

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**EFFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE LUMINOSIDAD  
SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA EXPRESIÓN  
GÉNICA DE ENZIMAS DE LA RUTA FENILPROPANOIDE  
EN BAYAS DE var. CARMÈNÈRE.**

**JAVIERA ALEJANDRA LÓPEZ PINTO**

**Santiago, Chile  
2008**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**EFFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE LUMINOSIDAD  
SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA EXPRESIÓN  
GÉNICA DE ENZIMAS DE LA RUTA FENILPROPANOIDE  
EN BAYAS DE var. CARMÉNÈRE.**

**EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF LIGHTNESS ON THE  
PHENOLIC COMPOSITION AND GENE EXPRESSION OF  
ENZYMES IN THE PATH FENILPROPANOIDE BERRIES var.  
CARMÉNÈRE.**

**JAVIERA ALEJANDRA LÓPEZ PINTO**

**Santiago, Chile  
2008**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE AGRONOMÍA**

Título

**EFFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE LUMINOSIDAD SOBRE LA  
COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE  
ENZIMAS DE LA RUTA FENILPROPANOIDE EN BAYAS DE var.  
CARMÉNÈRE.**

Memoria para optar al título profesional de:  
Ingeniera Agrónoma  
Mención: Sanidad Vegetal

**Javiera Alejandra López Pinto**

	Calificaciones
Profesor Guía	
Sr. Claudio Pastenes V. Ingeniero Agrónomo Ph. D.	7.0
Profesores Evaluadores	
Thomas Fichet L. Ingeniero Agrónomo Dr.	6.8
Jaime Rodríguez M. Ingeniero Agrónomo M. Sc.	6.5

Santiago, Chile  
2008

## **Agradecimientos**

A mi profesor guía, el Sr. Claudio Pastenes por orientarme durante el desarrollo de esta investigación, a Rodrigo Pulgar y Úrsula Arriagada por su ayuda y entrega.

A mi madre por su infinito amor, a mi padre por su ejemplo y apoyo incondicional, a mis hermanos por su alegría.

A Paula Chodin, Felipe León y Catalina López por su amistad y oportuno consejo.

A Cristóbal Asenjo por su compañía, cariño y protección durante este largo camino.

A Dios...

Gracias.

**INDICE**

RESUMEN.....	6
SUMMARY .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
MATERIALES Y MÉTODO .....	13
Microclima de racimos.....	13
Análisis de bayas.....	14
Preparación de muestras de uva: .....	14
Fenoles Totales: .....	14
Taninos Totales: .....	14
Antocianos Totales:.....	15
Determinación de antocianos individuales por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	15
Procedimientos de biología molecular .....	16
Partidores: .....	16
Extracción y purificación de RNA:.....	16
Determinación de la calidad del RNA y verificación de su integridad:.....	17
Electroforesis de geles denaturantes de azarosa: .....	17
Síntesis de cDNAs: .....	17
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): .....	18
Electroforesis para cDNA: .....	18
Análisis densitométricos: .....	18
Diseño Experimental.....	18
Análisis Estadístico .....	19
RESULTADOS .....	20
DISCUSIÓN .....	26
CONCLUSIONES .....	37
LITERATURA CITADA .....	38
ANEXOS .....	43

**“EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE LUMINOSIDAD SOBRE LA  
COMPOSICIÓN FENÓLICA Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE  
ENZIMAS DE LA RUTA FENILPROPANOIDE EN BAYAS DE VAR.  
CARMÉNÈRE.”**

EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF LIGHTNESS ON THE PHENOLIC  
COMPOSITION AND GENE EXPRESSION OF ENZYMES IN THE PATH  
FENILPROPANOIDE BERRIES VAR. CARMÉNÈRE.

Javiera Alejandra López Pinto

**RESUMEN**

Los flavonoles son, entre otros, importantes compuestos de los atributos organolépticos del vino. Antocianos, flavonoles y flavanoles confieren color, astringencia y amargor al vino tinto y, también, determinan su potencial de envejecimiento. Su concentración resulta de la combinación de diversos factores de suelo, clima y prácticas culturales. En cuanto a este último, la eliminación de hojas exponiendo los racimos, ya sea a luz directa o difusa es una práctica común en la vitivinicultura de climas fríos. En cuanto a climas más cálidos, el efecto de exposición a la luz es todavía controversial. En el presente estudio, el efecto de la intensidad de la luz sobre el contenido de azúcar y pH, fenoles totales, taninos y contenido de antocianos, así como la expresión de genes de enzimas de la ruta fenilpropanoide fueron evaluados en bayas de Carménère de un viñedo del Maipo. Además se determinó el perfil de antocianinas de las pieles de las bayas.

Como era de esperar, en el Valle del Maipo, la exposición a la luz afecta seriamente la temperatura de la piel y pulpa de las bayas. Sin embargo, no se observó efecto sobre el tamaño y volumen de las bayas, así como también en la concentración de azúcar, acidez y el pH. De los tres genes evaluados, sólo DFR (dihidroflavonol reductasa) aumentó su expresión con la luz, contrario de lo que se ha informado hasta el momento, baja intensidad de luz resultó en un aumento en la expresión. Intensidades de luz baja ocasionan altos contenidos de antocianinas de pinta a cosecha, especialmente las formas glucosiladas y acetil-glucosiladas en comparación con las formas cumaril-glucosiladas. Esto es importante para la vinificación, ya que las primeras son menos estables y, por tanto, más extraíbles en comparación con las segundas.

Palabras Claves: *Vitis vinifera*, Carménère, flavonoles, antocianos, luminosidad, temperatura, PAL, CHS y DFR.

## SUMMARY

Flavonoids are, among others, important compounds for organoleptic attributes of wine. Anthocyanins, flavanols and flavonols confer color, astringency and bitterness to red wine and, also, determine the potential for aging. Their concentration results from a various combinations of factors from soil, weather and cultural practices. As for the latter, leaf removal exposing clusters to either direct or diffuse light are a common practice in cold climates viticulture. As for warmer climates, the effect of light exposure is still controversial. In the present study, the effect of light intensity on sugar content and pH, total phenols, tannins and anthocyanins content, as well as gene expression for enzymes of the phenylpropanoid pathway were assessed in Carménère berry grapes from a Maipo vineyard. Also, determination of the anthocyanin profile of berry skins was determined. As expected, in the Maipo Valley, light exposure severely affects berry skin and flesh temperature. However, no effect is observed on berry size and volume, as well as sugar concentration, acid content and pH. From the three genes assessed, only DFR (dehydroxyflavonol reductase) increases its expression upon light, but contrary to what has been reported so far, low light intensities increases expression. Low light intensity results in high anthocyanin content from veraison to harvest, particularly the glucosilated and acetylglucosilated forms compared to the cumarylglucosid forms. This is important for wine making since the former are less stable and, therefore, more extractable compared to the latter.

Key words: *Vitis vinifera*, Carménère, flavonoid, anthocyanins, lightness, temperature, AL, CHS y DFR.

## INTRODUCCIÓN

Para la obtención de vinos tintos de alta calidad, se debe tener en cuenta que uno de los factores de mayor relevancia es la materia prima, es decir, la baya y sus características. Estas últimas las adquiere a lo largo del proceso de maduración y desde un punto de vista enológico, son la síntesis de compuestos fenólicos, el nivel de polimerización de ciertos flavonoides, la acumulación de azúcares y la obtención de niveles óptimos de acidez, entre otros.

Los compuestos flavonoides comúnmente detectados en bayas de vid pertenecen fundamentalmente a tres grupos: antocianos, flavonoles y taninos. Los antocianos están encargados de entregar la pigmentación roja a los vegetales (Ribéreau-Gayon y Glories, 1986), siendo predominante en las bayas de variedades tintas. Los flavonoles son generalmente considerados agentes de protección UV, los cuales, aunque incoloros contribuirían con el color del vino, al actuar como copigmentos de antocianinas (Downey *et al.*, 2003). En cuanto a los taninos, incluyen compuestos que van desde pequeños oligómeros hasta grandes polímeros, siendo determinantes de la calidad del vino, ya que aportan la astringencia, el cuerpo y contribuirían a la estabilidad del color.

Los antocianos son sintetizados en tejidos específicos y durante determinadas etapas del desarrollo de la baya. Estos compuestos son objeto de investigaciones genéticas y bioquímicas intensas, lo que ha llevado a la dilucidación de la ruta de síntesis (Boss *et al.*, 1996). También se ha determinado que el aumento de los compuestos, usualmente, refleja un aumento de la actividad de las enzimas ligadas a dicho evento (Hiratsuka *et al.*, 2001). Estas, a su vez, estarían determinadas por la expresión de los genes que codifican para las enzimas en cuestión. Por lo tanto, la naturaleza, concentración y proporción relativa de estos compuestos está determinada por factores genéticos. (Sugui *et al.*, 1999, Robinson y Davies, 2000).

La síntesis de antocianos comprende las rutas del ácido siquímico y la fenilpropanides. En un primer paso de la síntesis se origina ácido cinámico, a partir del aminoácido fenilalanina, el cual es desaminado por la enzima fenilalanina-amonio liasa (PAL), transformándolo en el primer compuesto fenólico de la planta hasta la formación de *p*-cumaroil-CoA, que es el precursor activo de los flavonoides.

Posterior a la actividad de la PAL, concurre una serie de enzimas involucradas en la síntesis de antocianos y flavonoles, tales como la chalcona sintetasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), flavanona-3-hidroxilasa (F-3-H), dihidroxiflavonol-4-reductasa (D-4-R), leucoantocianidina dioxigenasa (LDO), UDP glucosa flavonoide glicosil transferasa (UFGT), leucoantocianidina reductasa (LAR) y flavonol sintetasa (FLS). Esta vía de síntesis recibe el nombre de ruta fenilpropanoide (Robison y Davies, 2000).

En vid, la síntesis de antocianos coincide con la pinta, período en que la baya comienza a tomar color (Salazar y Malgarejo, 2005). Sin embargo, la expresión de genes que codifican para las enzimas PAL, CHS, F3R, DFR y UFGT se producen en dos fases: tempranamente en la floración y otra cercana al cambio de color del fruto o tardía (Boss *et al.*, 1996). Más específicamente, la actividad de UFGT se incrementa paralelamente a la acumulación de antocianos (Spayd *et al.*, 2002), mientras que la actividad de PAL y CHS disminuye al iniciarse la acumulación del pigmento (Roubelakis- Angelakis y Kliewer, 1986). Esto indicaría que la síntesis de antocianinas en la piel de bayas coincide con la expresión de genes de la ruta de biosíntesis, sugiriendo la existencia de genes reguladores involucrados (Spayd *et al.*, 2002).

Consistentemente con lo anterior, se han identificado mecanismos de regulación de la expresión, los cuales estarían bajo el control de dos familias, las proteínas MYC y MYB (Boss *et al.* 1996). Este control difiere dependiendo del gen estructural en cuestión, donde los genes denominados tempranos: CHS, CHI, F3R, y DFR, estarían regulados por un grupo de factores de transcripción y UFGT, por presentar un patrón de expresión diferente a los genes tempranos, sería inducido por otro. Los genes tempranos son regulados por la

proteína R2R3-MYB, la cual es codificada por el gen *VvMYB5a* (Deluc *et al.*, 2006), mientras que UFGT es regulada por el factor de transcripción codificado por el gen *VvmybA1* (Kobayashi *et al.*, 2002). Los controles a nivel de transcripción son importantes en la vía de síntesis y están regulados por diferentes condiciones ambientales y de desarrollo (Gollop *et al.*, 2002).

Es sabido que la luz es un factor preponderante en la biosíntesis de antocianos, ya que induciría un aumento de la abundancia del transcrito regulador de la expresión de UFGT, clave en la conversión de antocianidinas en antocianinas (Kobayashi *et al.*, 2002), aunque existen antecedentes contradictorios. También se ha reconocido a la fenilalanina amonio- liasa como una enzima regulada por la luz (Roubelakis- Angelakis y Kliewer, 1986; Curry, 1997), al igual que la CHS, CHI, y F3H (Jeong *et al.*, 2004). Sin embargo, se debe tener en consideración que la luz está altamente ligada a la temperatura, por lo que mientras la luz favorece la acumulación de antocianos (Kliewer, 1977), altas temperaturas causarían un efecto detrimental en la calidad de la fruta (Mori *et al.*, 2007).

La síntesis de flavonoides está fuertemente regulada por factores ambientales, tanto directos: luz (Bergqvist *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2007) y temperatura (Spayd *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2007), como indirectos: suministro de azúcares desde la canopia (Roubelakis- Angelakis y Kliewer, 1986) y la presencia de reguladores de crecimiento (ABA) (Jeong *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2006). Estos factores, a su vez, afectan el metabolismo primario de la planta impactando específicamente la fotosíntesis y la activación de señales a nivel de raíces. Por este motivo, los manejos agronómicos están orientados a modificar los factores señalados, para obtener una mejor calidad de la baya, que conllevará al consecuente mejoramiento del vino.

Una labor que se realiza en vitivinicultura es el manejo de la canopia, el cual involucra una serie de técnicas que alteran la posición y cantidad de hojas, brotes y fruto en el espacio para lograr el arreglo deseado. Su finalidad, entre otros, es el desarrollar variadas condiciones lumínicas que impacten en la fotosíntesis y en la calidad final de la baya.

(Smart, 1992). Sin embargo, el deshoje se realizó en zonas frías en las que la maduración de la fruta puede ser afectada por la dificultad para acumular los días grado (Spayd *et al.*, 2002). Lo anterior no considera que la vitivinicultura se ha extendido hacia otras regiones de diferentes condiciones climáticas, en las que la radiación solar no es una limitante para el desarrollo, por lo que la exposición directa de los racimos debe ser evitada para prevenir daños (Berqvist *et al.*, 2001). Además, la relación de la temperatura con la exposición a la luz solar sobre los racimos es importante porque afecta la composición y metabolismo de la baya, efecto que varía con el estado de desarrollo.

Debido a los antecedentes expuestos y al escaso conocimiento del impacto de la luz y temperatura sobre el metabolismo de las antocianinas en el cultivar Carménère, es que esta investigación pretende determinar el efecto de distintos niveles de iluminación sobre la actividad de la ruta de los fenilpropanoides y su metabolismo, teniendo como objetivos:

- Determinar el efecto de los distintos manejos del follaje sobre el microclima del racimo, temperatura de bayas y luminosidad de racimos en el cv. Carménère.
- Evaluar la influencia de los distintos niveles de luz sobre la evolución de metabolitos primarios y secundarios de la vid Carménère.
- Evaluar la influencia de los distintos niveles de luz sobre la expresión de los transcritos PAL, CHS y DFR de la ruta fenilpropanoide en el cv. Carménère

## MATERIALES Y MÉTODO

El ensayo se realizó durante la temporada 2006/2007, en la viña Santa Ema, localidad de Talagante, Región Metropolitana. Las determinaciones bioquímicas se realizaron en el laboratorio de Fisiología del Estrés en Plantas de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile y los análisis de composición fenólica de bayas se llevaron a cabo en el laboratorio de Enología.

Se utilizaron plantas homogéneas del *cv* Carménère establecida a pie franco, con un marco de plantación de 2,5 m entrehilera y 1 m sobrehilera, con una orientación noroeste, conducida en espaldera a dos brazos y con riego por goteo. El material vegetal utilizado correspondió a racimos y bayas de las plantas señaladas.

Los deshojes fueron realizados el 4 de Enero y consistieron en tres niveles de iluminación (Cuadro 1): sin deshoje en espaldera sur (Figura 1A), ausencia de deshoje en exposición norte de la espaldera (Figura 1B) y deshoje total de zona frutal en el lado norte de la espaldera (Figura 1C).

### **Microclima de racimos**

Se determinó la temperatura de racimo por medio de un termómetro infrarrojo (CHY 110) y la temperatura de la pulpa con un termómetro de termocupla (Extrech Instrument) insertada en la pulpa de las bayas. Las mediciones se realizaron 5 veces al día, a las 9:00, 11:00, 13:00, 15:00 y 17:00 h a un racimo por planta, en cuatro plantas por repetición en cada tratamiento. Del mismo modo, se midió la intensidad luminosa incidente sobre los mismos racimos a los que se les determinó la temperatura y en el mismo intervalo de tiempo. Para ello se utilizó un radiómetro de luz PAR (Delta ohm HD 9021). Las mediciones se realizaron en dos oportunidades, el 20 de febrero y el 20 de marzo.

**Análisis de bayas**

Para los análisis básicos se utilizaron 50 bayas a las que se les determinó el pH con un pH-metro (Denver Inst.), sólidos solubles (porcentaje Brix) con un refractómetro y acidez total por titulación con NaOH 0,1 N. Estas determinaciones se realizaron para 3 fechas distintas: 30 días después de pinta, correspondiente al 12 de febrero, 60 días después de pinta, correspondientes al 14 de marzo y 90 días después de pinta, correspondientes al 13 de abril.

A lo largo del ensayo, en las mismas fechas de muestreo para los análisis básicos, se colectaron 100 bayas por repetición para el análisis de polifenoles. La determinación de los fenoles totales se realizó mediante análisis espectrofotométrico (espectrofotómetro Shimadzu UV-1601). Las bayas fueron pesadas y se separó manualmente el hollejo de la semilla. Las submuestras obtenidas de la separación también fueron pesadas.

**Preparación de muestras de uva:** Para la extracción de polifenoles se utilizó la metodología adaptada de Venencie *et al.* (1997). A las muestras obtenidas en el paso anterior se le adicionaron 40 mL de medio vínico y agua destilada. Se molió con la miniprimer y se ajustó el pH a 3,6. Se completó la muestra hasta 200 g con agua destilada y se maceraron durante 2 h a temperatura ambiente, manteniendo la agitación de la muestra. Posteriormente se filtró la muestra por medio de una bomba de vacío y membranas Millipore (0,45 micra).

**Fenoles Totales:** Utilizando la técnica de García- Barceló (1990), las muestras maceradas, tanto de semilla como de hollejo, fueron diluidas por un factor de 20 con agua destilada y se les determinó la absorbancia a 280 nm en una cubeta de cuarzo. El resultado se multiplicó por el factor de dilución.

**Taninos Totales:** Los taninos fueron determinados mediante la reacción Bate- Smith, donde el extracto de hollejo fue diluido por un factor de 20, mientras que el de semilla fue leído directamente. En dos tubos de ensayo, con 4 mL de la muestra, se le agregó 2 mL de agua destilada y 6 mL de HCL 35%. Luego, uno fue sometido a baño maría a 90°C durante

30 minutos y el otro a oscuridad a temperatura ambiente. A ambas muestras se les midió la absorbancia a 550 nm y se calculó la concentración de taninos mediante la resta del primer y segundo tubo y la posterior multiplicación por el coeficiente de extinción molar de la cianidina.

**Antocianos Totales:** La determinación de los antocianos se realizó a través de la decoloración por bisulfito (García- Barceló, 1990). En un matraz Erlenmeyer con 1 mL de extracto de hollejo se adicionó 1 mL de alcohol ácido y 20 mL de HCl 2%. La muestra preparada se separó en dos tubos de ensayos, cada uno con 10 mL y se les añadió 4 mL de NaHO<sub>3</sub> y 4 mL de agua destilada, respectivamente. Luego, se esperó 20 minutos y se midió la absorbancia a 520 nm. La concentración fue determinada por la resta del primer y segundo tubo, multiplicado por el coeficiente de extinción molar de la malvidina.

#### **Determinación de antocianos individuales por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Para todas las muestras se determinó la composición antociánica mediante técnicas de individualización por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para eso se filtró el extracto obtenido de la piel de las bayas en membranas de 0,45 µm, para luego ser inyectadas en HPLC.

El equipo utilizado para realizar la detección del perfil antociánico correspondió a un HPLC (Merck Hitachi), equipado con una bomba modelo L-6200, un inyector automático (L-7200), un detector de arreglo de fotodiodos alineados (L-7455) y una columna LiChrospher RP-18(5µm), 250mm. Las cromatográficas correspondieron a temperatura ambiente, longitud de detección 520 nm y volumen de inyección de 150 µm. Los compuestos antociánicos fueron posteriormente identificados mediante la comparación de su espectro de absorción y tiempo de retención con su respectivo estándar.

**Procedimientos de biología molecular**

Todos los procedimientos de biología molecular se realizaron como se describe en Ausubel *et al.*, (1999). Los muestreos se realizaron el 12 de Enero (pinta), 21 de Febrero (40 ddp) y 2 de Abril (80 ddp).

**Partidores:** La amplificación por PCR de las secuencias de interés fue realizada con partidores diseñados utilizando el programa Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International) y sintetizados por Alpha DNA (Québec, Canadá). Las parejas de partidores poseen una temperatura de melting ( $T_m$ ) que difieren en menos de 58 °C, no forman dímeros de partidores, ni autocomplemento de bases según las predicciones del programa utilizado en su diseño.

**Extracción y purificación de RNA:** Cinco gramos de tejido congelado de distintos estados de desarrollo de baya, fueron molidos en un mortero enfriado por nitrógeno líquido, hasta pulverizar la muestra. Esta se agregó a un tubo de 50 mL que contenía 10 mL de solución amortiguadora de perclorato de sodio 5M y 200  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente, esta muestra se filtró utilizando una jeringa de 10 mL a través de un filtro de Miracloth (Calbiochem) seguida de una columna de lana de vidrio. Luego se centrifugó a 1520 g a 4 °C en centrífuga Hettich (Universal 320) por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante, el cual fue transferido a un nuevo tubo de 50 mL y se adicionó 2 volúmenes de etanol absoluto frío, dejándose precipitar durante 30 minutos a -20 °C. Pasado este tiempo, se centrifugó por 30 minutos a 1520 g a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido, fue resuspendido en 2mL de agua DEPC autoclavada y transferido a un tubo eppendorf de 2 mL. Se extrajo esta muestra dos veces con 1 mL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) centrifugando en cada ocasión a 18.620 g por 5 minutos en una centrífuga Hettich (Universal 320) y recuperando la fase acuosa. Se realizó una última extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en las mismas condiciones de centrifugación. La fase acuosa recuperada, fue adicionada en 200  $\mu$ L de agua DEPC autoclavada y se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (pH 4.8) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se dejó precipitando por 30 minutos a -20 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1

mL de etanol 70% frío. Se centrifugó a 18.620 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se secó la muestra por inversión en papel secante. Luego se resuspendió en 250 µL de agua de DEPC inactiva. Se le adicionó 250 µL de cloruro de litio 10 M, mezclando y dejando precipitar por 30 minutos a -20 °C. Luego se centrifugó a 18.620 g por 30 minutos a 4 °C, eliminando el sobrenadante y secando el pellet invertido a temperatura ambiente. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol 70% frío (en agua DEPC). Se centrifugó a 18.620 g por 30 minutos a 4 °C. Se descartó el etanol, y se secó el pellet por inversión del tubo sobre toalla absorbente. Finalmente, la muestra de RNA se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C.

**Determinación de la calidad del RNA y verificación de su integridad:** La calidad de cada muestra fue determinada mediante espectrofotometría (espectrofotómetro Shimadzu UV-1601), donde se midió la razón entre las absorbancia medidas a longitudes de onda de 260 y 240 nm (que representan la relación entre ácidos nucleicos y fenoles) y la razón entre las absorbancias medidas a longitudes de onda de 260 y 280 nm (que representan la relación entre ácidos nucleicos y proteínas en la muestra). La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en geles denaturantes de agarosa.

**Electroforesis de geles denaturantes de agarosa:** Se realizó geles denaturantes de agarosa al 1,2 % p/v (MOP 10X, formaldehído al 7 % v/v, formamida desionizada 1X) en buffer MOPS 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0,1 % v/v y las bandas fueron observadas en un trans-iluminador de luz ultravioleta (Ultralum. inc).

**Síntesis de cDNAs:** La síntesis del cDNA se realizó mezclando 10 µg de la muestra de RNA con 1 µL de partidor oligo dT (Promega) y 4 µL de agua libre de nucleasas. La muestra fue sometida a 70 °C durante 5 min para deshacer las estructuras secundarias del RNA y así permitir el alineamiento con el partidor. Además, 5 µL de Buffer 5x MMLV, 2,5 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y 1,5 µL de dNTP (Promega) se incluyeron en esta reacción y se incubó a 42 °C durante 90

min para posteriormente proceder a inactivar la enzima a 70 °C por 15 min. Finalmente, el cDNA fue guardado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** Para amplificar fragmentos de gen se realizaron PCR en volúmenes finales de 25 µL. En cada reacción se utilizaron 500 ng de cDNA, cuantificado por espectrofotometría, los cuales fueron mezclados con buffer de PCR 1X (Invitrogen), 10 mM dNTPs, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de partidores sense y antisense y 2 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Esta reacción se incubó en un termociclador (MyCycler), utilizando un programa de amplificación que comprende un paso de desnaturación inicial a 95 °C por 5 min; 25-35 ciclos de desnaturación por 30 s, alineamientos a la temperatura adecuada (dependiendo de la T<sub>m</sub> de los partidores 58 °C), por 1 minuto y extensión a 72 °C considerando 30 s por cada Kb de producto a amplificar. Finalmente, se incorporó un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min. Las reacciones de amplificación fueron verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa.

**Electroforesis para cDNA:** En todos los casos, la electroforesis para DNA se realizó en geles de agarosa al 1 % p/v en buffer TAE 1X (Tris-HCl, ácido acético, EDTA). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio al 0,1 % v/v y las bandas fueron observadas en un trans-iluminador de luz ultravioleta (Ultralum. inc). Los geles fueron posteriormente fotografiados con a una cámara para su registro y posterior análisis.

**Análisis densitométricos:** Las concentraciones de DNA fueron determinadas mediante el análisis densitométrico de las bandas observadas en geles de agarosa. Para esto, luego de las electroforesis, los geles fueron fotografiados y las fotografías analizadas con el programa KODAK 1D. Así, se calculó la concentración desconocida comparándola con el valor de intensidad de bandas.

### **Diseño Experimental**

El diseño experimental correspondió a bloques completos al azar con ocho repeticiones, donde cada bloque correspondió a tres tratamientos de luz. Dentro de cada hilera, se

seleccionaron 20 plantas consecutivas con el respectivo manejo de deshoje: deshoje total o sin deshoje.

### **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos fueron sometidos a test de normalidad e igualdad de varianza, para posteriormente realizar el análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de comparación Múltiple de Tukey ( $p \leq 5$ ), con el fin de identificar las posibles diferencias entre las medias de los tratamientos.

## RESULTADOS

Con la finalidad de caracterizar el microclima del racimo se realizaron mediciones de radiación incidente y temperatura alcanzada por las bayas en dos condiciones distintas: día despejado y con nubosidad hasta el mediodía. En la Figura 2, se observa la radiación incidente en el racimo a diferentes horas del día. La medición se realizó en forma perpendicular al sol (Figura 2A) o paralela al racimo (Figura 2B). En la Figura 2A, se observa que para el tratamiento de alta luz, la radiación interceptada por los racimos va en aumento desde las 9:00 h, hasta alcanzar la máxima interceptación a las 15:00 h. Luego, la radiación disminuye abruptamente desde  $2036 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$  hasta  $1063 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Esto contrasta con los niveles alcanzados por el tratamiento de baja luz, que se mantiene constante entre  $30$  y  $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$  aproximadamente, a lo largo del día. La diferencia de radiación interceptada entre el tratamiento de mayor luminosidad y los de menor luminosidad: media y baja, son significativas en todas las evaluaciones. La interceptación luminosa medida perpendicularmente a la luz, alcanza su máximo entre las 11:00 y las 13:00, con niveles de  $700 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , aproximadamente, para descender en las horas de la tarde.

La radiación medida con el sensor posicionado horizontalmente (Figura 2B), sigue la misma tendencia que aquella obtenida de manera perpendicular al sol, en que el tratamiento de alta luz, aumenta hasta las 15:00 h para luego caer. Los tratamientos de luz intermedia y baja, no presentan variaciones en la radiación a lo largo del día, por lo que no se evidencian diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, sí se diferencian del tratamiento de mayor luminosidad. Cabe destacar que en la primera y última hora de medición, las diferencias entre el tratamiento de luz alta y los más restringidos, varían en el rango de los  $1000 \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mientras que en las horas de mayor incidencia de luz varía en  $2000 \mu\text{moles de fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Mediciones similares se realizaron un mes después, en condición de nubosidad hasta las 12 h (Figuras 2C y D) con tendencias similares a los previamente descritos. Las evaluaciones realizadas a las 13:00 h mostraron diferencias significativas entre los tres tratamientos, tanto para la radiación medida perpendicularmente como para la determinada paralelamente al racimo.

La Figura 3 muestra la temperatura evaluada al racimo a lo largo del día, tanto de la pulpa (Figura 3A), como de la superficie de las bayas (Figura 3B) en el mes de febrero. Como se observa en la Figura 3A, independiente del nivel de luminosidad, los racimos experimentan un aumento gradual de la temperatura de pulpa desde temprano en la mañana, hasta las 15:00 h aproximadamente, para luego mantenerse en el caso del tratamiento de baja luz, y disminuir para luz intermedia y alta. Asimismo, desde las 9:00 h hasta las 13:00 h, las temperaturas más altas de pulpa se observaron en el tratamiento de mayor luminosidad, seguidos por los de luz intermedia y luego los de baja luminosidad. Los niveles de temperatura alcanzados son muy altos, los que corresponden a 42 °C aproximadamente en alta e intermedia luz y 38 °C en baja luz (Figura 3A).

La temperatura de la piel de las bayas tiene un comportamiento similar a lo anteriormente descrito (Figura 3B), en el que la temperatura aumenta desde la primera medición hasta las 13:00 h para luego disminuir, en el caso del tratamiento de mayor luz, y mantenerse para los tratamientos de luminosidad media y baja. No existen diferencias significativas entre los tratamientos de luz intermedia y baja, pero si las hay entre estos tratamientos y el de alta luminosidad, entre las 9:00 y la 13:00 h. En general, la temperatura de la pulpa de las bayas alcanza temperaturas superiores a las registradas en la superficie de las mismas (Figura 3A, B, C y D).

La Figuras 3C y D muestran las temperaturas de racimo y pulpa en el mes de marzo, las cuales se diferencian sólo a partir de las 13:00 h, para el tratamiento de mayor luminosidad. La temperatura de pulpa (Figura 3C) a las 15:00 h presenta diferencias significativas para

todos los tratamientos, con un máximo de 40 °C aproximadamente para los racimos de mayor iluminación.

El peso de 100 bayas (Figuras 4A, B y C) no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de luz para ninguna de las fechas evaluadas. El peso promedio de las bayas fue de 130 g, valor alcanzado tempranamente a los 30 ddp (Figura 4A). Aún cuando el peso determinado a la piel de las bayas no mostró diferencias significativa entre los tratamientos (Figuras 4D, E y F) dentro de cada fecha, se observó una evolución sostenida del peso de hollejo a lo largo de la temporada para los tratamientos de media y alta luz. En el caso del peso de semillas, se puede observar en la Figuras 4G, H e I que este tiende a la baja en el tiempo para los tratamientos de baja y alta luz, presentando sólo diferencias significativas en la primera fecha de muestreo (Fig. 4G), donde el tratamiento de mayor luminosidad presentó un peso de semilla mayor que el tratamiento de media luz sin diferenciarse del de baja luminosidad.

Con respecto a la determinación de sólidos solubles, (Figuras 5A, B y C) se observó un aumento de la concentración a lo largo de la temporada. Sin embargo, al comparar entre tratamientos, para todas las fechas de muestreo, no se evidenció un impacto de la luz en la concentración de azúcares. En cuanto a la acidez titulable (Figuras 5D, E y F), no se observó diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las fechas estudiadas. En general, los niveles de acidez disminuyeron progresivamente en el curso de la maduración de las bayas. A los 30 ddp se observaron valores de 3,9 gL<sup>-1</sup>, para llegar a cosecha con niveles de 2,3 gL<sup>-1</sup>. Como era de esperar, el pH aumentó constantemente hasta el momento de cosecha (Figuras 5G, H e I). En la fecha de muestreo, correspondiente a 60 ddp, se apreciaron diferencias significativas para el tratamiento de media y baja luz, los que presentaron un valor menor al del tratamiento de mayor luminosidad (Fig. 5H).

En las Figuras 6A, B y C se presenta la concentración de fenoles totales acumulados en la piel de las bayas, sin evidenciarse diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada fecha de medición. En general, el promedio del contenido total de fenoles en piel, para

cada tratamiento, disminuyó desde los 30 ddp a 60 ddp para aumentar progresivamente a los 90 ddp, lo que alcanzó diferencias significativas en el tratamiento de baja intensidad luminosa (Figuras 6A, B y C). La evolución de los fenoles en semilla (Figuras 6D, E y F) presentó una tendencia poco clara durante el desarrollo de la baya, en la que no fue posible observar diferencias significativas entre los tratamientos dentro de cada fecha de medición. Cabe destacar que el contenido de fenoles en semilla presentó valores más altos que los observados en los hollejos de las bayas.

Respecto de los antocianos totales, no se observaron diferencias significativas a lo largo de la temporada para cada uno de los tratamientos, lo que indica que ya a los 30 ddp se alcanzó un máximo nivel de acumulación. Así mismo, la intensidad luminosa no determinó diferencias en la concentración de estos pigmentos en ninguna de las fechas de medición. (Figuras 6G, H y I).

En la Figura 7 (A, B y C) se presenta la concentración de taninos presente en la piel de las bayas, durante su maduración. Se puede apreciar que para la fecha correspondiente a 30 ddp existieron diferencias significativas para los tratamientos de luminosidad, donde los racimos expuestos a luminosidad media y alta mostraron una menor concentración de taninos que el tratamiento de baja luz. A los 60 ddp y 90 ddp, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de luminosidad de racimos. En la misma Figura es posible observar la disminución de la concentración de taninos en hollejos en todos los tratamientos para la evaluación realizada posterior a los 30 ddp. En las semillas, en tanto, (Figuras 7D, E y F), la concentración de taninos alcanzó valores más altos que en la piel y no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las fechas evaluadas. Sin embargo, se puede apreciar el descenso abrupto en el promedio de la concentración de taninos desde los 60 ddp a los 90 ddp, la que alcanzó niveles de significancia en los tratamientos de iluminación extremos.

Por medio del análisis del perfil antociánico de las bayas (Cuadros 3, 4 y 5), se identificó un total de 15 compuestos que, en orden de aparición en el cromatograma, correspondieron

a delfinidina-3-glucósido (Dp3Gl), cianidina-3-glucósido (Cy3Gl), petunidina-3-glucósido (Pt3Gl), peonidina-3-glucósido (Po3Gl), malvidina-3-glucósido (Mv3Gl), delfinidina-3-acetil-glucósido (Dp3acGl), cianidina-3-acetil-glucósido (Cy3acGl), petunidina-3-acetil-glucósido (Pt3acGl), peonidina-3-acetil-glucósido (Po3acGl), malvidina-3-acetil-glucósido (Mv3acGl), delfinidina-3-p-cumaril-glucósido (Dp3cumGl), cianidina-3-p-cumaril-glucósido (Cy3cumGl), petunidina-3-p-cumaril-glucósido (Pt3cumGl), peonidina-3-p-cumaril-glucósido (Po3cumGl) y malvidina-3-p-cumaril-glucósido (Mv3cumGl). En general, los distintos compuestos antociánicos determinados, resultaron en promedios mayores en concentración en bayas expuestas a baja intensidad a los 30 ddp (Cuadro 3).

A los 60 ddp, la predominancia de los distintos compuestos antociánicos cambia respecto de la fecha anterior, con niveles muy similares entre los distintos tratamientos de luminosidad de racimos (Cuadro 4). En este caso, las distintas especies tiendieron a concentrarse en los tratamientos de media y alta luminosidad de racimos. Por lo tanto, los compuestos Po3Gl, Mv3Gl, Pt3acGl y Cy3cumGl alcanzaron concentraciones significativamente superiores en los tratamientos de alta iluminación respecto de las bayas con baja iluminación (Cuadro 4). Así mismo, es notorio que el promedio de los contenidos de antocianos fue superior al determinado a los 30 ddp.

En cuanto a los 90 ddp (Cuadro 5), el contenido de cada uno de los compuestos antociánicos determinados disminuye ostensiblemente en comparación con lo observado a los 60 ddp (Cuadro 4). Más aún, las diferencias observadas en la primera fecha de medición, prácticamente desaparecieron (Cuadro 5). Al contrario de lo observado a los 30 ddp y 60 ddp, en este caso, a los 90 ddp, las diferencias significativas se redujeron a los compuestos Pt3Gl, Mv3Gl y Dp3acGl, pero al contrario de las fechas anteriores, la intensidad media y alta, presentaron los menores contenidos de estos compuestos.

El análisis de expresión relativa para los genes PAL, CHS y DFR realizado, en bayas expuestas a los diferentes tratamientos de luz, demostró que, la abundancia de los transcritos de PAL y CHS no presentó diferencias significativas para ninguna de las fechas

de muestreo evaluadas (Figura 8). Sin embargo, el gen DFR mostró diferencias significativas entre los tratamientos de baja y alta intensidad de luz durante la segunda fecha de evaluación. En la Figura 8H se observa que las bayas expuestas al tratamiento de baja luz presentaron una abundancia relativa mayor de DFR, con respecto al tratamiento de alta luminosidad. Dicha expresión no se mantuvo a los 90 ddp, fecha en la cual no se observaron diferencias significativas entre los distintos niveles de iluminación (Figura 8I).

## DISCUSIÓN

En general, es sabido que la producción de biomasa y el rendimiento potencial están determinados por la cantidad de radiación interceptada por el follaje, mientras que la composición de las bayas ha sido asociada a la exposición de las hojas y los racimos a la luz (Mabrouk y Sinoquet, 1998). Por otro lado, la oscuridad dentro de la canopia ha sido identificada como una de las mayores causas de la obtención de bayas pobres que determinan un vino de iguales características. La remoción del follaje modifica el régimen de luz disponible para la vid, lo que altera sustancialmente la temperatura y humedad de la canopia. Un aumento en la humedad trae consigo una disminución en el déficit de la presión de vapor, transpiración y fotosíntesis, así como también un aumento del riesgo de enfermedades fungosas o bacterianas. El aumento de la temperatura, ya sea por la radiación incidente o por efecto de la temperatura del aire, provoca un incremento en los procesos metabólicos de la planta, asociado al aumento del desarrollo y acumulación de metabolitos (Downey *et al.*, 2006). Sin embargo, altas temperaturas detiene procesos metabólicos o los reducen significativamente en vid cuando superan los 30°C (Coombe, 1987).

El impacto real del deshoje realizado en la zona frutal sobre los regímenes de luz, así como también la influencia del lado de la espaldera fueron determinados midiendo la radiación incidente sobre los racimos (Figuras 2A, B, C y D), las cuales resultaron ser significativamente distintas para radiación PAR directa (Figura 2A). Sin embargo, cuando la luz incidente es difusa (Figura 2C) las diferencias son inexistentes. Como era de esperar, la temperatura de las bayas fue afectada por los tratamientos de luz, observándose una temperatura mayor en racimos y pulpa de bayas completamente expuestos y menor en aquellas sometidas a sombreado (Figuras 3A y B). Los racimos expuestos presentaron una fluctuación en la temperatura de la baya mayor a lo que mostraron las más sombreadas, debido a que la temperatura de la baya de los racimos expuestos aumenta más rápidamente con la temperatura ambiente, que en racimos sometidos a moderada o baja intensidades de luz. Lo anterior se explica por el efecto de la mayor radiación incidente sobre la superficie

(Bergqvist *et al.*, 2001). Resulta importante destacar que la temperatura alcanzada por la pulpa de las bayas durante gran parte del día, desde las 11:00, alcanzó valores superiores a los 30°C, por lo que se puede suponer que los procesos metabólicos de las bayas se estarían viendo afectados.

Bergqvist *et al.* (2001) reportaron que el peso de las bayas aumentó al ser expuestas a mayores exposiciones de luz, debido a que la exposición no provocó temperaturas elevadas que impidieran el óptimo desarrollo de la baya. La generalidad indica que las bayas pierden peso gradualmente al estar expuestas a mayores radiaciones producto de las altas temperaturas que experimentan, afectando la división y elongación celular o bien, aumentando la transpiración del fruto, con la consecuente deshidratación de la baya (Crippen y Morrison, 1986). Sin embargo, los resultados obtenidos por Fujita *et al.* (2007) muestran que bayas sometidas a sombreadamiento pesan un 10% menos que el control.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los tratamientos de luz no impactaron en forma significativa el peso de las bayas (Figura 4), algo muy similar a lo reportado por Spayd *et al.* (2002), quien evaluó el peso en tratamientos de luz y temperatura en forma aislada, sin obtener diferencias para ninguno de estos factores. Similares resultados fueron obtenidos por Yamane *et al.* (2006) y Downey *et al.* (2004), quienes sugirieron que la luz no tiene un impacto consistente sobre el desarrollo de la baya y tampoco en el peso a la cosecha. Cabe destacar que en el presente estudio no hubo una separación de los factores luz y temperatura, es decir a mayor luminosidad del racimo (Figura 2), mayor fue la temperatura de pieles y pulpa. Aún así, ambos factores combinados no incidieron sobre el peso total de las bayas, así como tampoco en los componentes hollejo y semilla (Figuras 4F y I). Por otra parte, los deshojes se realizaron muy cerca de pinta, es decir, cuando el proceso de división celular se había prácticamente completado.

En general, a nivel de bayas de interés enológico, los metabolitos primarios fundamentalmente son aquellos relacionados con los azúcares y la acidez. Diversos estudios han informado que variaciones de temperatura en rangos fisiológicos entre 20 y

30°C no inciden sobre la concentración de azúcares al momento de cosecha (Crippen y Morrison, 1986; Spayd *et al.*, 2002; Jeong *et al.*, 2004 y Yamane *et al.*, 2006). Eso sí, Kliewer (1977) señala para el cultivar Syrah, temperaturas superiores a los 37°C inhiben la acumulación de azúcares en la bayas. Por otro lado, en estudios realizados en Cabernet Sauvignon, los sólidos solubles alcanzaron su máxima concentración en racimos expuestos a radiaciones que iban entre los 51- 100  $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Bergqvist *et al.*, 2001). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias en el porcentaje de sólidos solubles determinados a los 30 ddp, 60 ddp y 90 ddp entre los tratamientos de luminosidad (Figuras 5A, B y C), no obstante las temperaturas observadas a nivel de bayas difieren en 6 a 7 °C en algunas horas del día (Figura 3). Esto indicaría que la temperatura de pulpa umbral a la que se afecta la acumulación de azúcares es muy baja, afectándose todos los tratamientos por igual, o bien que en Carménère, las altas temperaturas no afectan la capacidad de llenado de azúcares, siendo consistentes con lo informado por Coombe (1989), quién sostiene que la actividad sink y la acumulación de azúcar durante el proceso de maduración de las bayas son independientes de los eventos externos.

En el caso de la acidez, en las bayas de vid tienen preponderancia el ácido tartárico, málico y cítrico fundamentalmente. Estos compuestos, en general responden al ambiente, al punto de que zonas climáticas frías son aptas para cepas en que se espera una expresión de acidez superior. Sin embargo, la acidez titulable no mostró diferencias entre los tratamientos de luminosidad (Figuras 5D, E y F), lo que contrasta con los resultados obtenidos por Bergqvist *et al.* (2001) y Spayd *et al.* (2002), quienes observaron que la acidez titulable, tanto en Cabernet Sauvignon como en Merlot, disminuyó al aumentar la exposición a la luz. Spayd *et al.* (2002) observaron que la temporada en que se acumuló más días grados, presentó una menor acidez. Esta tendencia a la baja se explicaría por la mayor temperatura alcanzada por las bayas, ya que según Yamane *et al.* (2006) bajas temperaturas inhiben la disminución de la acidez titulable. La menor concentración de ácidos en bayas es atribuible a la mayor respiración del ácido málico y tartárico por la alta temperatura a la que la fruta está expuesta (Salazar y Malgarejo, 2005).

Por otra parte, el aumento de la exposición de los racimos a la luz tiene un efecto muy bajo sobre el pH cuando las temperaturas son superiores al óptimo fisiológico, siendo un factor más determinante que la exposición de la fruta (Kliewer, 1977; Berqvist *et al.*, 2001). Este efecto explicaría el comportamiento del pH en este estudio, el cual concuerda con los resultados de acidez, excepto a los 60 ddp (Figura 5H) en la que las bayas sometidas a menor luminosidad, presentaron un promedio de pH ligeramente menor, aunque significativo en comparación con el tratamiento de luz media y alta.

Los fenoles son componentes del vino que tiene un gran impacto sobre las características sensoriales del vino tinto, sobre todo en el color, sabor y estructura. Se localizan en vacuolas de las células de las bayas, ya sea en la piel, semilla o pulpa y son extraídos durante la vinificación. Los compuestos fenólicos son clasificados como no flavonoides y flavonoides, de los cuales destacaremos los flavonoides, donde se encuentran a los flavonoles, taninos y antocianos (Berli *et al.*, 2008).

En el cultivar Malbec se observó que la composición fenólica se ve influenciada por la localización de las plantas con respecto al nivel del mar y a la radiación UV-B, aumentando su concentración a los 1500 m.s.n.m. con una mayor incidencia de radiación ultravioleta. Por lo tanto, ello sugiere que los rayos UV-B estimulan la transcripción de algunos genes implicados en la respuesta de protección a gran altura (Berli *et al.*, 2008). Por otro lado, en el presente estudio se observó que la concentración total de fenoles, tanto en piel (Figuras 6A, B y C) como en semillas (Figuras 6D, E y F), no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las fechas evaluadas, mientras que en el cultivar Cardinal se observó un aumento en la concentración de estos compuestos al ser sometida a tratamientos de luz (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986). Es importante destacar, eso sí, que las bayas del cultivar Cardinal se mantuvieron a 22° C, por lo que la temperatura sería un factor relevante tomando en consideración las altas temperaturas alcanzadas por las bayas de Carménère en el campo en el presente estudio.

Los antocianos son compuestos del grupo de los flavonoides que se caracterizan por su alto poder reductor y pueden ser inducidas rápidamente en respuesta al frío, radiación ultravioleta o ataques de patógenos. Son responsables de conferir el color rojo a las bayas y se sintetizan durante la pinta, acumulándose en las vacuolas de las tres o cuatro primeras capas celulares hipodérmicas de las bayas. Las antocianinas se acumulan para proteger al tejido del fotoestrés cuando se absorbe excesiva energía radiante que no puede ser utilizada (Del Valle *et al.*, 2005), por lo que una alta exposición a la luz generalmente estimula la acumulación de antocianos en las bayas, mientras que altas temperaturas inhiben la coloración de éstas (Kliwer, 1977).

Los antecedentes del real efecto de la luz sobre la acumulación de antocianos son contradictorios. En el cultivar Cardinal, por ejemplo, se observó que tanto tratamientos de luz, como aplicaciones de etileno, aumentaban la actividad de la enzima PAL, con el consecuente aumento de los antocianos, demostrando convincentemente que la exposición a la luz aumentaría la biosíntesis de antocianos. Por lo mismo, su producción podría ser manipulada por la exposición de los racimos a la luz. Sin embargo, esta investigación se realizó en condiciones altamente controladas (Roubelakis-Angelakis y Kliwer, 1986). En campo, Berqvist *et al.* (2001) monitorearon la luz y la temperatura en Cabernet Sauvignon y Garnacha, así como también, la acumulación de antocianos, reportando un incremento en la acumulación de estos compuestos con el aumento de la radiación por sobre los  $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en el lado norte de la espaldera (menor temperatura). En el lado sur, de mayor temperatura, con radiaciones que superaban los  $100 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , la concentración de antocianos disminuyó. De manera similar, Sapyd *et al.* (2002) observaron que bayas más expuestas a la luz, pero enfriadas artificialmente, presentaron una mayor concentración de antocianos que aquellas menos expuestas y sometidas a mayores temperaturas. Según los mismo autores, la acumulación de antocianos fue determinada por el efecto que ejercieron las temperaturas sobre las bayas, dejando la luz como un factor de menor importancia. De igual forma, en Syrah se observó que la ausencia de luz no afectó la acumulación de antocianos, por lo que este factor no sería un requerimiento absoluto para su biosíntesis (Downey *et al.*, 2004).

Generalmente, se sugiere que la temperatura influye mayormente en la biosíntesis de antocianos en vid, que la luz. Por lo que, considerando que el rango óptimo para la acumulación de antocianos está entre el rango los 17 y 26°C (Berqvist *et al.*, 2001), es que racimos expuestos a radiaciones mayores de 100  $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , provocarían temperaturas que impactarían en forma negativa la concentración de antocianos en las bayas (Downey *et al.*, 2006). Al igual que en el trabajo realizado por Downey *et al.* (2004), en el presente estudio no se pudo apreciar una diferencia en la concentración total de antocianos, a pesar de estar sometidos a tratamientos de luz significativamente diferentes (Figuras 6G, H e I). Esto puede ser explicado por la alta temperatura alcanzada por las bayas, independiente del tratamiento de luminosidad, las que se encontraron gran parte del tiempo a más de 30°C. Mori *et al.* (2007) sugirieron que la disminución de antocianos se podría deber a la degradación de los compuestos por efecto de las altas temperaturas y no a una inhibición de la síntesis. Esta degradación correspondería a degradaciones químicas y/o enzimáticas y a polimerización con proantocianidinas (Mori *et al.*, 2007).

Otro de los compuestos relevantes en bayas para vinificación son los taninos, también conocidos como flavanoles, los cuales contribuyen a la astringencia y amargor de bayas y vinos. Estos se acumulan en vacuolas tánicas de la piel y semillas de bayas, y su estructura básica corresponde a oligómeros y polímeros de flavon-3-ol, como por ejemplo (+) catequina y (-) epicatequina.

Con respecto a los efectos de la luz sobre la acumulación de taninos, en Syrah se observó que la exposición de racimos no afecta la concentración de taninos en las bayas (Downey *et al.*, 2004). Del mismo modo, en semillas no existe efecto de sombreamiento en el contenido o composición de taninos. En pieles de bayas a cosecha tampoco se aprecia diferencias en el contenido. Sin embargo, al evaluar la concentración y composición de los taninos a lo largo del desarrollo de bayas de Cabernet Sauvignon, se pudo observar diferencias entre racimos expuestos y sombreados en estados de desarrollo cercanos a pinta, donde racimos expuestos alcanzaron concentraciones mayores que los racimos sometidos a sombreamiento

(Fujita *et al.*, 2007). En el presente estudio, al evaluar el efecto de la luz sobre las bayas de cultivar Carménère, se observó diferencias en la concentración total en hollejos en el muestreo correspondiente a 30ddp (Figura 7A), donde bayas tratadas con bajas intensidades lumínicas acumularon mayor concentración de taninos. Sin embargo, esta diferencia dejó de existir a cosecha (90 ddp) (Figura 7C). En cuanto a la concentración de taninos en las semillas, no se apreciaron diferencias entre bayas tratadas con luz o sometidas a sombreadamiento (Figuras 7D, E y F). Los resultados obtenidos permiten inferir que la luz no afectaría los niveles de taninos en Carménère y Syrah al momento de cosecha. Sin embargo, en Syrah se observó que la luz afectó el grado de polimerización de los taninos, por lo que afectaría la composición tánica de bayas en forma cualitativa, así como la calidad final del vino. Esto debido a que dicha calidad esta, en parte, determinada por el grado de polimerización de sus unidades y no a su concentración, siendo los polímeros de diez unidades los más apreciados debido a que aportan mayor astringencia, mientras que los de cuatro unidades son los menos deseados por conferir al vino mayores notas de amargor (Peña, 2006).

La estructura de los antocianos corresponde a heterociclos formados por la combinación de una aglicona y un azúcar. En cultivares de *Vitis vinifera* la glucosa se fija en la posición 3 de anillo, confiriendo estabilidad a la molécula. La aglicona presenta distintos patrones de hidroxilación y metilación en las posiciones 3' y 5' del anillo B, originando según la combinación las antocianinas: peonidina (Pn), cianidina (Cy), malvidina (Mv), petunidina (Pt) y delfinidina (Df). A su vez, las antocianinas nombradas se pueden unir a glucosa formando moléculas glucosidadas, a glucosa y ácido acético, conocidas como acetiladas y finalmente unirse a glucosa y ácido cumarólico denominadas cumariladas.

En Carménère, los contenidos individuales de antocianos, con excepción de algunos casos, disminuyeron considerablemente al estar expuestos a mayor luminosidad producto de las altas temperaturas asociados a tratamientos de mayor exposición (Cuadros 3 y 5). Estos resultados son consistentes con estudios realizados por Mori *et al.* (2007) en Cabernet Sauvignon, donde los compuestos antociánicos fueron marcados con  $^{13}\text{C}$  y sometidos a

tratamientos de temperatura, mostrando una abrupta disminución en los compuestos sometidos a 35°C. Según Spayd *et al.* (2002), la concentración individual de pigmentos disminuyó en pieles expuestas a altas temperaturas o bajo sombra. Al realizar un segundo ensayo, donde aisló el factor temperatura, se evidenció que el bloqueo de la radiación UV no afectó mayormente su concentración, por lo que serían altamente dependientes de la temperatura.

Downey *et al.* (2004) reportaron que el sombreado en Syrah provocó una disminución de los antocianos con tres oxígenos sustituyentes del anillo B (malvidina, petunidina y delphinidina glucósido) y un aumento en los compuestos con sólo dos sustituciones de oxígeno (peonina y cianidina glucósido), lo que implicaría que la sombra estaría reduciendo la actividad de la enzima flavonoide-3',5'-hidroxilasa o de la expresión del gen que codifica para esa enzima, o bien podría provocar un aumento en la actividad de flavonoide-3' hidroxilasa o una sobre regulación de la expresión del gen F3H. También se observó un aumento de los compuestos cumaril glucosilados en condiciones más cálidas, (Spayd *et al.*, 2002; Downey *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2007), lo que sugirió que antocianos cumarilados son más estables que los glucosilados y acetil glucosilados. Por lo anterior, es de esperar que en condiciones de fruta expuesta en climas cálidos, se presente una mayor proporción de malvidina, petunidina y delphinidina cumariladas, mientras que en ambientes más fríos y sombreados exista más peonina y cianidina glucosiladas y acetilglucosiladas (Downey *et al.*, 2005).

En los datos obtenidos de este estudio se observó a los 30 ddp, que los compuestos antociánicos individuales se acumularon mayoritariamente en bayas sombreadas sin discriminar entre tipos de compuestos (Cuadro 3). Sin embargo, al llegar a cosecha, los distintos compuestos igualan sus concentraciones entre tratamientos (Cuadro 5), apreciándose una mayor concentración sólo en el caso de petunidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido y Delphinidina-3-acetilglucósido, en condiciones de baja luz. Esto se opone a lo descrito por Downey *et al.* (2004), quienes afirmaron que a menor luminosidad, los compuestos más concentrados debían ser peonina y cianidina. Aún no ha sido

dilucidada la contribución efectiva de cada uno de esos compuestos en el color final del vino, sin embargo, diversas investigaciones sugieren que se relacionaría con la extractibilidad de ellos, ya que compuestos glucosilados y acetilglucosilados serían más fácilmente extraídos que los cumarilglucosilados.

Antocianos, proantocianidinas y flavonoles comparten parte importante de la ruta de síntesis, denominada ruta fenilpropanoide. En ella se aprecian varios genes que codifican enzimas involucradas en dicha síntesis, de los cuales fenilalanina amonioliasa (*PAL*), charcona sintetasa (*CHS*) y dihidroxiflavonol reductasa (*DFR*) fueron evaluados en este trabajo. La enzima *PAL* cataliza el último paso de la ruta del ácido siquímico, transformando fenilalanina en ácido cinámico y su transcrito alcanza la máxima expresión en floración (Boss *et al.*, 1996). *CHS* es la enzima que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de los compuestos flavonoides, condensando cumaroil CoA originando chalcona. Por esto su expresión a nivel de transcrito es considerada como un gen temprano de la ruta, siendo encontrado en estados iniciales del desarrollo de las bayas. Se ha informado la existencia de tres isoformas, pero sólo dos son de importancia en la vid (Goto-Yamamoto *et al.*, 2002). Con respecto a *DFR*, enzima situada en el punto donde la ruta se bifurca entre la formación de antocianidinas y taninos, cataliza la reducción de dihidroflavonol a leucoantocianidinas (Gollop *et al.*, 2002), sustrato necesario para la formación de antocianos y proantocianidinas. Este gen presenta dos fases de expresión durante el desarrollo de la baya (Boss *et al.*, 1996). La regulación de la síntesis de los compuestos flavonoides y su acumulación es compleja, involucrando varios genes reguladores que median diferentes pasos de la ruta. Esos genes pertenecen a la familia de los factores de transcripción *myc* y *myb*, los cuales ejercen su control en forma diferencial dependiendo de las especies (Boss *et al.*, 1996, Hasegawa *et al.*, 2001).

Como se observa en las Figuras 8A, B y C, la expresión del transcrito *PAL* no presentó cambios entre los diferentes tratamientos y no se evidenció un cambio durante el desarrollo de la temporada. En el cultivar Syrah, se detectó que la expresión del gen *PAL* posee dos máximos: floración y otra cercana al cambio de color del fruto (Robinson y Davies, 2000).

A diferencia de lo observado en Carménère, donde los tratamientos de luz no generaron una respuesta en la expresión de *PAL*, Roubelakis-Angelakis y Kliewer (1986) observaron que la síntesis de antocianos y la actividad de *PAL* se veían favorecida por la luz. Utilizando bayas del cultivar Cardinal. Por otra parte, Roubelakis-Angelakis y Kliewer (1986), mostraron una disminución en la actividad de *PAL* en bayas sometidas a oscuridad y un aumento de la actividad de la enzima en presencia de luz, así como también una mayor acumulación de antocianos en bayas expuestas. Estudios realizados en *Stellaria longipes* indicaron que la luz es un prerequisite para la inducción de *PAL* y que a su vez este sería requisito de la aparición de antocianos (Alokan *et al.*, 2002).

Según Mori *et al.* (2005) y Hasegawa *et al.* (2001), la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de compuestos flavonoides está fuertemente afectada por la temperatura, donde bajas temperaturas generan un aumento y altas temperaturas una disminución en el nivel de transcritos. Yamane *et al.* (2006) reportaron que altas temperaturas reducen los niveles endógenos de ABA, lo cual provoca la disminución de la expresión de *VvmybA1*, que es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes de las enzimas que participan en la biosíntesis de antocianos. Del mismo modo que Yamame *et al.* (2006), Jeong *et al.* (2004) observaron, que tratamientos de ABA favorecieron la acumulación de *VvmybA1*, mientras que el sombreado la suprimió (Alokan *et al.*, 2002).

A pesar de lo descrito en estudios anteriores, los resultados obtenidos por Mori *et al.* (2007) en una reciente investigación en Cabernet Sauvignon mostraron que el nivel de transcritos de genes no presentó cambios en respuesta a las altas temperaturas. Mori *et al.* (2007), observó que el máximo nivel de expresión de los transcritos fue alcanzado en la segunda semana después de pinta, sin embargo no se apreció diferencias entre los tratamientos para los genes de las enzimas *CHS*, *UFGT* y *VvmybA1*, con excepción de *F3H* y *DFR*. Similares resultados se obtuvieron en el presente estudio en Carménère (Figura 8H), donde *DFR* presentó una abundancia relativa mayor en el tratamiento de menor luminosidad, y por lo tanto de menor temperatura, mientras que *PAL* y *CHS* no mostraron diferencias significativas (Figuras 8 C y F). Sin embargo, existe evidencia de que la región promotora

del gen *DFR* en *Vitis vinifera* cv. Gamy red posee elementos en *cis*, que estarían regulados por luz (Gollop *et al.*, 2002), específicamente por factores de transcripción correspondiente a la familia MYB. Estos resultados contrastan con lo observado en las extracciones de RNA realizadas en Carménère, ya que bayas expuestas a mayor luminosidad presentaron una menor expresión del transcrito *DFR*, por lo que se puede concluir, para este gen, que las altas temperaturas alcanzadas por las bayas suprimieron la expresión de *DFR*, tal vez por la influencia de las temperaturas sobre la concentración de ABA en las bayas.

La abundancia relativa del transcrito *CHS*, en Carménère, no respondió a los tratamientos de luz (Figuras 8D, E y F), ni a las diferencias de temperaturas que se originaron de estos, lo que concuerda con Mori (2007), quien no observó cambios en la acumulación del transcrito de *CHS* para distintas temperaturas. Por otro lado, existen antecedentes de que el sombreamiento afecta la acumulación de mRNA de los genes que codifican para enzimas involucradas en la ruta fenilpropanoide, lo que es confirmado por Jeong *et al.* (2004), quienes evaluaron el comportamiento de las tres isoformas de *CHS* frente a tratamientos de sombreamiento en Cabernet Sauvignon, probando que la totalidad de las isoformas respondieron negativamente a los tratamientos de oscuridad.

Existen antecedentes en *Arabidopsis thaliana* y *Sinapis alba* que la acumulación de transcritos de *CHS*, inducida por luz, sería un proceso complejo que involucraría a fitocromos y fotorreceptores de luz UV-B y UV-A (Kaiser *et al.*, 1995). Según Kaiser *et al.* (1995), la región promotora del gen *CHS* poseería elementos (Unit 1) que responderían a la luz vía diferentes fotorreceptores en diversas especies transgénicas. A su vez Cominelli *et al.* (2007) observó en *Arabidopsis thaliana* que la luz no sólo afecta a genes estructurales como *CHS* y *DFR*, sino que también a factores de transcripción de la expresión. Cominelli *et al.* (2007) observaron que los transcritos de *CHS* y *DFR* no fueron detectables en el control oscuro, mientras que al aumentar las horas de exposición a la luz, la cantidad de los transcritos aumentaron, del mismo modo sugiere la inducción por luz de los factores de transcripción de la familia MYB (*PAP1* y *PAP2*).

## CONCLUSIONES

El manejo de follaje alteró el microclima del racimo impactando significativamente en la radiación incidente y la temperatura de pulpa y racimo. El deshoje a nivel de la zona frutal al lado norte de la espaldera generó altos índices de radiación interceptados por la fruta, así como también elevadas temperaturas, mientras que la fruta ubicada al lado sur de la espaldera sin deshoje interceptó radiaciones menores, provocando temperaturas más bajas.

Aún cuando los tratamientos de luz causaron un efecto significativo en el microclima del racimo, no se tradujo en diferencias, tanto a nivel de metabolitos primarios, sólidos solubles, acidez y pH, como de metabolitos secundarios, fenoles totales, taninos y antocianos. Al evaluar el perfil antociánico se observó que intensidades luminosas menores generaron un aumento de los compuestos glucosilados y acetilglucosilados, los que hacen más favorable la extractabilidad de los antocianos en el proceso de vinificación.

La expresión de los genes evaluados en el presente estudio no se vió afectada por los tratamientos de luz, a excepción de DFR, el cual presentó una mayor expresión en el tratamiento de menor luminosidad. Por lo anterior, se puede concluir que en regiones vitivinícolas cálidas se deben desarrollar sistemas para atenuar las altas temperaturas sin recurrir a un sombreado total, ya que altas temperaturas tendrían un papel detrimental en la calidad enológica de las bayas de la variedad Carménère.

## LITERATURA CITADA

Alokam, S., Li y., Li W., Chinnappa, C.C. and Reid D.M. (2002) Photoregulation of Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and Chalcone synthase (CHS) in the accumulation of anthocyanin in alpine and prairie ecotypes of *Stellaria longipes* under varied R/RF.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. New York 3<sup>rd</sup> e.d.

Bergqvist, J., Dokoozlian, N. and Ebisuda, N. 2001. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. American Journal of Enology and Viticulture 52: 1-7.

Berli, F., D'Angelo, J., Cavagnaro, B., Bottini, R., Wuilloud, R. and Silva, M. F. 2008. Phenolic composition in Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) Ripened with different solar UV-B Radiation Levels by Capillary Zone Electrophoresis. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (3): 627-629.

Boss, P.K., Davies, C. and Robinson, S.P. 1996. Analysis of expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. Plant Physiology. 111: 1059-1066.

Cominelli, E., Gusmaroli, G., Allegra, D., Galbiati, M., Wade, H., Jenkins, G.I. and Tonelli, C. 2007. Expresión análisis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Physiology, 10: 1016.

Coombe, G.B. 1987. Influence of temperature on composition and quality of grape. Acta Horticulturae, 206: 23-35.

Coombe, B.G. 1989. The grape berry as sink. *Acta Horticulturae* 239: 140-158.

Crippen, D.D., and J.C. Morrison. 1998. The effects of the sun exposure on the phenolic content of Cabernet Sauvignon berries during development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37:243-247.

Curry EA. 1997. Temperatures for optimum anthocyanin accumulation in apple tissue. *J Horticultural Science*, 72, 723-729.

Del Valle, G., González A. and Báez R. 2005. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera*) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28 (4): 359-368.

Downey, M.O., Harvey, J.S. and Robinson, S.P. 2003. Synthesis of Flavonols and expression of flavonol synthase genes in developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera*). *Australian Journal Grape Wine Res.* 9:110-121.

Downey, M.O., Harvey J.S. and Robinson S.P. 2004. The effect of bunch of shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal Grape Wine Res.* 10:55-73.

Downey, M.O., Dokoozlian, N.K. and Krstic M.P. 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 3-14.

Deluc, L., Barrieu, F., Marchive C., Lauvergeat V., Decendit, A., Richard T., Carde J-P., Mérillon, J-M. and Hamni, S. 2006. Characterization of a grape R2R3-MYB Transcription Factor That Regulates the Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology*, 140: 499-511.

Fujita, A., Soma, N., Goto-Yamamoto, N., Mizuno, A., Kiso, K. and Hashizume, K. 2007. Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, 76 (2): 112-119.

García-Barceló, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Ediciones FAB. Barcelona, España. 1713 p.

Gollop R., Even S., Colova-Tsolova, V. and Perl, A. 2002. Expression of the grape dihydroflavonol reductase gene and analysis of its promoter region. *Journal of Experimental Botany*. 53: 1397-1409.

Goto-Yamamoto, N., Wan, G.H., Masaki, K. and Kobayashi. 2002. Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*). *Plant Science*, 162: 867- 862.

Hasegawa, H., Fukasawa-Akada, T., Okuno, T., Niizeki M. and Suzuki, M. (2001). Anthocyanin accumulation and related gene expression in Japanese parsley (*Oenanthe stolonifera*, DC.) induced by low temperature. *Journal of Plant Physiology*. 158:71-78.

Hiratsuka, S., Onodera, H., Kawai, Y., Kubo, T., Itoh H. and Wada, R. 2001. Enzyme activity changes during anthocyanin synthesis in “Olympia” grape berries. *Scientia Horticulturae* 90: 255-264.

Jeong, S.T., Goto-Yamamoto N., Kobashi, S. and Esaka, M. 2004. Effect of plant hormones and shading and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167: 247-242

Kaiser, T., Emmler, K., Kresth, T., Weisshaar B., Schäfer, E. and Batschauer, A., 1995, Promoter elements of the mustard *CHS1* gene are sufficient for light regulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 28: 219-229.

Kliewer, W.M. 1977. Influence of temperature, solar radiation, and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28: 96-103.

Kobayashi S., Ishimaru M., Hiraoka K. and Honda C. 2002. *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labrusca*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta*, 215, 924-933.

Mabrouk, H. and Sinoquet, H. 1998. Indices de light microclimate and canopy structure of grapevines determined by 3D digitising and image analysis, and their relationship to grape quality. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 2-13.

Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M. and Hashizume, K. 2007. Loss of anthocyanins in red wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 58: 1395-1945.

Peña, A. 2006. En la calidad de uvas y vino los taninos y su importancia. *Revista Vendimia*, Abril 2006: 18-20.

Ribéreau- Gayon, P., and Glories Y. 1986. Phenolics in grapes and wines. In *Proceeding of the 6<sup>th</sup> Australian Wine Industry Technical Conference*. T Lee (Ed), 247-246.

Robinson S.P. and Davies C. 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6; 175-188.

Roubelakis-Angelakis K.A. and Kliewer W.M., 1986. Effects of Exogenous Factors on Phenylalanine Amonia-Lyase and Accumulation of Anthocyanins and Total Phenolics in Grapes Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37 (4): 275-280.

Salazar, D. y Melgarejo, P. 2005. Viticultura técnicas de cultivo de la vid, calidad de la uva y atributos de los vinos. Ediciones Mundi-prensa, Madrid, España. 247 p.

Smart, R. E. 1992. Canopy Management. 85-103 In: B.G. Coombe and P.R. Dry Viticulture, volume 2 Practices. Edited Winetitles. Adelaide, Australia. 376.

Sugui, J.; Wood, K; Yang, Z; Bonham, C., and Nicholson, R. 1999. Matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry analysis of grape anthocyanins. Am. J. Viti. 50(2): 199-203.

Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L. and Ferguson, J.C. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. American Journal of Enology and Viticulture, 53: 171-182.

Venencie, C., Uveria, M. et Etguiet, S. 1997. Maturité polyphénolique du raisin mûri en place d'une méthode d'analyse de routine. Revue Française d'oenologie, Nov., N° 167: 36-41.

Yamane, T., Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Koshita, Y. and Kobayashi, S. 2006. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. American Journal of Enology and Viticulture, 57: 54-59.

## ANEXOS



**Figura 1.** Tratamientos de luz. (A) Tratamientos de baja luz correspondiente a lado sur de la espaldera sin deshoje. (B) Tratamientos de luz media, lado norte de la espaldera sin deshoje. (C) Tratamientos de alta luz, lado norte de la espaldera con deshoje de la zona frutal.

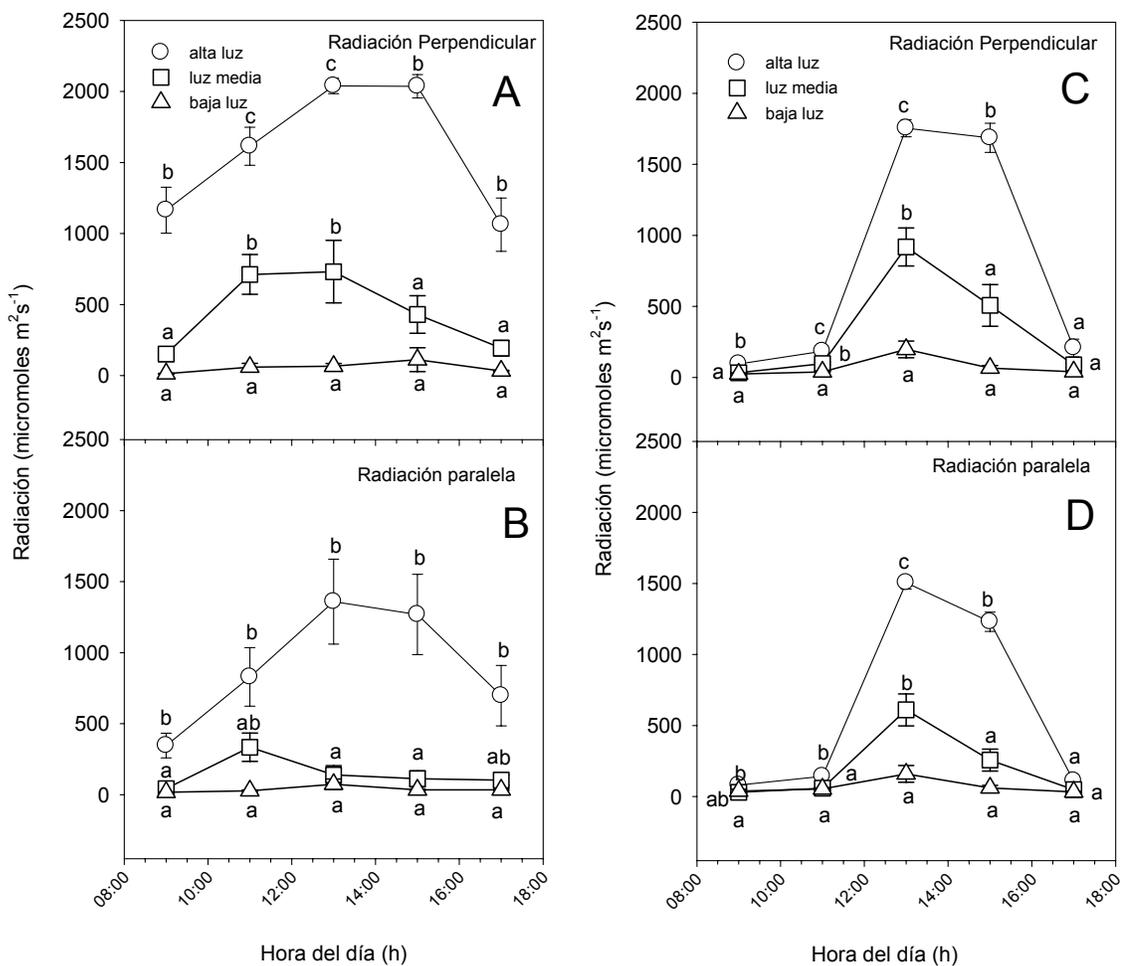
**Cuadro 1.** Tratamientos de luz

Tratamientos	Nivel de luz
T1	Sin deshoje, exposición sur
T2	Sin deshoje, exposición norte
T3	Con deshoje, exposición norte

**Cuadro 2.** Partidores para el RT-PCR y temperaturas de alineación

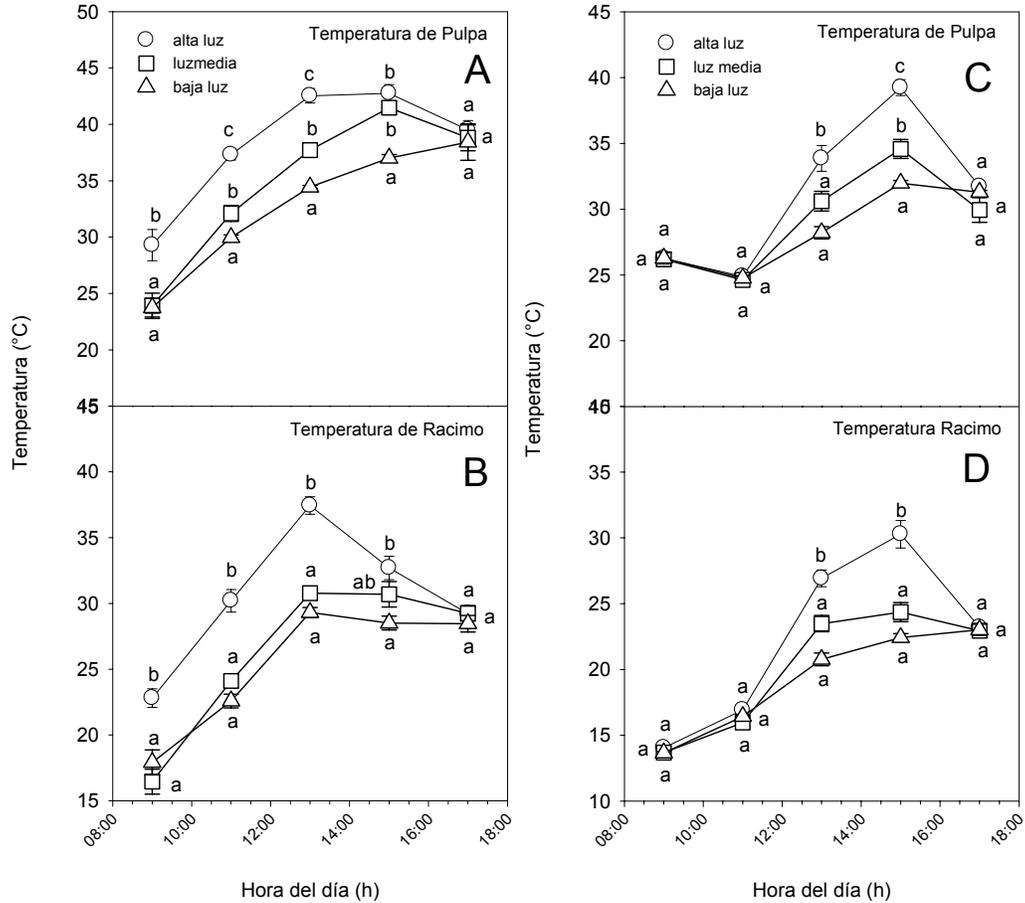
Nombre del Gen	Secuencia sentido (S) y antisentido (AS)	T° de alineamiento
<b>PAL</b>	<b>S 5' CCGAGCATCAACTAAATCCA 3'</b>	<b>58°C</b>
	<b>AS 5' GCAGAGTGCCACTAGGTAT 3'</b>	
<b>CHS</b>	<b>S 5' AGCCAGTGAAGCAGGTAG 3'</b>	<b>56°C</b>
	<b>AS 5' TTGACGGAGGGTTTGAGG 3'</b>	
<b>DFR</b>	<b>S 5' GCCTCATAACTGCTCTTTC 3'</b>	<b>58°C</b>
	<b>AS 5' TTCTTCTAGGTCTTGCCATC 3'</b>	

<b>Ubiquitina</b>	<b>S</b> 5' <b>TGGTATTATTGAGCCATCCTT</b> 3'	<b>58°C</b>
	<b>AS</b> 5' <b>AACCTCCAATCCAGTTATCTAC</b> 3'	

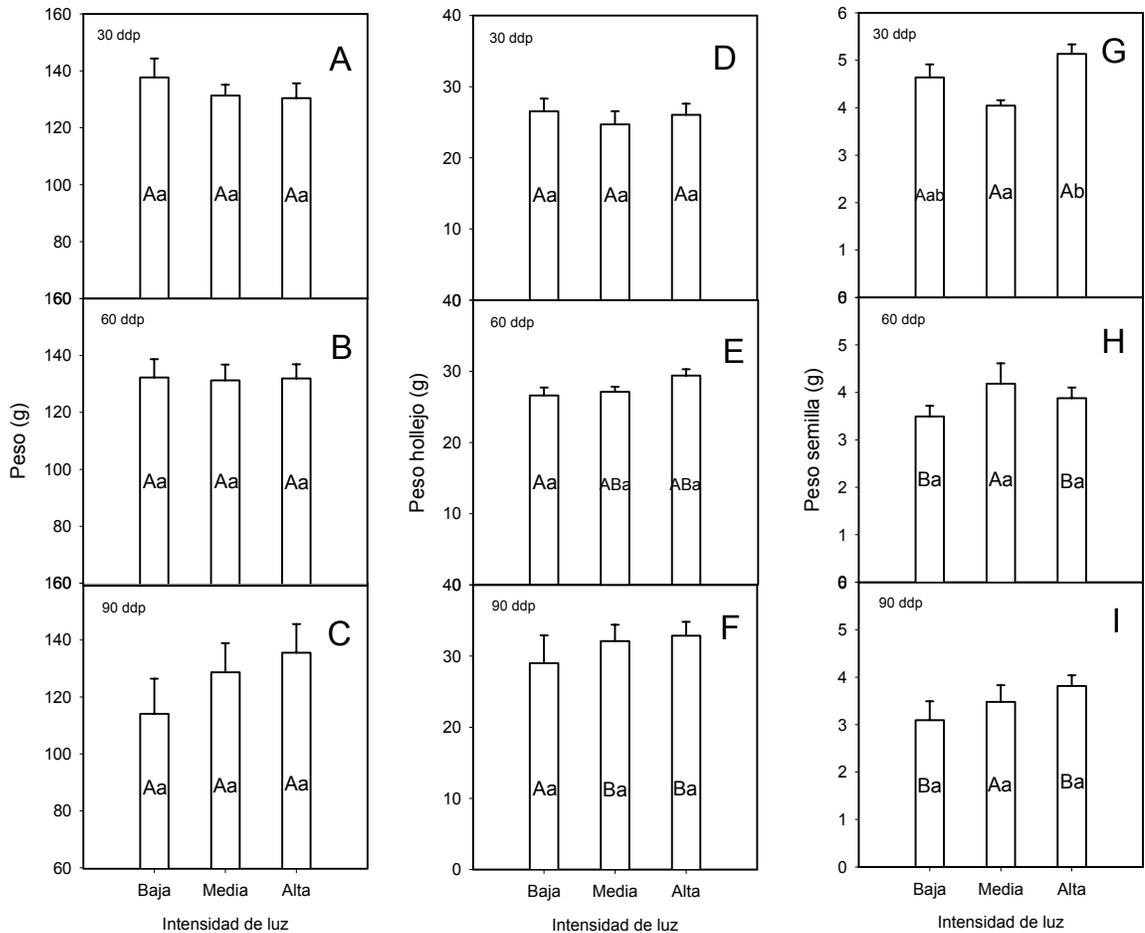


**Figura 2.** Evolución de la radiación incidente en los racimos. Círculo representa tratamientos de alta luz, cuadrado luz media y triángulo tratamientos de baja luz. (A) Radiación medida perpendicular al sol, el 20 de febrero. (B) Radiación medida paralela al racimo, el 20 de febrero. (C) Radiación medida perpendicular al sol en condiciones de nubosidad hasta el mediodía, el 20 de marzo (D) Radiación medida paralela al racimo en condiciones de nubosidad hasta el mediodía, el 20 de marzo. Letras distintas implica diferencias significativas entre tratamientos a una misma hora, según prueba de

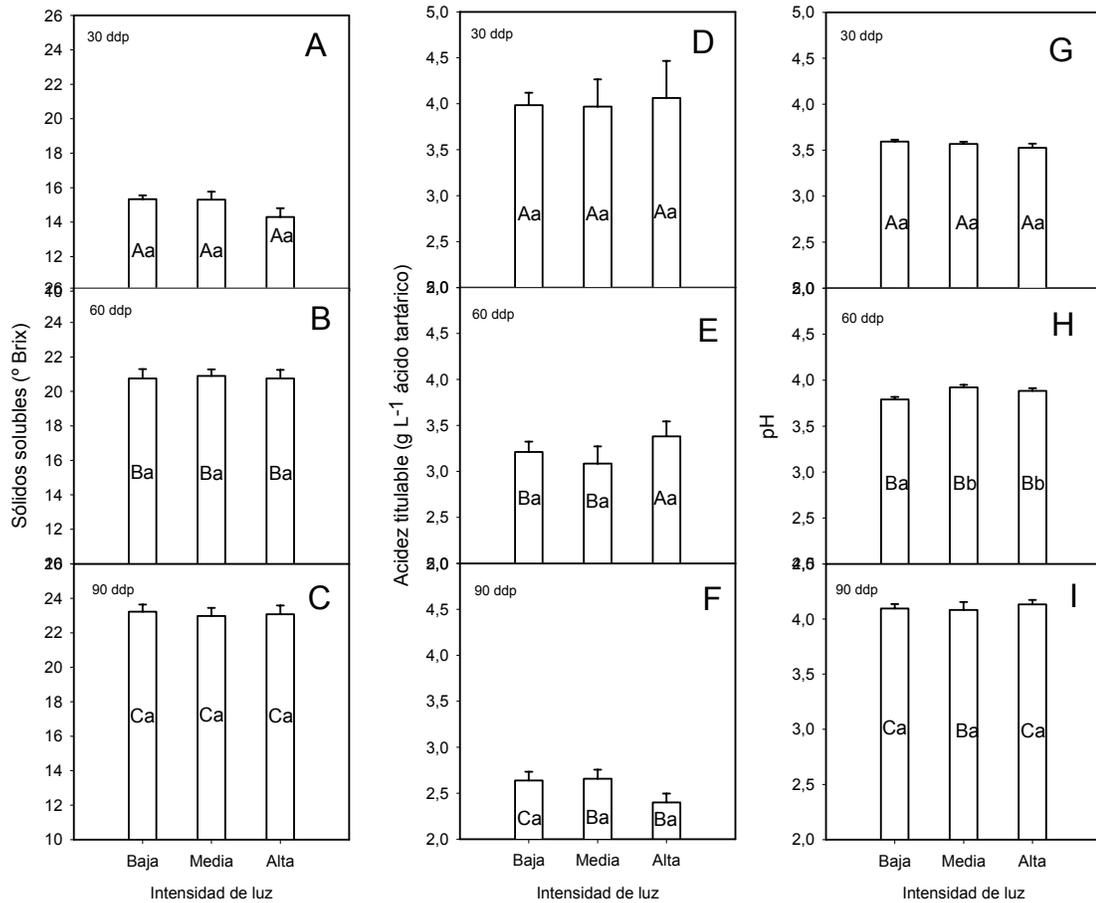
comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Las barras corresponden al error estándar de los datos.



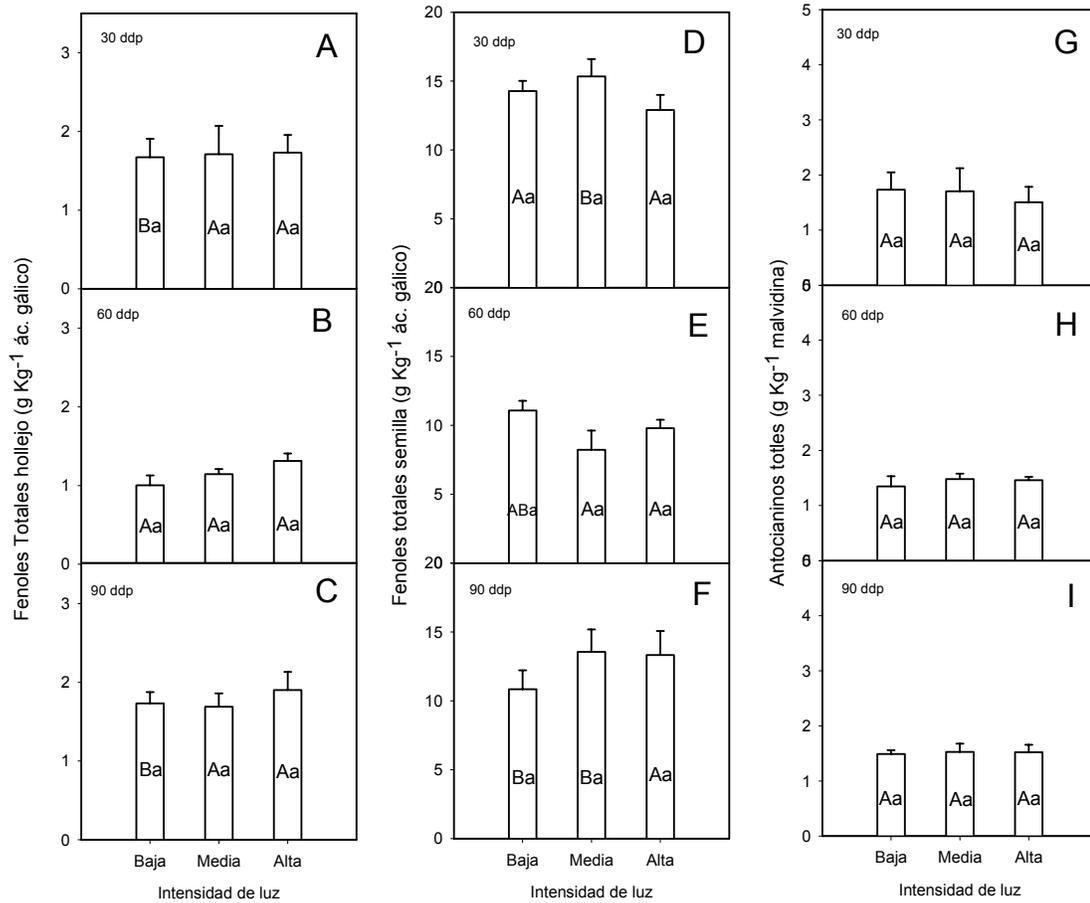
**Figura 3.** Evolución de la temperatura en pulpa de bayas y superficie de racimos. Círculo representa tratamientos de alta luz, cuadrado luz media y triángulo tratamientos de baja luz. (A) Temperatura de pulpa determinada el 20 de febrero. (B) Temperatura de racimo determinada el 20 de febrero. (C) Temperatura de pulpa medida en condiciones de nubosidad hasta el mediodía, el 20 de marzo (D) Temperatura de pulpa determinada en condiciones de nubosidad hasta el mediodía, el 20 de marzo. Letras distintas implica diferencias significativas entre tratamientos a una misma hora, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Las barras corresponden al error estándar de los datos.



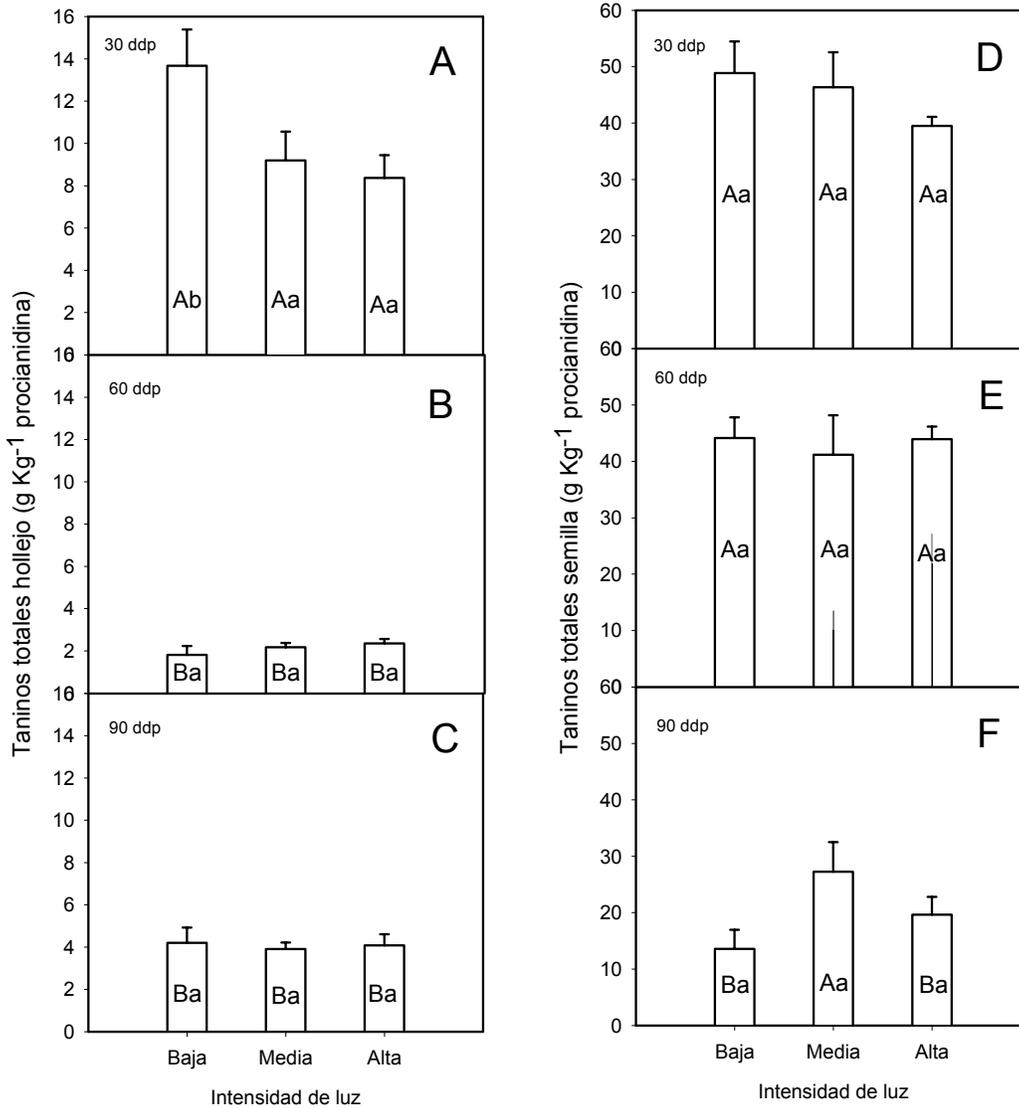
**Figura 4.** Efecto de la exposición de los racimos sobre el peso total, peso de hollejo y el peso de semilla de 100 bayas para 30 ddp (A, D y G), 60 ddp (B, E y H) y 90 ddp (C, F e I), respectivamente. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo tratamiento y letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma fecha, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Las barras corresponden al error estándar de los datos.



**Figura 5.** Efecto de los tratamientos de luz sobre sólidos solubles, acidez titulable y pH en 30 ddp (A, D y G), 60 ddp (B, E y H) y 90 ddp (C, F e I), respectivamente. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo tratamiento y letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma fecha, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Las barras corresponden al error estándar de los datos.



**Figura 6.** Efecto de los tratamientos de luz sobre los fenoles totales en hollejo, fenoles totales en semilla y antocianos totales en 30 ddp (A, D y G), 60 ddp (B, E y H) y 90 ddp (C, F e I), respectivamente. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo tratamiento y letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma fecha, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Las barras corresponden al error estándar de los datos.



**Figura 7.** Efecto de los tratamientos de luz sobre los taninos totales en hollejo y semilla en 30 ddp (A, D y G), 60 ddp (B, E y H) y 90 ddp (C, F e I), respectivamente. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo tratamiento y letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma fecha, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Las barras corresponden al error estándar de los datos.

**Cuadro 3.** Efecto de los tratamientos de luz sobre los contenidos antociánicos individuales a los 30ddp. Letras distintas implican diferencias significativas entre tratamientos, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ).

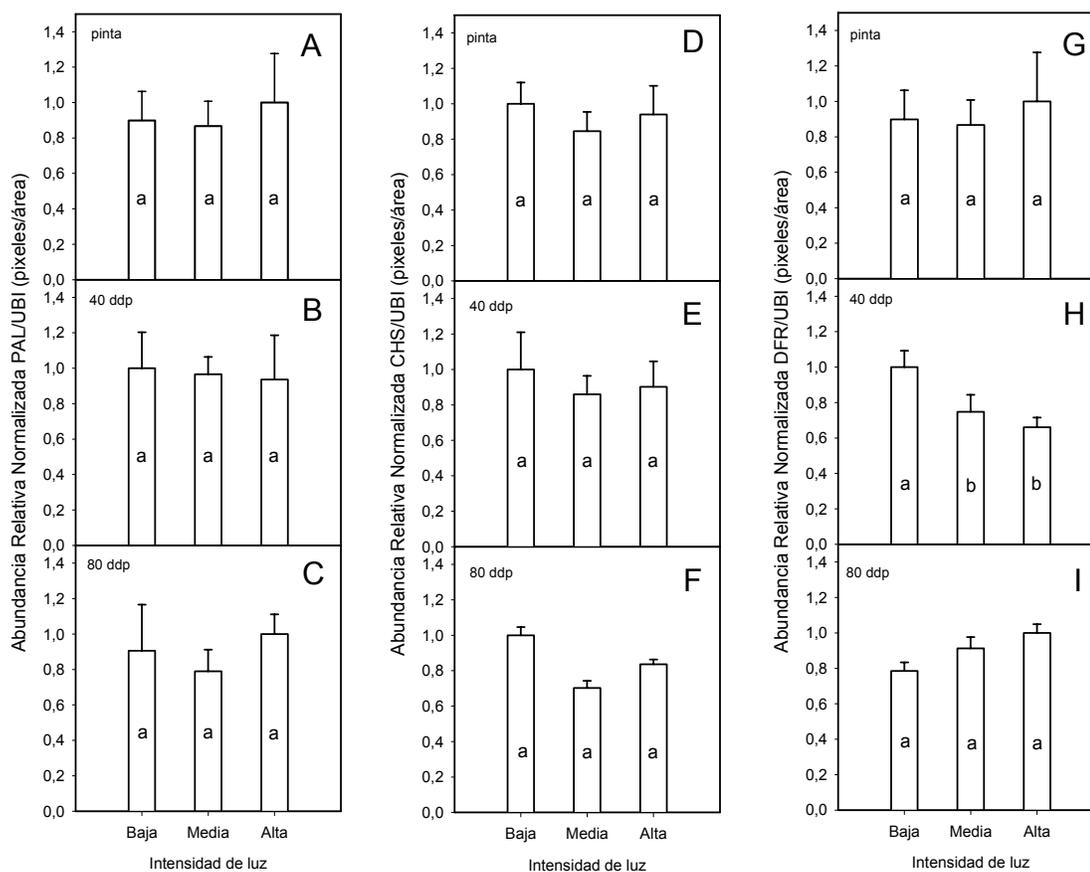
Compuesto	Baja	media	Alta
Delfinidina-3-glucósido	145,18 a $\pm$ 12,72	102,92 b $\pm$ 23,92	103,74 b $\pm$ 19,82
Cianidina-3-glucósido	20,91 a $\pm$ 2,24	11,48 b $\pm$ 4,17	16,65 ab $\pm$ 9,08
Petunidina-3-glucósido	152,06 a $\pm$ 31,18	100,84 b $\pm$ 22,9	101,26 b $\pm$ 19,01
Peonina-3-glucósido	77,80 a $\pm$ 8,4	63,78 b $\pm$ 1,40	81,21 a $\pm$ 8,1
Malvidina-3-glucósido	862,21 a $\pm$ 129,50	671,62 a $\pm$ 255,56	670,26 a $\pm$ 108,86
Delfinidina-3-acetil-glucósido	37,09 a $\pm$ 2,37	27,07 b $\pm$ 3,64	27,59 b $\pm$ 4,91
Cianidina-3-acetil-glucósido	2,12 a $\pm$ 2,4	3,04 a $\pm$ 3,63	1,25 a $\pm$ 1,37
Petunidina-3-acetil-glucósido	38,94 a $\pm$ 2,78	25,03 b $\pm$ 5,58	29,87 b $\pm$ 7,14
Peonina-3-acetil-glucósido	39,62 a $\pm$ 8,48	25,24 b $\pm$ 5,38	27,82 b $\pm$ 5,46
Malvidina-3-acetil-glucósido	241,47 a $\pm$ 98,61	184,32 a $\pm$ 30,41	165,08 a $\pm$ 54,20
Delfinidina-3-p-cumaril-glucósido	0,72 a $\pm$ 1,78	0	0,55 a $\pm$ 1,36
Cianidina-3-p-cumaril-glucósido	27,32 a $\pm$ 11,6	8,83 b $\pm$ 1,67	10,59 b $\pm$ 2,65
Petunidina-3-p-cumaril-glucósido	24,36 a $\pm$ 7,24	12,33 b $\pm$ 0,92	15,95 ab $\pm$ 6,51
Peonina-3-p-cumaril-glucósido	22,37 a $\pm$ 6,74	8,98 b $\pm$ 0,37	11,18 b $\pm$ 1,44
Malvidina-3-p-cumaril-glucósido	164,27 a $\pm$ 74,92	62,04 b $\pm$ 6,64	80,47 b $\pm$ 10,05

**Cuadro 4.** Efecto de los tratamientos de luz sobre los contenidos antociánicos individuales a los 60ddp. Letras distintas implican diferencias significativas entre tratamientos, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ).

Compuesto	baja	media	Alta
Delfinidina-3-glucósido	293,48 a $\pm$ 50,65	268,32 a $\pm$ 22,57	298,70 a $\pm$ 43,31
Cianidina-3-glucósido	34,68 a $\pm$ 9,39	41,48 a $\pm$ 5,67	41,93 a $\pm$ 8,42
Petunidina-3-glucósido	245,47 a $\pm$ 63,71	248,61 a $\pm$ 20,84	299,00 a $\pm$ 40,95
Peonina-3-glucósido	127,73 a $\pm$ 38,43	153,17 ab $\pm$ 10,22	162,73 b $\pm$ 20,91
Malvidina-3-glucósido	1841,13 ab $\pm$ 396,70	1735,92 a $\pm$ 95,51	2161,37 b $\pm$ 250,21
Delfinidina-3-acetil-glucósido	47,60 a $\pm$ 11,71	51,63 a $\pm$ 4,14	56,19 a $\pm$ 9,31
Cianidina-3-acetil-glucósido	5,42 a $\pm$ 8,26	11,50 a $\pm$ 7,26	11,73 a $\pm$ 8,56
Petunidina-3-acetil-glucósido	43,05 a $\pm$ 20,29	59,67 ab $\pm$ 8,51	69,19 b $\pm$ 9,10
Peonina-3-acetil-glucósido	22,92 a $\pm$ 12,48	22,41 a $\pm$ 1,99	23,25 a $\pm$ 9,96
Malvidina-3-acetil-glucósido	455,60 a $\pm$ 104,18	446,29 a $\pm$ 37,94	480,78 a $\pm$ 43,85
Delfinidina-3-p-cumaril-glucósido	2,26 a $\pm$ 2	2,55 a $\pm$ 1,13	3,54 a $\pm$ 1,57
Cianidina-3-p-cumaril-glucósido	11,20 a $\pm$ 6,27	21,89 b $\pm$ 3,07	16,54 ab $\pm$ 7,79
Petunidina-3-p-cumaril-glucósido	8,31 a $\pm$ 5,03	11,83 a $\pm$ 1,89	13,30 a $\pm$ 5,47
Peonina-3-p-cumaril-glucósido	12,51 a $\pm$ 5,98	12,04 a $\pm$ 2,31	12,57 a $\pm$ 5,48
Malvidina-3-p-cumaril-glucósido	124,42 a $\pm$ 56,69	174,14 a $\pm$ 34,52	217,17 a $\pm$ 43,74

**Cuadro 5.** Efecto de los tratamientos de luz sobre los contenidos antociánicos individuales a los 90ddp. Letras distintas implican diferencias significativas entre tratamientos, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ).

Compuesto	baja	media	Alta
Delfinidina-3-glucósido	254,13 a $\pm$ 111,30	199,14 a $\pm$ 85,09	183,57 a $\pm$ 61,07
Cianidina-3-glucósido	30,57 a $\pm$ 13,15	28,58 a $\pm$ 11,24	30,11 a $\pm$ 18,32
Petunidina-3-glucósido	476,23 a $\pm$ 197,16	252,54 b $\pm$ 94,86	213,48 b $\pm$ 59,25
Peonina-3-glucósido	156,77 a $\pm$ 42,20	182,26 a $\pm$ 48,15	127,33 a $\pm$ 34,38
Malvidina-3-glucósido	2546,33 a $\pm$ 377,24	2018,36 b $\pm$ 124,16	1850,78 b $\pm$ 134,50
Delfinidina-3-acetil-glucósido	44,83 a $\pm$ 16,52	31,47 ab $\pm$ 8,63	24,83 b $\pm$ 7,92
Cianidina-3-acetil-glucósido	11,26 a $\pm$ 4,76	9,56 a $\pm$ 3,06	8,85 a $\pm$ 2,55
Petunidina-3-acetil-glucósido	61,94 a $\pm$ 21,18	40,98 a $\pm$ 15,26	44,20 a $\pm$ 16,62
Peonina-3-acetil-glucósido	21,65 a $\pm$ 5,73	17,12 a $\pm$ 7,31	21,80 a $\pm$ 12,10
Malvidina-3-acetil-glucósido	482,03 a $\pm$ 151,59	463,02 a $\pm$ 117,95	487,19 a $\pm$ 102,00
Delfinidina-3-p-cumaril-glucósido	61,37 a $\pm$ 22	49,44 a $\pm$ 6,22	48,99 a $\pm$ 10,18
Cianidina-3-p-cumaril-glucósido	11,79 a $\pm$ 5,67	8,44 a $\pm$ 2,82	7,98 a $\pm$ 1,43
Petunidina-3-p-cumaril-glucósido	9,97 a $\pm$ 3,42	8,66 a $\pm$ 3,15	7,85 a $\pm$ 2,86
Peonina-3-p-cumaril-glucósido	11,68 a $\pm$ 5,48	8,44 a $\pm$ 2,62	7,41 a $\pm$ 1,61
Malvidina-3-p-cumaril-glucósido	190,66 a $\pm$ 61,52	158,07 a $\pm$ 30,89	136,34 a $\pm$ 8,94



**Figura 8.** Abundancia relativa normalizada de los transcritos *PAL*, *CHS* y *DFR* en pinta (A, D y G), 40 ddp (B, E y H) y 80 ddp (C, F e I), respectivamente. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre fechas para un mismo tratamiento y letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma fecha, según prueba de comparación múltiple de Tuckey ( $p \leq 0,05$ ). Las barras corresponden al error estándar de los datos.