32	± 16,21	13,44	± 8,65	1,03	± 0,01	2,92	± 2,62
	Mendoza	11,00	± 0,05	13,30	± 13,01	3,25	± 2,05	3,00	± 2,05

P: promedio ± DS, con 4 repeticiones.

En el Cuadro 2.1. se presentan los contenidos de las proteínas patogénicas del jugo de uva Chardonnay de ambas zonas de producción. En la zona cálida, el clon Mendoza presentó la mayor concentración de proteínas patogénicas, siendo VVTL1 la más abundante. En esta zona los mayores contenidos de quitinasas correspondieron a ChitA. En la zona fría, el clon Mendoza también presentó la mayor concentración de proteínas patogénicas totales ($p < 0,05$).

1.2 Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS

Con el estudio semicuantitativo se busco primeramente identificar la presencia de material proteico en los jugos de uva que se proponía analizar. Como se describió antes (Figura 1.1), se depositó alícuota de las distintas muestras sobre láminas de celulosa. Estas fueron fijadas en una solución fijadora de proteínas y luego teñidas con un colorante selectivo para proteínas (Coomassie blue R-250).

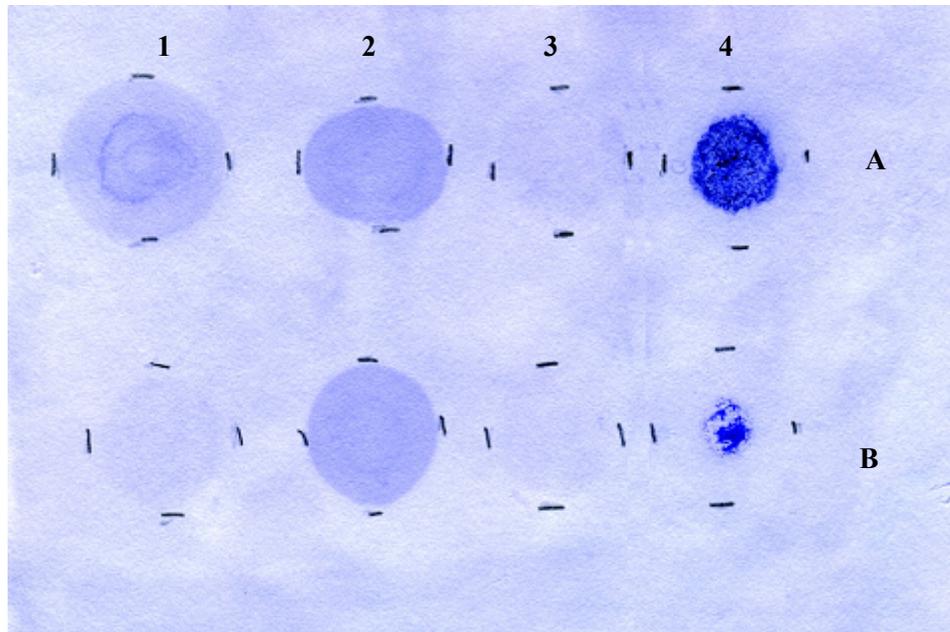


Figura 8.1. Detección de proteínas en jugos de cv. Sauvignon blanc. (A) clon 242 zona cálida, (B) clon 107 zona fría. En ambos casos las muestras pertenecen a la fecha de cosecha. (1) jugo, (2) jugo homogenizado, (3) sobrenadante después de precipitación de acetona 1:1 y (4) pellet acetónico suspendido en agua.

La Figura 8.1 muestra la tinción con Coomassie blue de la fracción proteica en distintas etapas de la preparación de las muestras. Se observó coloración en las fracciones 1, 2 y 4, de los distintos clones. La fracción 2 resultó ser la más similar y homogénea. La mayor diferencia se presentó en la fracción (4), esto es en la muestra obtenida a partir del clon 242 de la zona cálida habitualmente resultó mucho más intensa y dispersa que la muestra correspondiente al clon 107 zona fría, lo que representaría una mayor concentración de proteínas.

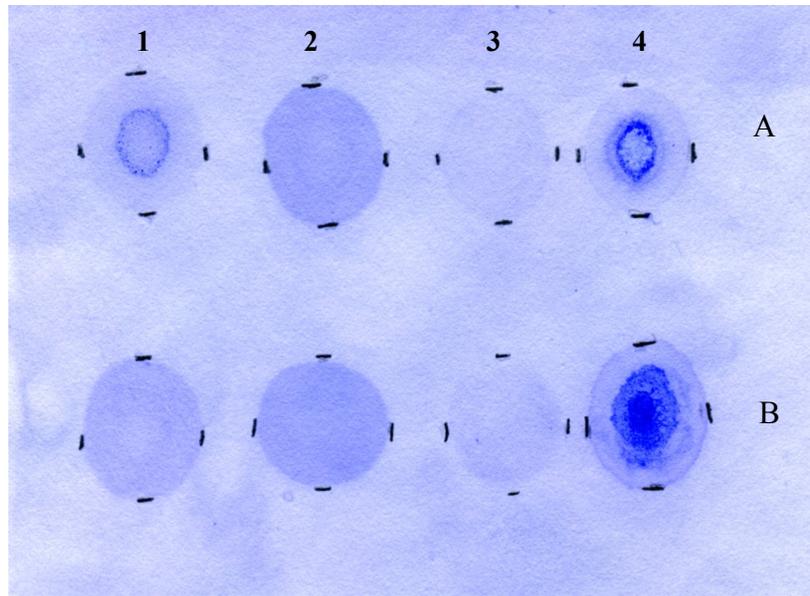


Figura 9.1. Detección de proteínas en jugos de cv. Chardonnay. (A) clon 5 zona cálida, (B) clon Mendoza zona fría. En ambos casos las muestras pertenecen a la fecha de cosecha. (1) jugo, (2) jugo homogenizado, (3) sobrenadante después de precipitación con acetona 1:1 y (4) pellet acetónico suspendido en agua.

En la Figura 9.1. se muestra el mismo ensayo anterior aplicado a los jugos de uva obtenidos de los clones 5 de la zona fría y Mendoza de la zona cálida. La fracción (1), correspondiente al jugo total, muestra una coloración homogénea para el clon Mendoza y heterogénea para el clon 5. Esta última, algo más intensa podría tener una concentración algo mayor de proteínas. En la fracción (2) la coloración observada fue homogénea y similar en intensidad. La fracción (3) presentó una coloración mínima, lo que señala escasa presencia de proteínas. La fracción (4) presentó una coloración intensa principalmente en la zona central no difusible. Esta fracción contiene una alta concentración de proteínas, cuya solubilización y suspensión en agua destilada resultó incompleta, lo que explica la difusión heterogénea observada sobre el papel de celulosa.

Para la detección de proteínas por electroforesis se utilizó el mismo procedimiento de preparación de las muestras utilizado para la detección semicuantitativa de proteínas (Figura 1.1), con la salvedad que se utilizaron 10 mL de muestra, usados en la precipitación acetónica. El pellet resultante se suspendió en 45µl de solución buffer.

Como referencia se empleó una proteína patogénica de tamaño molecular conocido. En el Cuadro 4.1. se presenta el tamaño de las proteínas patogénicas hasta ahora descritas en *Vitis vinifera* (Pocock *et al.*, 2000).

Cuadro 4.1. Pesos moleculares de las proteínas patogénicas de *Vitis vinifera*.

Proteína	Peso molecular kDA (SDS PAGE)
VVTL1	24
VVTL minoría	25
ChitA	32
ChitB	33
ChitC	34
ChitD	35

Fuente: Pocock *et al.*, 2000.

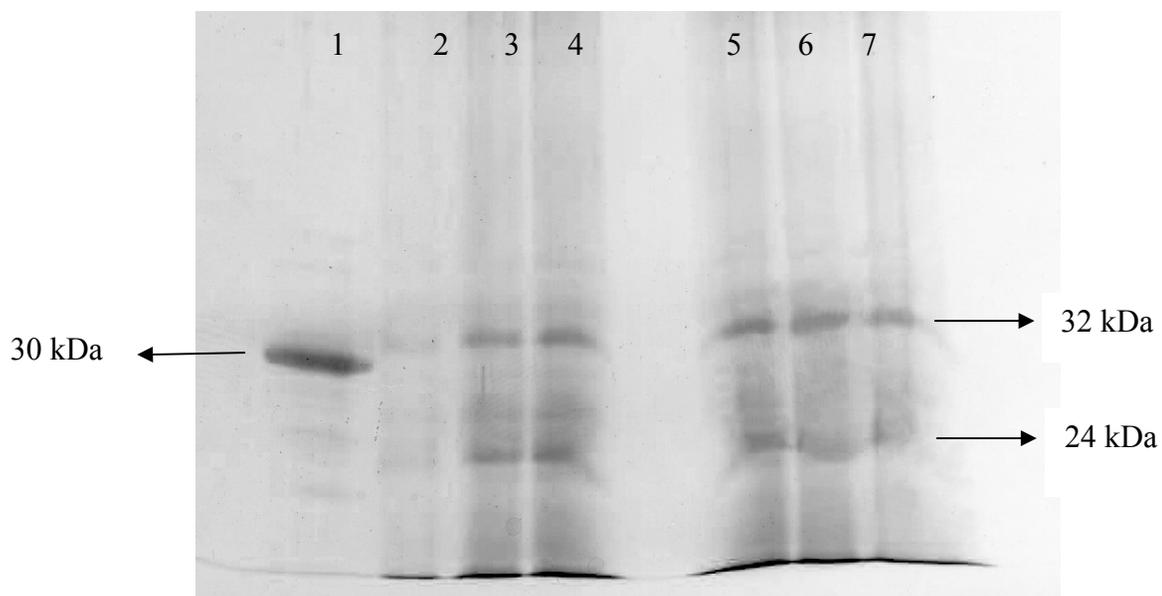


Figura 10.1. Perfil de proteínas (electroforesis SDS-PAGE) de jugo de uva del clon 242 zona cálida perteneciente a la fecha de cosecha. Carril 1: λ caseína (estándar); 2:5 μ L; 3:10 μ L 4:15 μ L; 5:20 μ L; 6:25 μ L; 7:30 μ L.

La Figura 10.1. muestra el fraccionamiento de proteínas de jugos de uva del clon 242 de la zona cálida en la fecha de cosecha. Se incluye, para comparación la migración de una proteína de peso molecular conocido (30 KDa). El fraccionamiento permitió detectar al menos dos bandas. Por su tamaño, la primera correspondería a quitinasa a 32KDa y la segunda banda, de mayor movilidad, correspondería a una proteína tipo taumatina de 24-25KDa. El frente de corrida se tiñó en forma intensa, probablemente debido a la presencia de proteínas de muy bajo tamaño molecular.

En el caso de los clones de Sauvignon blanc se presentaron las bandas de taumatina y solo la banda de ChitA. Al igual que en los cromatogramas anteriores no se detectó ChitB. En la Figura 11.1 se muestra los perfiles electroforéticos de las muestras de distintos clones de

Sauvignon blanc de ambas zonas de producción, mientras que en la Figura 12.1 se muestran los perfiles electroforéticos de los clones de Chardonnay.

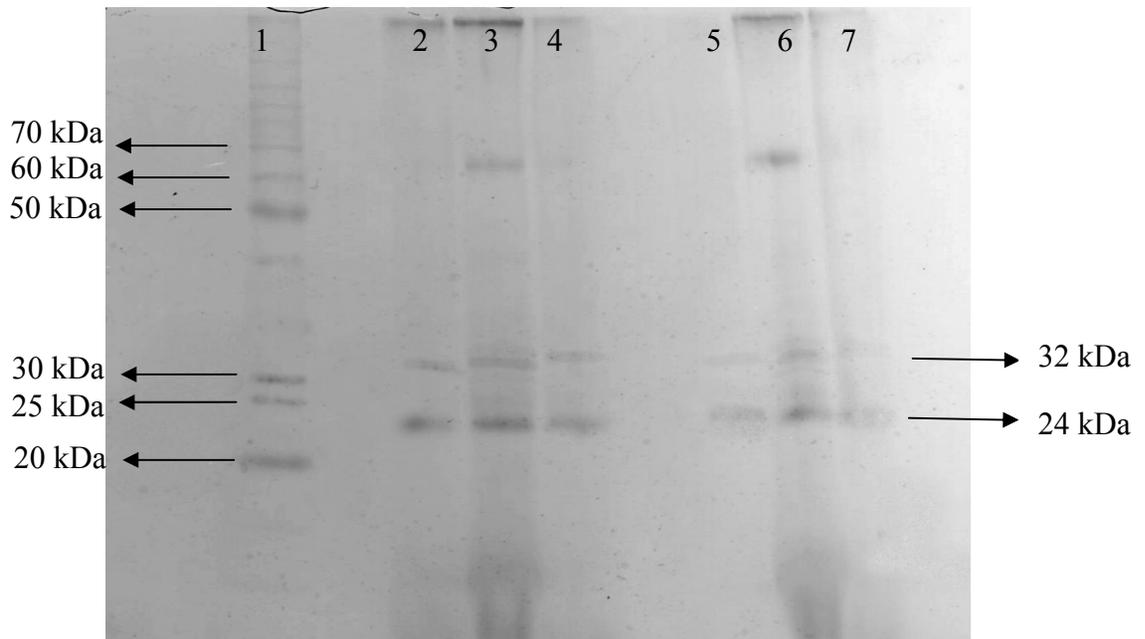


Figura 11.1. Perfil de proteínas de los clones de la variedad Sauvignon blanc analizadas por SDS.PAGE. Carril 1: Estándar de proteínas de peso molecular conocido; 2: clon 1 zona cálida; 3: clon 107 zona cálida; 4: clon 242 zona cálida; 5: clon 1 zona fría; 6: clon 107 zona fría; 7: clon 242 zona fría. En todos los casos, las muestras fueron obtenidas en la fecha de cosecha.

En la Figura 11.1. se muestran las bandas obtenidas a partir del fraccionamiento por electroforesis del cultivar Sauvignon blanc. Se puede observar que en todos los clones, independientemente de la zona de producción, se presentan dos bandas principales, que corresponderían a las proteínas quitinasa y taumatina. La intensidad de las bandas de los clones de la zona cálida es mayor en comparación con las bandas detectadas en los clones de la zona fría, lo que sugiere fuertemente una mayor concentración de proteínas patogénicas en el jugo de los clones de la zona cálida.

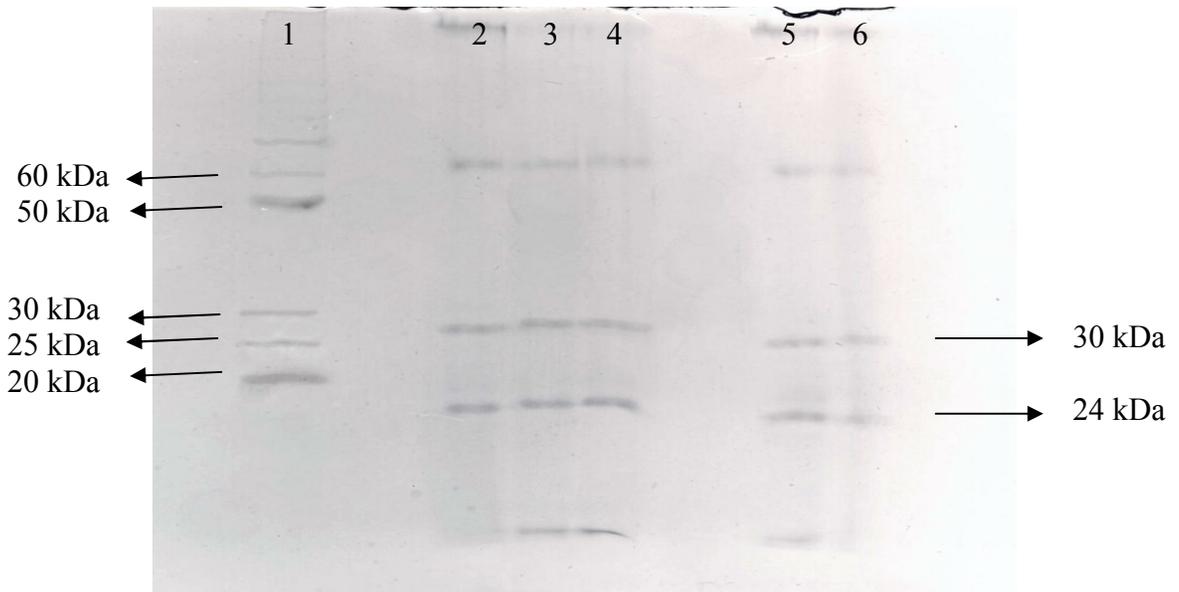


Figura 12.1. Perfil de proteínas de los clones de la variedad Chardonnay analizadas por SDS.PAGE. Carril 1: Estándar de proteínas de peso molecular conocido; 2: clon 4 zona cálida; 3: clon 5 zona cálida; 4: clon Mendoza zona cálida; 5: clon 75 zona fría; 6: clon Mendoza zona fría. En todos los casos las muestras fueron obtenidas en la fecha de cosecha.

La Figura 12.1. muestra el perfil proteico realizado a las muestras de los clones de Chardonnay. En este análisis se observó que los clones independientemente de la zona de producción presentaron tres bandas de pesos moleculares. Dos de las proteínas serían de importancia para este estudio. Por sus tamaños corresponderían a la quitinasa (30 kDa) y taumatina (24 kDa). La banda de la quitinasa fue más intensa una vez más. No se pudo distinguir la presencia de ambos tipos de quitinasa (ChitA y ChitB). En todos los jugos de los clones analizados se presentó una banda adicional de proteína de alto peso molecular (aproximadamente 63 kDa), sobre cuya identidad no hay antecedentes en la literatura.

SUBCAPÍTULO 2.

“Evolución de las proteínas patogénicas y su relación con el contenido total de proteínas y con la turbidez de jugos de Sauvignon blanc y Chardonnay de zona cálida y fría del valle de Casablanca durante la maduración”.

2.1. Evolución de distintos clones del cv. Sauvignon blanc en la zona cálida del valle de Casablanca.

2.1.1.- Concentración de Proteínas Totales

Cuadro 1.2. Contenido de proteínas totales en los clones de Sauvignon blanc de la zona cálida.

Periodo de Maduración	Proteínas totales (mg/L)								
	Clon 1			Clon 107			Clon 242		
X1	61,76	a	± 20,21	97,19	a	± 32,96	41,87	a	± 40,28
X2	86,09	a	± 5,62	125,81	a	± 41,19	112,64	a	± 12,9
X3	100,52	a	± 32,96	172,99	a	± 56,97	113,01	a	± 3,12
X4	157,44	b	± 39,42				159,40	a	± 23,57
X5	171,04	b	± 12,61						

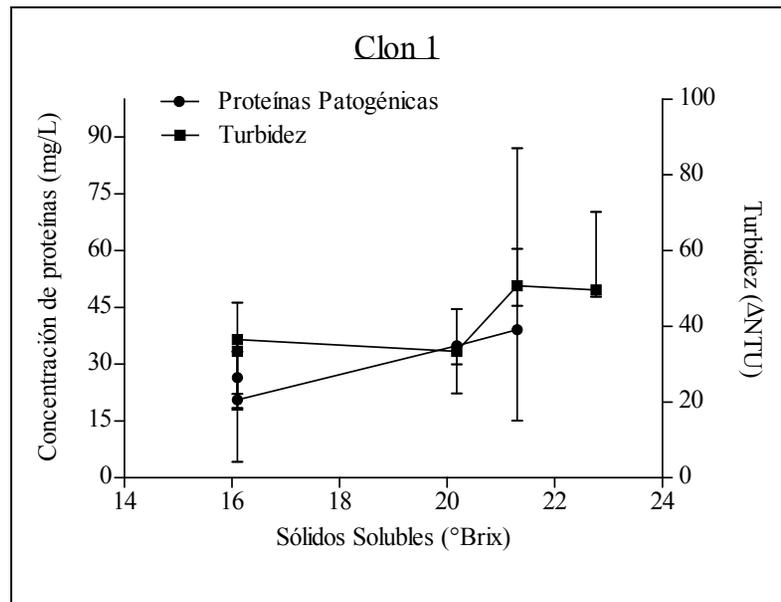
P: promedio ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2 a X5: muestras sucesivas tomadas a intervalos de 10 días.

El Cuadro 1.2 muestra las concentraciones de proteínas totales en los jugos preparados con bayas de tres clones de Sauvignon blanc. En este cuadro se observa un aumento significativo en el clon 1, desde el envero (X1) hasta el momento de cosecha (X5). Esta observación es plenamente concordante con los resultados publicados por Pocock *et al.*, (2000). En los otros dos clones no se distinguieron diferencias entre los periodos de maduración estudiados. Entre los clones, durante el periodo de envero, no se presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

2.1.2. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez

En la Figura 1.2 se muestra el comportamiento de los jugos de los clones de Sauvignon blanc de la zona cálida durante la maduración. En ésta se aprecia, una tendencia al aumento de la concentración de proteínas patogénicas, aunque solo en los jugos obtenidos de los clones 1 y 242 fue posible identificar un aumento significativo ($p < 0,05$) durante la maduración². Estas observación es concordante con los resultados publicados por Pocock *et al.*, (2002) quienes describen un aumento en la producción de las proteínas patogénicas junto a la acumulación de sólidos solubles desde la etapa de envero hasta la cosecha de la baya. Este incremento fue muy evidente entre los dos últimos muestreos.

Entre los jugos de los clones analizados no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$), principalmente en los periodos de envero y cosecha.



² Índices de madurez Cuadro 2.2. Apéndice II

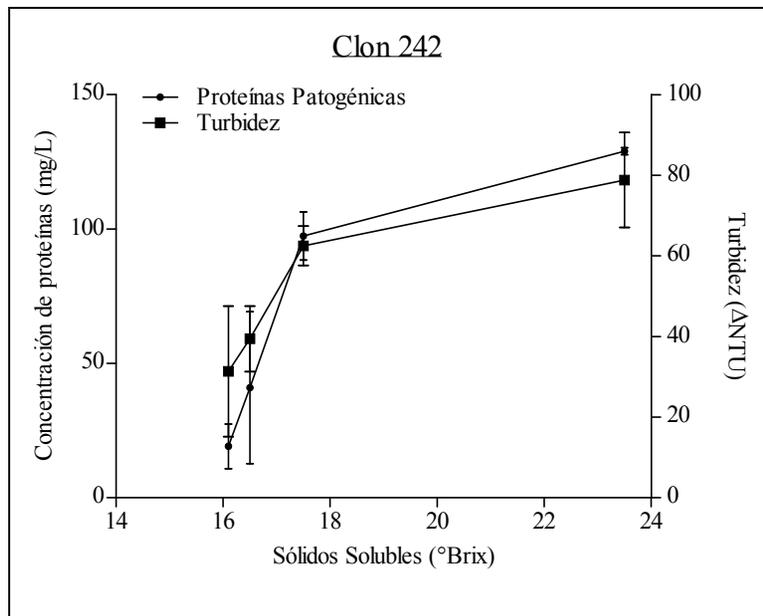
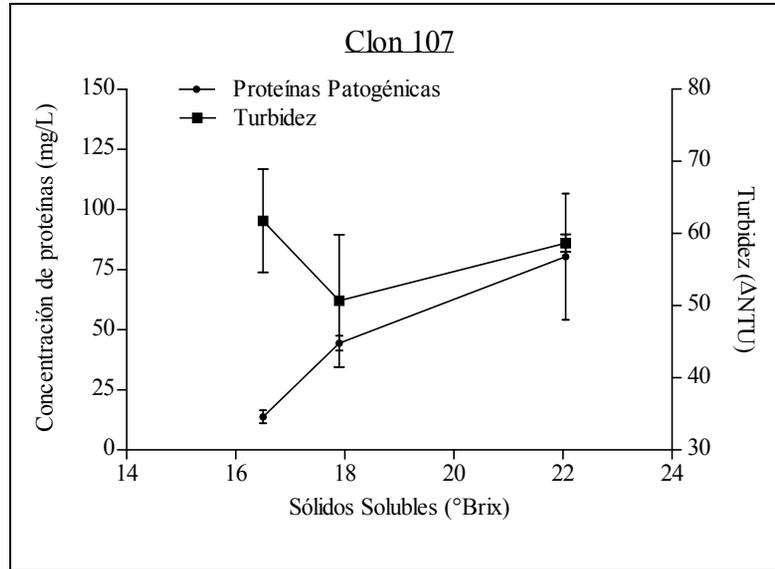


Figura 1.2. Evolución de las proteínas patogénicas (cuantificación vía cromatografía HPLC) y la turbidez en los jugos de los clones de Sauvignon blanc de la zona cálida en relación con la acumulación de sólidos solubles. Los valores presentados corresponden al promedio y desviación estándar de 4 repeticiones.

En cuanto a la turbidez de los jugos, a pesar que se observa una tendencia al aumento en paralelo al contenido de las proteínas patogénicas en los jugos de los clones estudiados, solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el clon 1. Esta observación es coincidente con estudios publicados por Waters *et al.*, (2005), Monteiro *et al.*, (2007) y Høj *et al.*, (2000). Estos autores postulan que el fenómeno de turbidez está directamente asociado al contenido de proteínas patogénicas. Por lo contrario, hay autores que sostienen que la concentración de proteínas patogénicas no es un índice directo de inestabilidad en los jugos (Zoecklein *et al.*, 2001).

2.1.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración.

En los jugos de los clones estudiados fue posible observar que el contenido de proteínas de la familia de las taumatinas fue mayor al presentado por la familia de las quitinasas. Observaciones semejantes han sido publicadas por Tattersall *et al.*, (1997) y Peng *et al.*, (1997). Según esos estudios, la familia taumatina representa alrededor del 70% del total de proteínas patogénicas en la variedad Sauvignon blanc y sugieren que ésta sería la principal responsable de la turbidez de los jugos. En todos los clones de nuestro estudio se identificaron los tres tipos principales de taumatina (VVTL1, VVTL2 y VVTL3) y solo un tipo de quitinasa (ChitA) (Cuadros 3.2, 4.2 y 5.2, Apéndice II).

En el clon 1 se observó un incremento en la concentración de VVTL1 en el periodo inmediatamente anterior al momento de cosecha. Este fenómeno que no se presentó en el resto de los clones.

Por otra parte, las concentraciones de VVTL1 fueron superiores a las concentraciones de VVTL2 y VVTL3 en todos los clones. Tomando en cuenta los valores de turbidez obtenidos y considerando que la familia de las taumatinas sería la principal responsable de la turbidez en vinos y/o jugos (Høj *et al.*, 2000), resulta razonable postular que VVTL1 sería la principal proteína responsable del problema de la turbidez.

En los clones 1 y 107 los niveles de VVTL1 no cambiaron significativamente en distintos muestreos durante la maduración. En el clon 242, en cambio, se observó diferencias principalmente entre las etapas de envero y cosecha.

Con respecto a las quitinasas, una vez más el clon 1 presentó un incremento importante en el periodo inmediatamente anterior a la cosecha. Este fenómeno también se observó en los otros dos clones pero de manera menos pronunciada. En los tres clones estudiados fue posible observar diferencias significativas ($p < 0,05$) durante la maduración.

2.2. Evolución de distintos clones del cv. Sauvignon blanc en la zona fría del valle de Casablanca.

2.2.1.- Concentración de Proteínas Totales

Cuadro 6.2. Contenido de proteínas totales en los clones de Sauvignon blanc de la zona fría durante la maduración.

Muestreo	Total de proteínas (mg/L)								
	Clon 1			Clon 107			Clon 242		
X1	30,45	p A	± 10,15	70,24	a	± 19,33	64,9	a	± 6,9
X2	132,88	Ab	± 19,33	95,70	a	± 10,15	98,90	ab	± 0,46
X3	260,52	B	± 71,17	127,08	a	± 62,85	125,81	ab	± 3,39
X4				143,75	a	± 11,81	141,50	b	± 53,30
X5				186,60	a	± 71,17			

P: promedio ± DS de 4 repeticiones. X1: envero, X2 a X5: muestras sucesivas tomadas a intervalos de 10 días.

El Cuadro 6.2 muestra las concentraciones de proteínas totales en los tres clones de Sauvignon blanc estudiados de la zona fría del valle de Casablanca. Se observa un aumento en el contenido total de proteínas en paralelo con la maduración, desde el envero (X1) hasta el momento de cosecha (Xn), principalmente en los clones 1 y 242. Este comportamiento coincide con los resultados publicados por Ferreira *et al.*, (2004), quienes observaron un aumento de proteínas en la baya principalmente después de pinta. Conjuntamente con este antecedente, hay que tener presente que existen también otras proteínas que no influirían en la turbidez, (descritas por Sauvage *et al.*, 2010; Brissonnet y Maujean, 1993 y Hayasaka *et al.*, 2001), y que han sido identificadas como glucanasas, invertasas y otras. Todas ellas representan una fracción menor.

En este estudio se observó que el clon 1 presentó la menor concentración de proteínas totales en la etapa de envero, existiendo una diferencia significativa ($p < 0,05$) con los otros dos clones en estudio. Además, este clon presentó el mayor aumento de proteínas en un menor tiempo.

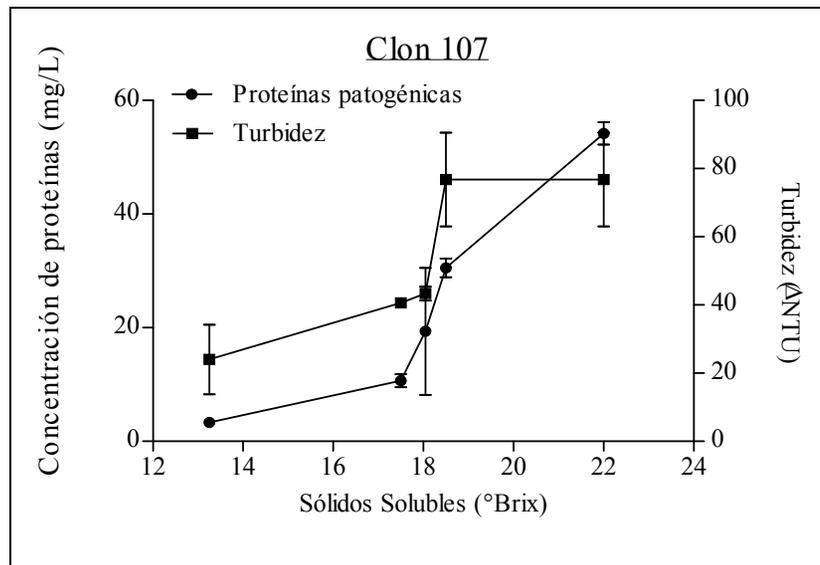
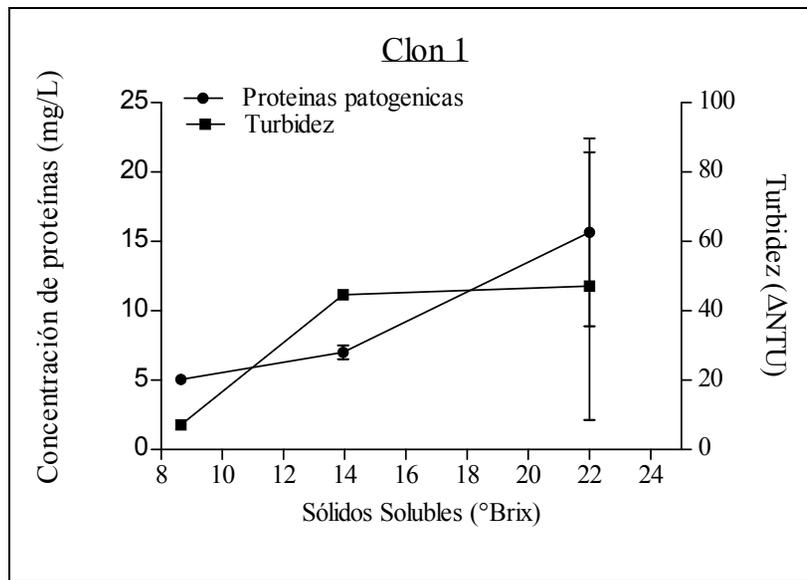
En la etapa de cosecha no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los jugos de los clones de este estudio.

2.2.2. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez

Según la Figura 7.2 todos los clones estudiados presentaron una tendencia al aumento en el contenido de proteínas patogénicas en relación a la maduración de la baya³. En los clones 107 y 242 se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las periodos muestreados. Esta observación es coincidente con los resultados obtenidos por Salzman *et al.*, (1998) y Tattersall *et al.*, (1997), quienes determinaron que existe un aumento importante en el contenido de proteínas patogénicas después de pinta. Además de ser coincidentes con los resultados obtenidos por Robinson y Davies (2000) quienes observaron que las proteínas patogénicas aumentan en paralelo a la acumulación de los sólidos solubles, probablemente debido a que la acción de éstos y el ablandamiento que se produce en la maduración son atractivos para los patógenos (microorganismos perjudiciales).

En este estudio se observó que el clon 242, en relación a los dos clones, fue el que presentó la mayor cantidad de proteínas patogénicas en la etapa de envero y en el periodo de cosecha. En este último periodo se presentó una diferencia significativa entre los jugos de los clones estudiados.

³ Índices de madurez Cuadro 7.2. Apéndice II.



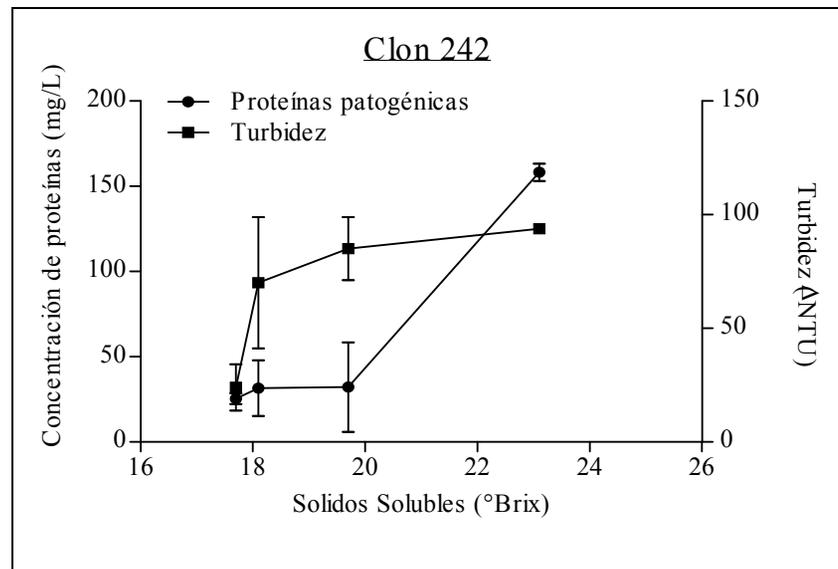


Figura 7.2. Evolución de las proteínas patogénicas y la turbidez en jugos de los clones Sauvignon blanc de la zona fría en relación con la acumulación de sólidos solubles. Los valores presentados corresponden al promedio y desviación estándar de 4 repeticiones.

En cuanto a la turbidez de los jugos (Figura 7.2), en todos los clones estudiados progresó junto con la maduración y en directa relación con el contenido de las proteínas patogénicas. Estos resultados son coincidentes con estudios publicados por Høj *et al.*, (2000) y Waters y Høj (1999).

Al compararse la turbidez presentada por los jugos de los tres clones de este estudio, se observa que el clon 242 muestra el mayor incremento en la etapa de cosecha, junto con ser la turbidez más alta en relación a los jugos preparados con bayas de los otros dos clones en el último muestreo. El clon 1, por otro lado, presentó la menor turbidez en todos los periodos de muestreo, lo cual dice relación con los contenidos de proteínas patogénicas descritos más arriba. En este estudio se pudieron detectar diferencias significativas entre los distintos periodos muestreados en los jugos preparados de bayas de los clones 1 y 107.

2.2.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración.

En los jugos de bayas de los clones estudiados el contenido total de proteínas de la familia de las taumatinas fue mayor ($p < 0,05$) al presentado por la familia de las quitinasas. Observaciones semejantes han sido publicadas por Tattersall *et al.* (1997) y Waters *et al.*, (1998). En todos los clones de nuestro estudio se presentaron los tres tipos principales de taumatina (VVTL1, VVTL2 y VVTL3) y solo un tipo de quitinasa (ChitA) (Cuadros 8.2, 9.2 y 10.2, Apéndice II).

A pesar de las observaciones de los autores antes mencionados el jugo preparado con bayas del clon 1 presentó un mayor contenido de proteínas quitinasas. Esta observación es coincidente con los resultados obtenidos por Falconer *et al.*, (2010), quienes señalan que la presencia de quitinasa también puede incidir directamente en la inestabilidad de los jugos.

En cuanto a taumatina, en el clon 242 se observaron los mayores contenidos de este tipo de proteína patogénica respecto de los otros dos clones, en las etapas de envero y cosecha, existiendo un aumento importante antes de esta última.

Por otra parte, en todos los clones las concentraciones de VVTL1 fueron superiores a las presentadas por VVTL2 y VVTL3. Tomando en cuenta los valores de turbidez obtenidos y considerando que la familia de las taumatinas sería la principal responsable de la turbidez en vinos y/o jugos (Høj *et al.*, 2000), entonces VVTL1 bien podría ser la principal proteína responsable de la turbidez.

Con respecto a las quitinasas en el clon 242 se observaron los mayores contenidos de quitinasa, en comparación con los otros dos clones, en las etapas de envero y cosecha. En el clon 107 los menores contenidos de quitinasas se observaron en el envero, mientras que el clon 1 presentó un incremento importante antes de la cosecha. Además, se observó que la turbidez aumenta paulatinamente, en los periodos intermedios de maduración.

En todos los jugos de los clones estudiados se observaron diferencias significativas en los valores de los tres tipos de taumatina (VVTL1, VVTL2 y VVTL3), entre los muestreos, y principalmente entre envero y cosecha. En el caso de los contenidos de quitinasa sólo se presentaron incrementos significativos en los jugos de los clones 107 y 242.

2.3. Evolución de distintos clones del cv. Chardonnay en la zona cálida del valle de Casablanca.

2.3.1 Concentración de Proteínas Totales

Cuadro 11.2. Contenido de proteínas totales en los clones de Chardonnay de la zona cálida.

Estados de maduración	Total de proteínas (mg/L)								
	Clon Mendoza			Clon 4			Clon 5		
X1	104,76	p a	± 47,47	11,63	p a	± 0,07	58,02	a	± 53,49
X2	104,81	a	± 10,17	12,48	a	± 0,74	124,17	a	± 54,23
X3	148,43	a	± 72,17	13,20	a	± 2,44	200,17	ab	± 2,29
X4	173,74	a	± 6,48				344,98	b	± 87,47

P: promedio ± DS de 4 repeticiones. X1: envero, X2 a X5: muestras sucesivas tomadas a intervalos de 10 días.

En el Cuadro 11.2 se muestra los valores de las concentraciones de proteínas totales en los jugos preparados con bayas de los tres clones de Chardonnay de la zona cálida. En todos se observó una tendencia al aumento, pero solo el clon 5 presentó diferencias significativas en el contenido total de proteínas entre los muestreos, principalmente entre envero (X1) y cosecha (Xn). Esta observación es concordante con los resultados obtenidos por Tattersall *et al.*, (1997), quienes describen un aumento importante en el contenido total de proteínas desde el envero. Hay que considerar que existen proteínas que no han sido identificadas en su totalidad, pero que no participarían en la formación de turbidez (Brissonnet y Maujean, 1993).

El jugo preparado con bayas del clon 5 presentó los mayores valores en la etapa de cosecha, en relación a los otros dos clones, observándose un aumento importante poco antes de

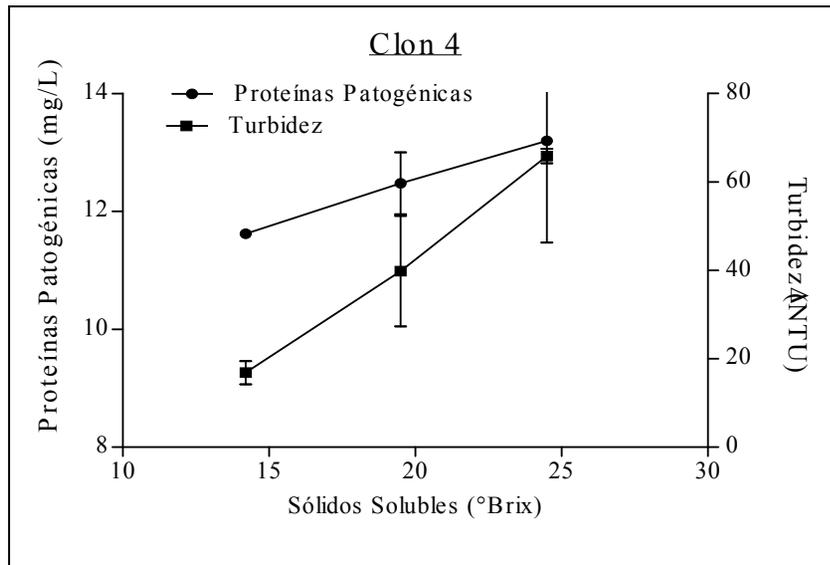
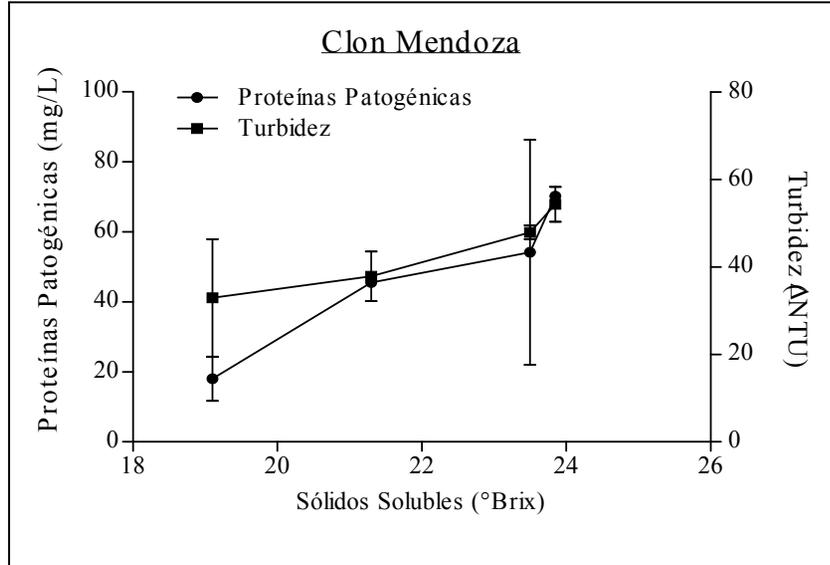
cosecha. Además, en este clon se observó un mayor aumento en cada uno de los muestreos. En contraste, el clon 4, presentó los menores valores en todas los periodos de maduración y una acumulación de proteínas más lento.

2.3.3. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez

La Figura 13.2 muestra una tendencia al aumento en los clones estudiados en el contenido de las proteínas patogénicas en relación de la madurez de las bayas⁴. En este estudio sólo fue posible distinguir un aumento significativo en el contenido de estas proteínas en el clon 5, entre envero y cosecha ($p < 0,05$). Esta observación es coincidente con el estudio de Tattersall *et al.*, (2001) quienes describieron que los genes de expresión de las proteínas patogénicas se activa en el envero y se expresan durante el proceso de maduración de la baya.

Al comparar distintos clones respecto de la acumulación de las proteínas patogénicas, se observó que en la etapa de envero no se distinguieron diferencias significativas ($p > 0,05$). Al contrario de lo que ocurre en la cosecha, donde el clon 4 presentó los menores contenidos de estas proteínas patogénicas en las etapas estudiadas. El clon 5 fue el que presentó los mayores contenidos de proteínas patogénicas durante la cosecha ($p < 0,05$).

⁴ Índices de madurez Cuadro 12.2. apéndice II.



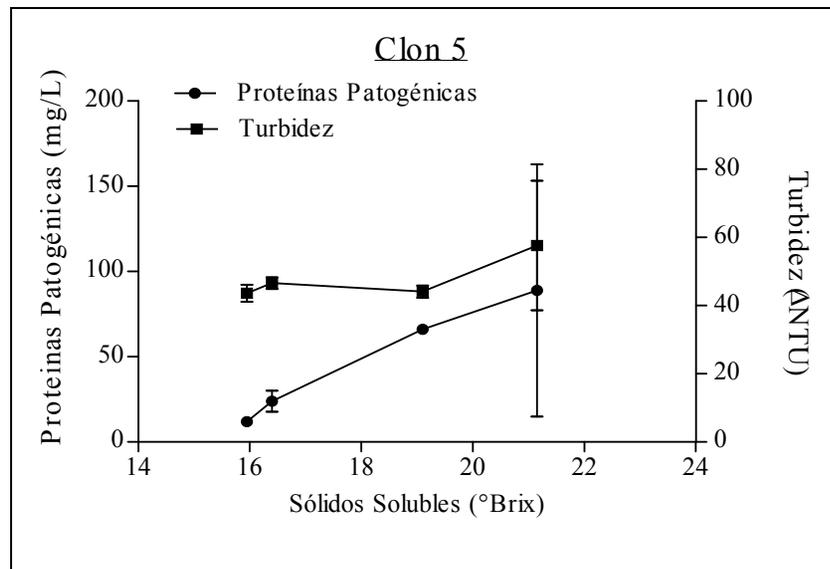


Figura 13.2. Evolución de las proteínas patogénicas y la turbidez en jugos de los clones de Sauvignon blanc de la zona fría en relación con la acumulación de sólidos solubles. Los valores presentados corresponden al promedio y desviación estándar de 4 repeticiones.

Por otra parte, en el estudio se observó un aumento en la inestabilidad de los jugos en los clones en relación a la madurez de las bayas y en directa relación con el aumento en el contenido de proteínas patogénicas, siendo significativo este aumento en el clon 4 ($p < 0,05$). Estos resultados fueron coincidentes con el estudio de Waters *et al.*, (2005), quienes señalaron que las proteína patogénicas serían las responsables de la turbidez en los vinos y jugos. Según Pocock *et al.*,(2007), sin embargo, existen otros factores que pueden afectar la estabilidad de los jugos, como es la presencia del ion sulfato.

Comparativamente, los clones Mendoza y 5 presentaron los mayores niveles de inestabilidad en el periodo de envero, siendo significativa su diferencia con el clon restante ($p < 0,05$) En el periodo de cosecha no se distinguieron diferencias entre los jugos de los clones estudiados ($p > 0,05$).

2.3.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración.

En los jugos de los clones estudiados del cv. Chardonnay, el contenido total de proteínas de la familia de las taumatinas fue mayor al presentado por la familia de las quitinasas. Observaciones semejantes fueron publicadas por Waters *et al.*, (1998) quienes señalan que la familia taumatina representa alrededor del 70% del total de proteínas patogénicas en la variedad Sauvignon blanc y sugieren que ésta sería la principal responsable de la turbidez de los jugos. En todos los clones de este estudio se presentaron los tres tipos principales de taumatina (VVTL1, VVTL2 y VVTL3) y, a diferencia de los clones de Sauvignon blanc, se presentaron los dos tipos de quitinasa (ChitA y ChitB) (Cuadros 13.2, 14.2 y 15.2, Apéndice II).

En la mayoría de los clones de este estudio existió una tendencia al aumento en los contenidos de taumatina y quitinasa durante la maduración, pero no se observaron diferencias significativas entre los periodos muestreados. Por otro lado, se observó que un mayor incremento en los niveles de VVTL1, respecto a la sumatoria de VVTL2 y VVTL3. En cuanto a taumatina, entre los jugos de los clones estudiados, el clon 5 fue el que presentó los mayores niveles durante los periodos muestreados.

En cuanto a las quitinasas, la quitinasa de tipo ChitA fue más abundante en la mayoría de los clones estudiados, principalmente en las etapas de envero y cosecha. La excepción fue el clon 5, en el cual se detectaron niveles mayores de ChitB en el momento de la cosecha. Al igual que en el caso de las taumatinas, el clon 4 presentó los menores contenidos de quitinasas (en comparación con los otros dos clones) en el envero y cosecha.

2.4. Evolución de distintos clones del cv. Chardonnay en la zona fría del valle de Casablanca.

2.4.1. Concentración de Proteínas Totales

Cuadro 18.2. Contenido de proteínas totales en los clones de Chardonnay de la zona fría.

Estado de maduración	Total de proteínas (mg/L)					
	Clon Mendoza			Clon 75		
X1	72,63	a	±	5,84	64,96	a ± 2,18
X2	126,93	ab	±	18,08	167,12	ab ± 17,66
X3	153,11	b	±	21,57	237,26	ab ± 167,91
X4					240,10	b ± 77,70

P: promedio ± DS dde 4 repeticiones. X1: envero, X2 a X5: muestras sucesivas tomadas a intervalos de 10 días.

El Cuadro 18.2., muestra el contenido de proteínas totales en jugos de uva preparado a partir de los clones Mendoza y 75. En ambos casos los contenidos de proteínas totales en los jugos fue aumentando a medida que avanzaba la madurez de las bayas. Presentándose diferencias significativas entre los estados de maduración. Estas observaciones que fueron similares a los resultados del estudio de Monteiro *et al.*,(2007).

En nuestro caso no se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales al comparar los jugos de ambos clones estudiados en los distintos estados de maduración ($p > 0,05$).

2.4.2. Concentración de proteínas patogénicas y Turbidez

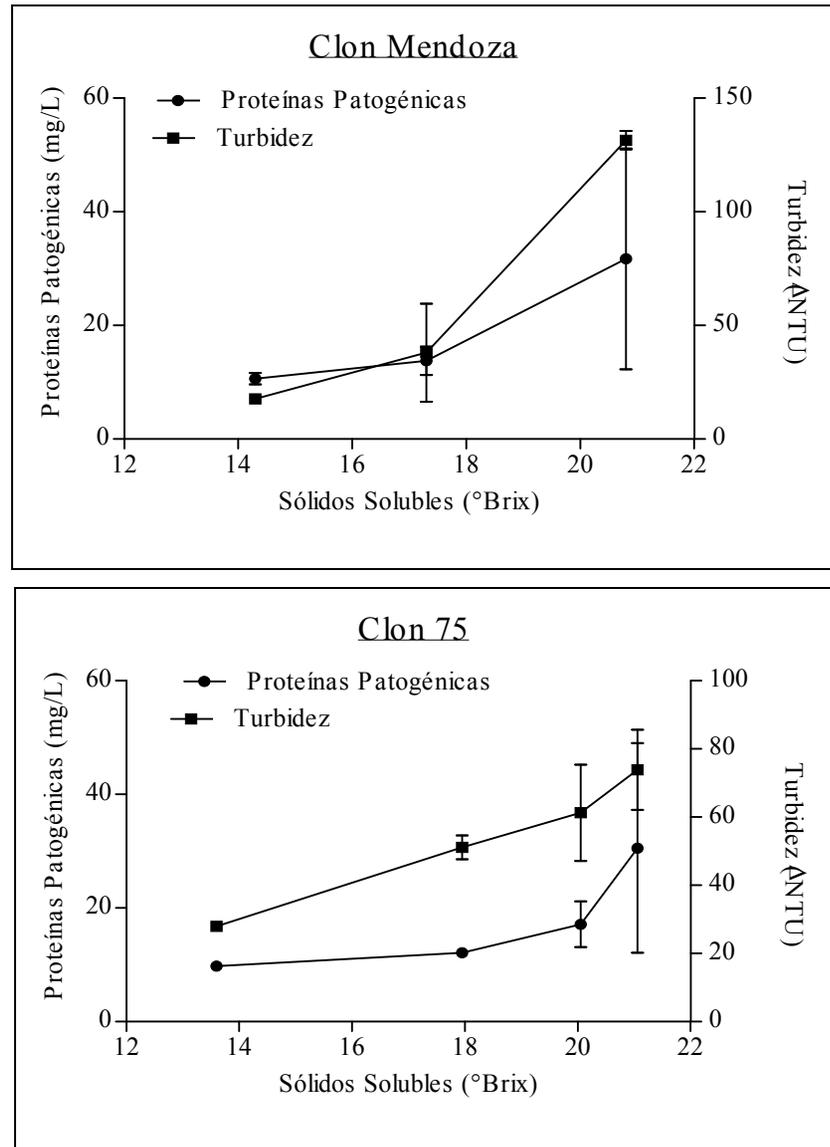


Figura 19.2. Evolución de las proteínas patogénicas y turbidez en los jugos de los clones de Sauvignon blanc de la zona fría en relación con la acumulación de sólidos solubles. Los valores presentados corresponden al promedio y desviación estándar de 4 repeticiones

Como muestra la Figura 19.2. ambos clones presentaron una tendencia a aumentar el contenido de proteínas patogénicas junto con la maduración de la baya. Dadas las altas desviaciones observadas, las diferencias entre los muestreos en ambos clones no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$). Comparativamente, entre los clones no se distinguieron diferencias importantes en las etapas de cosecha y envero ($p>0,05$).

Por otra parte, la turbidez de los jugos mostró un comportamiento similar al presentado por las proteínas patogénicas. En concordancia con esta observación, Waters *et al.*,(2005) concluyeron que estas proteínas son las responsables principales de la turbidez en los vinos y mostos. Comparativamente, los jugos del clon Mendoza presentaron los menores valores de turbidez en el momento de envero, y su aumento fue significativo hacia la cosecha.

2.4.3. Concentración de familias de proteínas patogénicas durante la maduración

En los clones estudiados el contenido de proteínas de la familia de las taumatinas fue mayor al presentado por el conjunto de quitinasas. En ambos clones del cultivar Chardonnay se observaron los tres tipos de taumatinas (VVTL1, VVTL2, VVTL3). Como es característico de este cultivar, se observaron los dos tipos de quitinasas (ChitA y ChitB), aunque en menor contenido a los presentados por el mismo clon en la zona cálida (Cuadros 19.2. y Cuadro 20.2. apéndice II).

De igual manera, en ambos clones los contenidos de VVTL1 y la sumatoria de los contenidos de VVTL2 y VVTL3 fueron prácticamente iguales, no siendo significativa la diferencia mostrada entre los estados de maduración en cada uno de los clones.

Comparativamente, no se distinguieron diferencias en los contenidos de las taumatinas en los jugos de los clones Mendoza y 75, en los diferentes muestreos ($p > 0,05$).

En cuanto a los contenidos de quitinasas en los jugos de bayas de ambos clones, no fue posible distinguir diferencias entre los distintos muestreos de cada clon.

SUBCAPÍTULO 3

“Análisis general de las variedades”

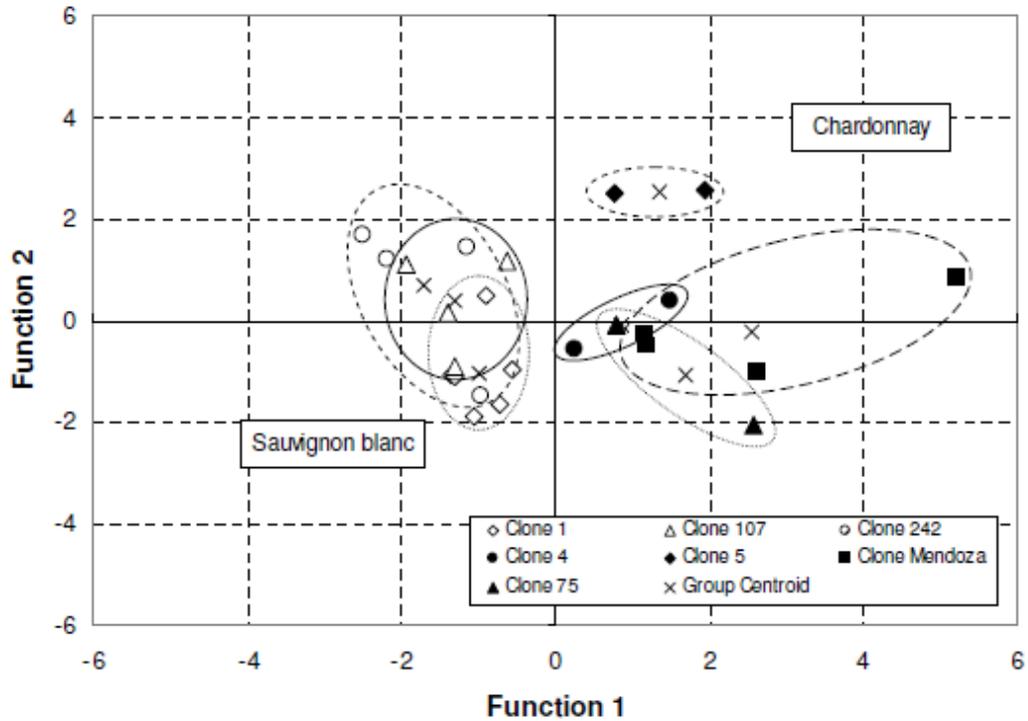


Figura 1.3. Representación de las funciones canónicas del análisis discriminante de la estabilidad proteica en jugos de acuerdo a la zona de producción, la variedad de uva, el clon y el tipo y concentración de proteínas relacionadas con patogénesis.

Considerando a que no se observaron efectos claros de la zona de producción, la variedad de uva o el tipo de clon en la estabilidad de proteínas en el jugo de uva, se realizó un análisis multivariante de tipo discriminante con el objeto de dimensionar el efecto del clon, la variedad, las proteínas patogénicas (VVTL1, VVTL2 + VVTL3, ChitA, ChitB) y la zona de producción sobre la estabilidad de las proteínas (Δ NTU).

La Figura 1.3 muestra que la primera función (Función 1, estabilidad de proteínas) diferenció dos grupos principales, uno de los cuales correspondió a la mayoría de clones de Sauvignon blanc y el segundo grupo a clones de Chardonnay. Atendiendo a esta observación, se sugeriría que la ChitB es la variable que permitiría la diferenciación de ambos grupos.

Por otro lado, la segunda función discriminante (Función 2, variables independientes) distinguió dos grupos en el plano cartesiano de la variedad Chardonnay, el primero agrupó los clones 4, 75 y Mendoza, lo cual significa que entre éstos no existen diferencias significativas. En este grupo el clon Mendoza fue el que presentó la mayor dispersión, en comparación con los otros clones. En el segundo grupo sólo se distinguió al clon 5. Este se diferencia del resto de los clones, principalmente por la alta concentración de proteínas totales observada en la etapa de cosecha. En el caso de la variedad Sauvignon blanc, solo se pudo distinguir un grupo conformado por los clones 1, 107 y 242, lo que significa que entre ellos no existen diferencias en su tendencia en desarrollar turbidez.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones empleadas en el presente estudio es posible concluir que:

- En el proceso de maduración, durante el momento de cosecha se presentaron los mayores contenidos de proteínas totales y proteínas patogénicas, indistintamente del cultivar y la zona de producción.
- En la zona cálida, los contenidos de proteínas totales y patogénicas de los jugos preparados con bayas de distintos clones fueron superiores a los observados en la zona fría del mismo valle.
- Dentro de una misma zona de producción existen diferencias en los contenidos de proteínas patogénicas de los jugos preparados con bayas de distintos clones de las variedades estudiadas.
- En las variedades, Sauvignon blanc y Chardonnay, se presentan los tres tipos de taumatina, independientemente de la zona de producción. Esta familia de proteínas patogénicas es la más abundante en los jugos. La proteína patogénica VVTL1 es la que presentó los mayores contenidos en todos los clones estudiados.
- La principal diferencia presentada entre las variedades Sauvignon blanc y Chardonnay es la presencia de ChitB, ya que ésta sólo se presentó en la variedad Chardonnay.
- Las diferencias de composición en proteínas patogénicas que presentan los jugos preparados con bayas en distintas etapas de maduración, zona de producción, variedad de *V. vinifera* y clones correspondientes, sugieren que la turbidez es un problema multifactorial, sobre el que influirían otros factores además de los analizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Batista, L., S. Monteiro, V.B. Loureiro, A.R. Teixeira and R.B. Ferreira. 2009. The complexity of protein haze formation in wines. *Food Chemistry* 112: 169-177.
- Blouin, J. y E. Peynaud. 2004. *Enología práctica*. 4º ed. Mundi- Prensa Libros, Madrid, España. 353p.
- Bol, J.F., H.J.M. Linthorst and B.J.C. Cornelissen. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review Phytopathology* 28:113-138.
- Bordeau, E. y J. Scarpa. 2000. *Análisis químico del vino*. Textos universitarios. Facultad de Agronomía. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 253p.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brissonnet, F. and A. Maujean. (1993). Characterization of foaming proteins in champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 72:248-254.
- Deytieux-Belleau, C., L. Geny, J. Roudet, V. Mayet, B. Donèche and M. Fermaud. 2009. Grape berry skin features related to ontogenic resistance to *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 125:551-563.
- Esteruelas, M., P. Poinssaut, N. Sieczkowski, S. Manteau, M.F. Fort, J.M. Canals and F. Zamora. 2009. Comparison of methods for estimating protein stability in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 60:302-311.
- Falconer, R.J., M. Maragon, S.C. Van Sluyter, K.A. Neilson, C. Chang and E.J. Waters. 2010. Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from

Sauvignon blanc and Semillon juice and their role in haze formation in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 975-980.

Ferreira, R.B., S.S. Monteiro, M.A. Picarra-Pereira and A.R. Teixeira. 2004. Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends in Biotechnology* 22(4): 168-173.

Giribaldi, M., I. Petugini, F.X. Sauvage and A. Schubert. 2007. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics* 7(17):3154-3170.

Hayasaka, Y., Adams, K.S., Pocock, K.F., Baldock, G.A., Waters, E.J. and Høj, P.B. 2001. Use of electrospray mass spectrometry for mass determination of grape *Vitis vinifera* juice pathogenesis-related proteins: A potential tool for varietal differentiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1830-1839.

Hidalgo, J. 2006. *La calidad del vino desde el viñedo*. Mundi-Prensa libros, Madrid, España. 398p.

Høj, P.B., D.B. Tattersall, K. Adams, K.F. Pocock, Y. Hayasaka, R. Van Heeswijck and E. Waters. 2000. The "haze proteins" of wine- a summary of properties, factors affecting their accumulation in grapes, and the amount of bentonite required for their removal from wine. *Proceedings of ASEV's 50th Anniversary Meeting, Seattle, Washington, USA (ASEV: American Society of Enology and Viticulture: Davis, California)* pp.149-154.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lawton, K., S. Uknes, L. Friedrich, T. Gaffney, D. Alexander, R. Goodman, J.P. Métraux, H. Kessmann, P. Ahl Goy, M. Gut Rella, E. Ward and J. Ryals. 1993. The molecular biology of systemic acquired resistance. In *Biotin, M Legrad, eds, Mechanisms of plant defense responses*. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands. Pp 422-432.

Linthorst, H.J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plant. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10:123-150.

- Marangon, M., S.C. Van Sluyter, P.A. Haynes and E.J. Waters. 2009. Grape and wine proteins: their fractionation by hydrophobic interaction chromatography and identification by chromatographic and proteomic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 4415-4425.
- Monteiro, S., M.A. Picarra-Pereira, V.B Loureiro, A.R. Teixeira and R.B. Ferreira. 2007. The diversity of pathogenesis-related proteins decreases during grape maturation. *Phytochemistry* 68: 416-425.
- Robinson, S.P. and C. Davies. 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6:175-188.
- Salazar, F.N., I. Achaerandio, M.A. Labbé, C Güell and F. López. 2006 Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 9955–9958.
- Salazar, F.N.; J.P.F. de Bruijn, L. Seminario, C. Güell and F. López. 2007a. Improvement of wine crossflow microfiltration by a new hybrid process. *Journal of Food Engineering* 79, 1329-1336.
- Salazar, F.N., I. Achaerandio, M.A. Labbé, C. Güell and F. López. 2007b. Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: physicochemical and wine sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9955-9958.
- Salazar, F.N, F. Zamora, J.M. Canals and F. López. 2009. Protein stabilization in sparkling base wine using zirconia and bentonite: influence on the foam parameters and protein fractions. *Journal international des Sciences de la Vigne et du Vin*, 43.
- Salzman, R., I. Tikhonova, B.P. Bordelon, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology* 117:465-472.
- Sauvage, F.X., B. Bach, M. Moutounet and A. Vernhet. 2010. Proteins in white wines: thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry* 118:26-34.

Siebert, K.J. 1999. Effect of protein-polyphenol interaction on beverage haze, stabilization and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 353-362.

Tattersall, D.B., R. Van Heeswijck and P.B. Høj. 1997. Identification and characterization of a fruit-specific, Thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. *Plant Physiology* 114:759-769.

Tattersall, D.B., K.F. Pocock, Y. Hayasaka, K. Adams, R. Van Heeswijck, E.J. Waters and P.B. Høj. 2001. Pathogenesis related proteins - Their accumulation in grapes during berry growth and their involvement in white wine heat instability. In "Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine" K.A. Roubelakis-Angelakis (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 183-202

Peng, Z., K.F. Pocock, J.E. Waters, I.L. Francis and P.J. Williams. 1997. Taste properties of grape (*Vitis vinifera*) pathogenesis-related proteins isolated from wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4639-4643.

Pocock, K.F., Y. Hayasaka, Z. Peng, P.J. Williams and E.J. Waters. 1998. The effect of mechanical harvesting and long-distance transport on the concentration of haze-forming proteins in grape juice. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4:23-29.

Pocock, K.F., Y. Hayasaka, M.G. McCarthy and E.J. Waters. 2000. Thaumatin-like proteins and Chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not effect the final levels per berry maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1635-1643

Pocock, K.F. and E.J. Waters. 2006. Protein haze in bottled white wine. How well do stability test and bentonite fining trials predict haze formation during storage and transport?. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12:212-220.

Van Loon, L.C. and E.A. Van Strien. 1990. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.

Villaseca, S. and M. Álvarez. 2002. Zonificación agroclimática del Valle de Casablanca. *Tierra Adentro (Mayo-Junio)* 44: 26-29.

Waters, E.J., W. Wallace and P.J. Williams. 1991. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *American Journal of Enology and Viticulture* 42:123-127.

Waters, E.J., W. Wallace and P.J. Williams. 1992. Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20:1514-1519.

Waters, E.J., N.J. Shirley and P.J. Williams. 1996. Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44:3-5.

Waters, E.J., Y. Hayasaka, D.B. Tattersall, K.S. Adams and P.J. Williams. 1998. Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinases that cause haze formation in wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:4950-4957.

Waters, E.J., G. Alexander, R. Muhlack, K.F. Pocock, C. Colby, B.K. O'Neill, P.B. Høj and P. Jones. 2005. Preventing protein haze in bottled white wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11:215-225.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid, España. 225p.

Zoecklein, B. 1991. Protein stability determination in juice and wine. *Viticulture/Enology*, Virginia Cooperative Extension, Virginia State Publication, 463-015.

Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gum, y F. Nury. 2001. *Análisis y producción de vino*. Editorial Acirbia S.A. Zaragoza, España. 613p.

APÉNDICE I

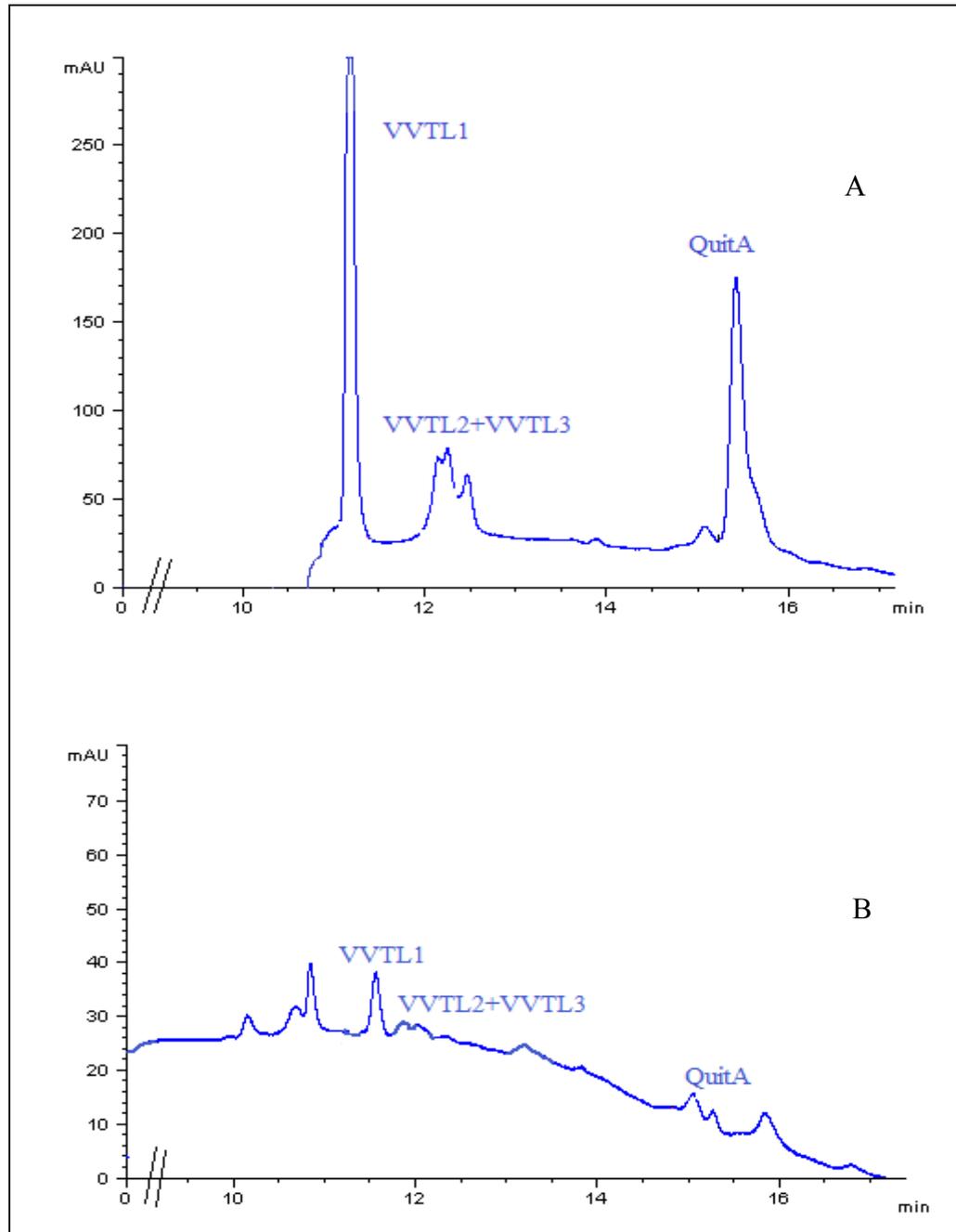


Figura 2.1. Cromatogramas de RP-HPLC de proteínas patogénicas de jugo libre del clon 1 de las zonas cálida (A) y fría (B) de Sauvignon blanc del valle de Casablanca.

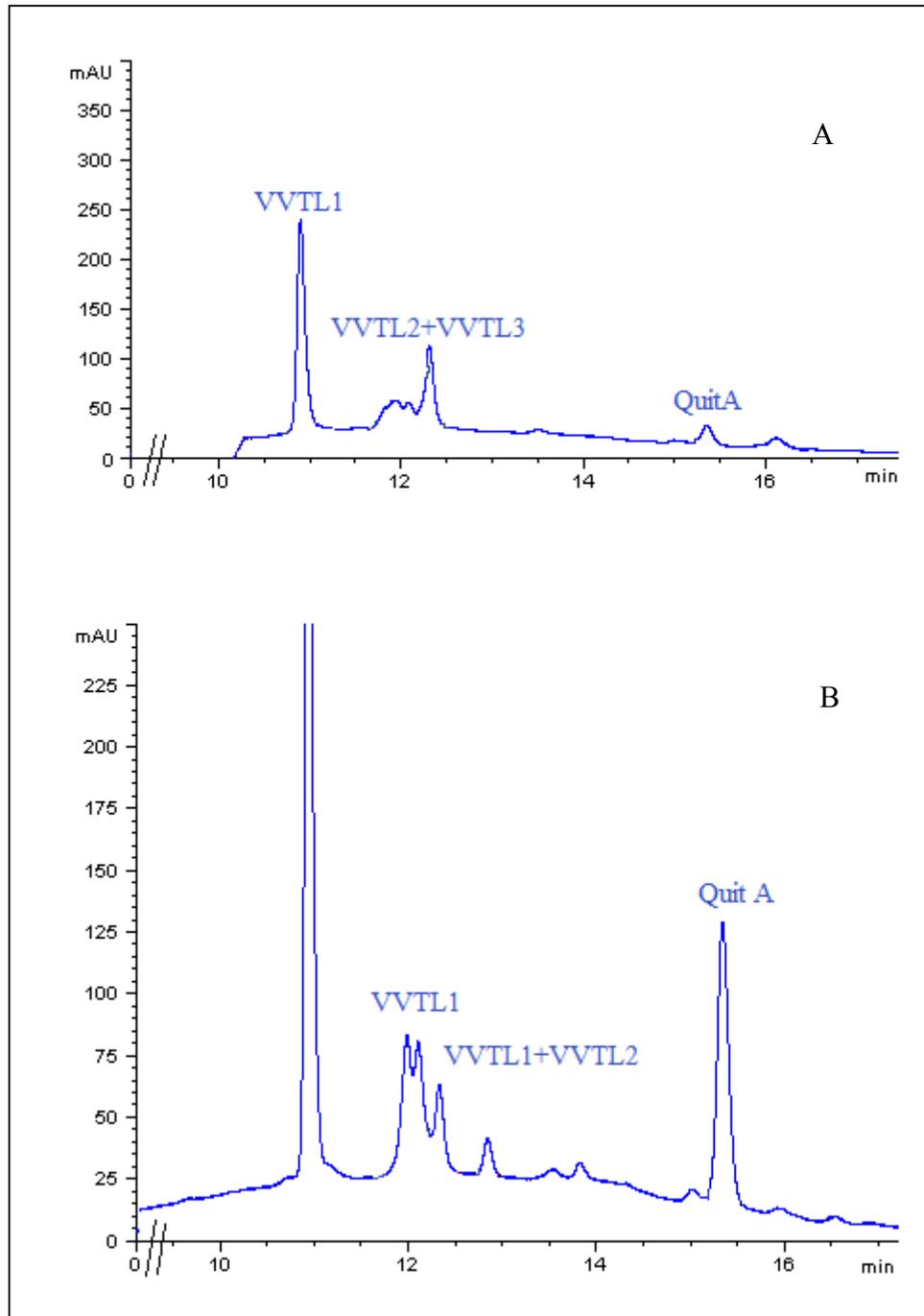


Figura 3.1. Cromatogramas de RP-HPLC de proteínas patogénicas de jugo libre del clon 107 de las zonas cálida (A) y fría (B) de Sauvignon blanc del valle de Casablanca.

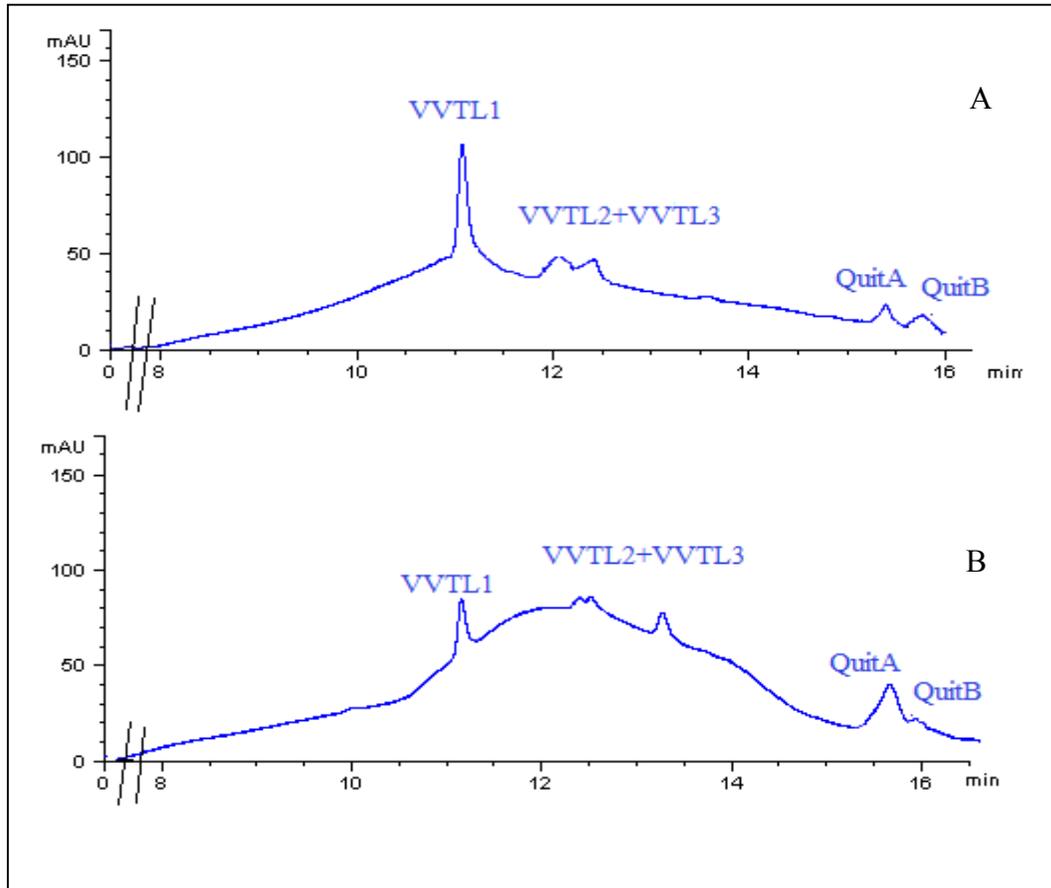


Figura 6.1. Cromatogramas de RP-HPLC de proteínas patogénicas de jugo libre del clon 4 (A) y clon 5 (B) de Chardonnay de la zona cálida del valle de Casablanca.

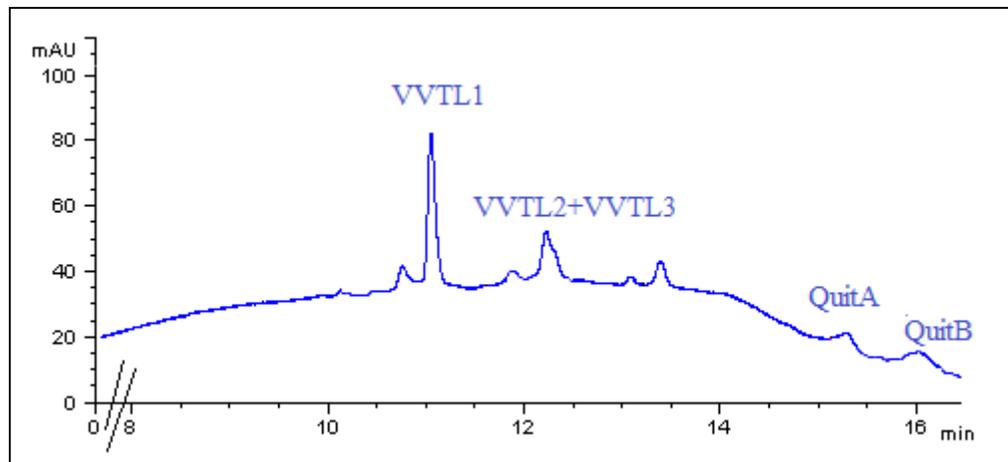


Figura 7.1. Cromatograma de RP-HPLC de proteínas patogénicas de jugo libre del clon 75 de Chardonnay de la zona fría del valle de Casablanca.

APÉNDICE II

Cuadro 2.2. Análisis básicos de los clones de Sauvignon blanc de la zona cálida en los distintos muestreos.

	Clon 1		Clon 107		Clon 242	
	Sólidos solubles*	pH	Sólidos solubles	pH	Sólidos solubles	pH
X1	16,10 ± 2,00	3,12 ± 0,09	16,50 ± 2,13	3,10 ± 0,10	16,10 ± 1,92	3,15 ± 0,03
X2	16,10 ± 1,98	3,24 ± 0,19	17,90 ± 2,12	3,38 ± 0,09	16,50 ± 1,91	3,43 ± 0,03
X3	20,18 ± 2,88	3,3 ± 0,10	22,05 ± 1,77	3,64 ± 0,21	17,50 ± 1,63	3,49 ± 0,00
X4	21,30 ± 2,41	3,35 ± 0,12			23,40 ± 1,33	3,55 ± 0,04
X5	22,83 ± 1,41	3,46 ± 0,06				

X1: envero, X3-X4-X5: cosecha, según el clon que corresponda.

*Sólidos solubles: °Brix.

Cuadro 3.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Sauvignon blanc, clon 1, zona cálida del valle de Casablanca.

	Taumatina		Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)	Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T1Z1X1	11,70p a ± 8,70	6,20 a ± 2,00	4,30 a ± 2,10	n.d
T1Z1X2	13,89 a ± 5,30	9,90 a ± 3,25	11,05 a ± 2,93	n.d
T1Z1X3	18,62 a ± 15,69	9,62 a ± 9,76	10,84 a ± 10,77	n.d
T1Z1X4	72,06 a ± 23,42	7,10 a ± 3,39	9,10 a ± 6,68	n.d
T1Z1X5	59,41 a ± 22,74	21,39 b ± 6,62	40,06 b ± 14,95	n.d

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. N.d. no identificado. X1: envero, X2- X3-X4: muestreos intermedios (cada 10 días), X5: cosecha.

Cuadro 4.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Sauvignon blanc, clon 107, zona cálida del valle de Casablanca.

	Taumatina		Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)	Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T2Z1X1	7,50p a ± 3,20	4,70 a ± 0,00	3,90 a ± 2,70	n.d
T2Z1X2	22,33 a ± 18,95	10,55 b ± 2,83	10,56 ab ± 9,83	n.d
T2Z1X3	29,26 a ± 22,08	19,51 b ± 5,50	31,60 b ± 9,57	n.d

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. N.d. no identificado. X1: envero, X3: cosecha.

Cuadro 5.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Sauvignon blanc, clon 242, zona cálida del valle de Casablanca.

	Taumatina		Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)	Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T3Z1X1	4,76p a ± 3,18	4,66 a ± 2,18	9,70 a ± 6,45	n.d
T3Z1X2	23,35 ab ± 22,99	4,83 a ± 2,74	30,24 b ± 1,92	n.d
T3Z1X3	46,81 b ± 6,94	20,30 b ± 3,68	50,24 a ± 1,34	n.d
T3Z1X4	53,90 b ± 3,30	24,43 b ± 1,40	54,93 c ± 4,50	n.d

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. N.d. no identificado. X1: envero, X2-X3: muestreos intermedios (cada 10 días), X4: cosecha.

Cuadro 7.2. Análisis básicos de los clones de Sauvignon blanc de la zona fría en los distintos muestreos

	Clon 1		Clon 107		Clon 242	
	Sólidos solubles*	pH	Sólidos solubles	pH	Sólidos solubles	pH
X1	8,70 ± 3,00	2,82 ± 0	13,30 ± 5	3,38 ± 0,03	17,72 ± 1,8	2,94 ± 0,13
X2	13,50 ± 0,21	2,91 ± 0	17,40 ± 0,21	3,43 ± 0	18,11 ± 0,78	3,22 ± 0
X3	22,00 ± 0,00	3,51 ± 0,04	18,50 ± 0,21	3,46 ± 0,07	19,72 ± 0,47	3,43 ± 0,13
X4			18,50 ± 3,68	3,56 ± 0,04	23,13 ± 0,07	3,48 ± 0,13
X5			22,00 ± 8,2	3,61 ± 0,2		

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. N.d. no identificado. X1: envero, X3-X4-X5: cosecha, según el clon.

*Sólidos solubles: °Brix

Cuadro 8.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Sauvignon blanc, clon 1, zona fría del valle de Casablanca

	Taumatina			Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T1Z2X1	0,94 ^p a ± 0	0 a ± 0	0	4,59 a ± 0,42	n.d
T1Z2X2	2,89 b ± 0,52	2,82 b ± 0,32	0,32	1,15 a ± 0	n.d
T1Z2X3	2,80 b ± 0,28	3,06 b ± 0,64	0,64	9,96 a ± 10,39	n.d

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. N.d. no identificado. X1: envero, X2: muestreo intermedio (a 10 días), X3: cosecha.

Cuadro 9.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Sauvignon blanc, clon 107, zona fría del valle de Casablanca.

	Taumatina			Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T2Z2X1	1,35 ^p a ± 0,20	1,43 a ± 0,28	0,28	1,13 a ± 0,00	n.d
T2Z2X2	3,17 a ± 1,12	2,35 a ± 0,30	0,30	5,16 a ± 0,30	n.d
T2Z2X3	7,65 a ± 6,97	7,90 a ± 0,00	0,00	7,90 a ± 3,48	n.d
T2Z2X4	9,85 a ± 3,27	6,35 a ± 0,23	0,23	14,33 b ± 1,15	n.d
T2Z2X5	24,43 b ± 1,10	16,81 b ± 0,43	0,43	11,96 c ± 1,23	n.d

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2, X3-X4: muestreos intermedios (cada 10 días), X5: cosecha.

Cuadro 10.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Sauvignon blanc, clon 242, zona fría del valle de Casablanca.

	Taumatina			Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T3Z2X1	8,31 ^p a ± 4,39	9,36 a ± 4,27	4,27	7,79 a ± 4,17	n.d
T3Z2X2	17,30 a ± 12,73	6,78 a ± 6,62	6,62	7,45 a ± 3,75	n.d
T3Z2X3	15,50 a ± 20,60	8,00 a ± 0,00	0,00	12,70 a ± 11,00	n.d
T3Z2X4	64,11 b ± 3,01	43,83 b ± 2,74	2,74	50,24 b ± 1,34	n.d

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2, X3: muestreos intermedios (cada 10 días), X4: cosecha

Cuadro 12.2. Análisis básicos de los clones de Chardonnay de la zona cálida en los distintos muestreos

	Clon Mendoza			Clon 4			Clon 5		
	Sólidos solubles*		pH	Sólidos solubles		pH	Sólidos solubles		pH
X1	19,12 ± 2,20	2,72 ± 0,00	14,20 ± 0,10	2,80 ± 0,10	15,95 ± 0,64	3,10 ± 0,00			
X2	21,32 ± 1,91	3,17 ± 0,04	19,51 ± 0,14	3,11 ± 0,22	16,10 ± 3,20	3,13 ± 0,01			
X3	23,51 ± 1,13	3,23 ± 0,02	24,52 ± 0,78	3,17 ± 0,03	19,10 ± 0,29	3,18 ± 0,04			
X4	23,81 ± 0,21	3,66 ± 0,06			21,15 ± 0,49	3,63 ± 0,06			

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. N.d. no identificado X1: envero, X3-X4: cosecha, según el clon.
*Sólidos solubles: °Brix

Cuadro 13.2. Contenido de proteínas patogénicas, de tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Chardonnay, clon Mendoza, zona cálida del valle de Casablanca.

	Taumatina			Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T4Z1X1	8,50p a ± 3,70	4,30 a ± 2,10	3,80 a ± 3,30	1,50 a ± 0,20	
T4Z1X2	26,95 a ± 0,52	7,86 a ± 1,22	7,31 a ± 0,55	3,43 a ± 0,87	
T4Z1X3	26,10 a ± 23,19	19,70 a ± 16,69	4,60 a ± 3,54	3,75 a ± 2,05	
T4Z1X4	40,81 a ± 1,57	13,14 a ± 0,37	14,11 b ± 0,37	4,24 a ± 0,37	

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2- X3: muestreos intermedios (cada 10días),X4: cosecha.

Cuadro 14.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Chardonnay, clon 4, zona cálida del valle de Casablanca.

	Taumatina			Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T5Z1X1	4,95p a ± 1,39	2,15 a ± 1,53	3,31 a ± 2,87	1,22 a ± 0,22	
T5Z1X2	3,22 a ± 1,11	2,72 a ± 0,3	1,32 a ± 0,11	5,33 b ± 0,71	
T5Z1X3	4,95 a ± 1,34	3,21 a ± 2,98	3,31 a ± 2,83	1,74 a ± 0,94	

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2: muestreos intermedios (cada 10días), X3: cosecha.

Cuadro 15.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Chardonnay, clon 5, zona cálida del valle de Casablanca.

	Taumatina				Quitinasa			
	VVTL1(mg/L)		VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)		Chit B(mg/L)	
T6Z1X1	5,81p	a ± 2,4	2,09	a ± 1,3	3,29	a ± 3,2	3,59	a ± 3,41
T6Z1X2	10,89	a ± 5,94	4,99	a ± 5,23	5,75	ab ± 3,32	2,24	a ± 0,94
T6Z1X3	17,03	a ± 0,23	28,42	a ± 1,34	10,42	b ± 0,37	10,22	a ± 0,18
T6Z1X4	43,88	a ± 52,45	20,88	a ± 23,26	1,22	a ± 0,24	22,92	a ± 28,69

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2- X3: muestreos intermedios (cada 10días), X4: cosecha

Cuadro 17.2. Análisis básicos de los clones de Chardonnay de la zona fría en los distintos muestreos.

	Clon Mendoza				Clon 75			
	Sólidos solubles*		pH		Sólidos solubles		pH	
X1	14,30	± 0,10	2,80	± 0,20	13,61	± 1,41	2,89	± 0,08
X2	17,30	± 6,65	3,12	± 0,07	17,15	± 0,49	3,22	± 0,03
X3	20,80	± 0,07	3,20	± 0,01	20,05	± 0,78	3,25	± 0,03
X4					20,06	± 0,57	3,53	± 0,04

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2: muestreos intermedios (cada 10días), X3-X4: cosecha.

*Sólidos solubles: °Brix.

Cuadro 19.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Chardonnay, clon Mendoza, zona fría del valle de Casablanca.

	Taumatina				Quitinasa			
	VVTL1(mg/L)		VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)		Chit B(mg/L)	
T4Z2X1	2,60	a ± 2,30	2,80	a ± 2,50	3,10	a ± 2,80	1,40	a ± 0,00
T4Z2X2	3,53	a ± 0,25	3,40	a ± 0,99	2,40	a ± 1,27	4,45	a ± 3,46
T4Z2X3	14,32	a ± 16,21	13,44	a ± 8,65	1,03	a ± 0,01	2,92	a ± 2,62

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2: muestreos intermedios (cada 10días), X3: cosecha

Cuadro 20.2. Contenido de proteínas patogénicas, tipo taumatina y quitinasa durante la maduración en jugos de cv. Chardonnay, clon 75, zona fría del valle de Casablanca.

	Taumatina			Quitinasa	
	VVTL1(mg/L)	VVTL2+VVTL3(mg/L)		Chit A(mg/L)	Chit B(mg/L)
T7Z2X1	9,6 a ± 8,25	3,30 a ± 1,44		3,30 a ± 3,27	1,30 a ± 0,28
T7Z2X2	1,51 a ± 0,08	4,05 a ± 0,67		1,07 a ± 0,07	3,16 a ± 0,54
T7Z2X3	1,92 a ± 0	6,76 a ± 0,32		1,00 a ± 0,15	1,83 a ± 0,04
T7Z2X4	11,00 a ± 0,05	13,3 a ± 13,01		3,25 a ± 2,05	3,00 a ± 2,05

P: Promedios ± DS, con 4 repeticiones. X1: envero, X2-X3: muestreos intermedios (cada 10días), X4: cosecha

ANEXOS

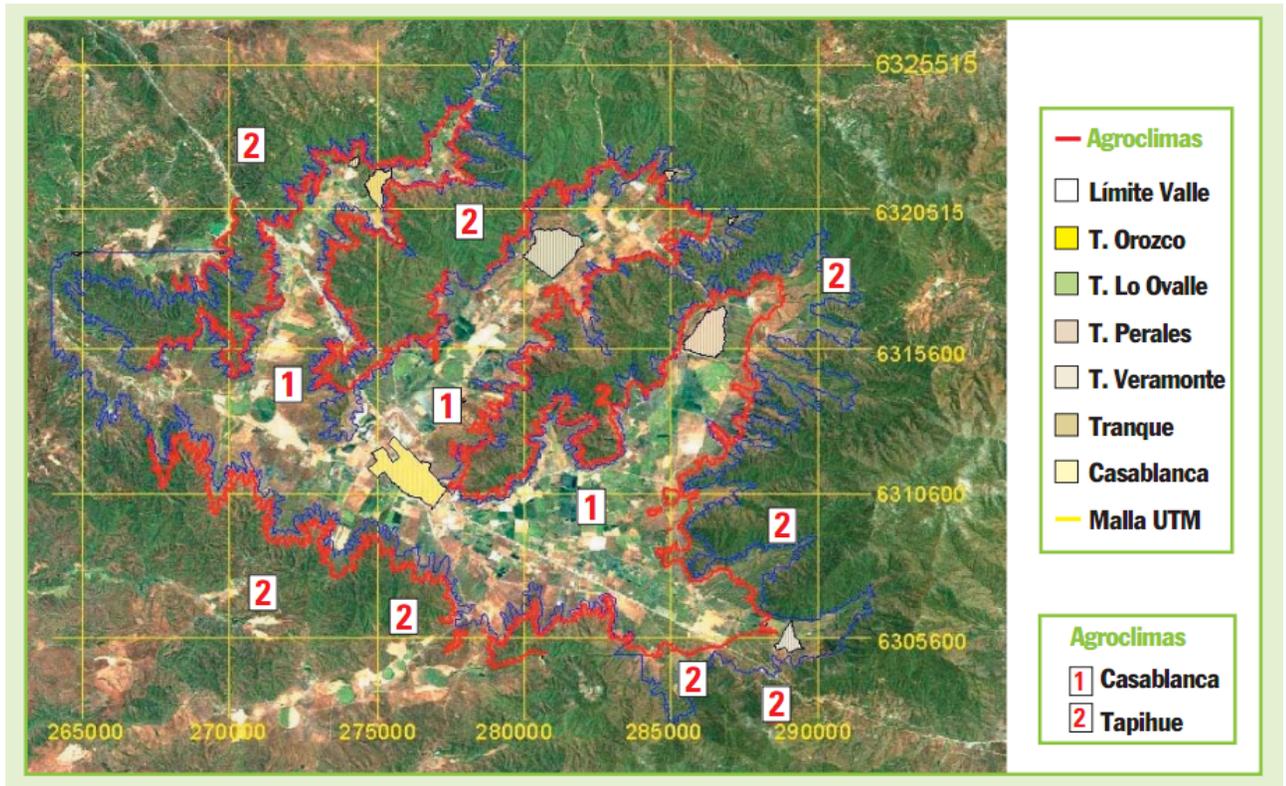
Anexo 1. Series de suelo del Valle de Casablanca



Fuente: Computer training System

TAP: Tapihue.
CSB: Casablanca.
RCB: Santa Rosa de Casablanca.

Anexo 2. Distribución de agroclimas del Valle de Casablanca



Fuente: Instituto de Investigación Agropecuarias (INIA). Villaseca, S. y M. Álvarez (2002).