

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EFFECTO DE UN DESHOJE TARDÍO EN LA COMPOSICIÓN
FENÓLICA DE SEMILLAS DE BAYAS DEL CULTIVAR
CARMÉNÈRE**

Tania Montserrat Durán Beya

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EFFECTO DE UN DESHOJE TARDÍO EN LA COMPOSICIÓN
FENÓLICA DE SEMILLAS DE BAYAS DEL CULTIVAR
CARMÉNÈRE**

**EFFECT OF A LATE DEFOLIATION ON THE PHENOLIC
COMPOSITION OF CARMÉNÈRE CULTIVAR BERRY SEEDS**

Tania Montserrat Durán Beya

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO DE UN DESHOJE TARDÍO EN LA COMPOSICIÓN
FENÓLICA DE SEMILLAS DE BAYAS DEL CULTIVAR
CARMÉNÈRE**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniera Agrónoma

Tania Montserrat Durán Beya

PROFESORES GUÍAS	Calificaciones
Sr. Álvaro Peña Neira Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.	6,7
Sr. Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,5
 PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Hugo Nuñez Kalasic Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,5
Sr. Luis Luchsinger Lagos Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	6,7

Santiago, Chile

2010

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que me ayudaron e hicieron posible la realización de este trabajo:

A mi profesor guía Elías Obreque por su apoyo, dedicación, paciencia y orientación durante todo el desarrollo de esta investigación.

A mi profesor guía Álvaro Peña por sus críticas constructivas, su sabiduría y por sobre todo, su buena voluntad.

A mi profesor evaluador Hugo Núñez por su cooperación y buena disposición.

A mi familia y amigos por su paciencia, cariño y apoyo en este largo camino.

A todos muchas gracias...

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Materiales	6
Lugar del estudio	6
Material vegetal	6
Reactivos	7
Instrumentación	7
Metodología	7
Tratamientos	7
Procedimiento	8
Preparación del extracto de semillas	9
Determinaciones analíticas	10
Diseño de experimento y análisis estadístico	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
Análisis Básicos	11
Peso semillas	11
Análisis de Polifenoles	12
Fenoles Totales	12
Taninos Totales	13
Índice de Gelatina	15
DMACH	16
HPLC-DAD	17
Floroglucinólisis	20
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	25
APÉNDICES	32

ABREVIACIONES

PAL	: Enzima fenilalanina amonio liasa.
cv.	: Cultivar.
°C	: Grados Celsius.
T1	: Tratamiento 1.
T2	: Tratamiento 2.
T3	: Tratamiento 3.
T4	: Tratamiento 4.
µm	: Micras.
mm	: Milímetro.
mL	: Mililitro.
L	: Litro.
rpm	: Revoluciones por minuto.
µL	: Microlitro.
nm	: Nanómetro.
mg	: Miligramo.
g	: Gramo.
Kg	: Kilogramo.
DMACH	: <i>p</i> -dimetilaminocinamaldehído.
mAU	: Mili unidades de absorvancia.
EAG	: Equivalentes de ácido gálico.
C	: (+)-Catequina.
EC	: (-)-Epicatequina.
ECG	: (-)-Epicatequina-3- <i>O</i> -galato.
B3	: Catequina-(4α→8)-catequina.
B1	: Epicatequina-(4β→8)-catequina.
B4	: Catequina-(4α→8)-epicatequina.
B2	: Epicatequina-(4β→8)-epicatequina.
GD1	: Dímero esterificado con ácido gálico 1.
GD2	: Dímero esterificado con ácido gálico 2.
GD3	: Dímero esterificado con ácido gálico 3.
TC1	: Epicatequina-(4β→8)-epicatequina-(4β→8)-catequina.
P1	: Procianidina 1.
P2	: Procianidina 2.
P3	: Procianidina 3.
AG	: Ácido gálico.
C-F	: (+)-Catequina unida a floroglucinol.
EC-F	: (-)-Epicatequina unida a floroglucinol.
ECG-F	: (-)-Epicatequina-3- <i>O</i> -galato unida a floroglucinol.
HPLC-DAD	: Cromatografía líquida de alta eficacia con arreglo de diodos.
GPm	: Grado medio de polimerización.
PMp	: Peso molecular promedio.
%G	: Porcentaje de galoilación.
DS	: Desviación estándar.

RESUMEN

El deshoje de la canopia de la vid, es una práctica que altera el microclima del racimo mediante la remoción de hojas. Actualmente se aplica tardíamente (semanas antes de cosecha) con el fin de mejorar algunas características químicas de la uva en algunos cultivares. A pesar de su amplio uso, los efectos de este deshoje tardío son aún desconocidos. En este estudio, fue evaluado el efecto de un deshoje aplicado cuatro semanas antes de cosecha sobre los componentes fenólicos de las semillas de bayas del cultivar Carménère. Los tratamientos consistieron en hileras deshojadas con exposición norte y sur, las cuales fueron contrastadas con sus respectivos controles sin deshoje.

Durante el estudio, se observó que el peso de las semillas no se afectó por la aplicación del deshoje tardío. Contrariamente, las semillas de los tratamientos deshojados presentaron contenidos de fenoles y taninos totales menores hacia la fecha de cosecha, aunque estas variaciones fueron altamente dependientes de la exposición de los tratamientos. En el caso del índice de gelatina, las semillas de los tratamientos con deshoje presentaron mayores valores durante el ensayo, observándose un abrupto aumento en el último muestreo.

La metodología utilizada para estimar el grado de polimerización de las proantocianidinas de las semillas mediante el uso de dimetilaminocinamaldehído, no permitió evidenciar claras diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, al utilizar el nucleófilo de floroglucinol para estimar el grado medio de polimerización (G_{Pm}) y el peso molecular promedio (P_{Mp}), se pudo observar que las semillas provenientes de los tratamientos deshojados presentaron menores valores de G_{Pm} y P_{Mp}, pero sólo en algunos muestreos. Este mismo análisis demostró que el porcentaje de galoilación (%G) de las semillas de tratamientos con deshoje, no presentó valores estadísticamente significativos con respecto a los controles. Un comportamiento similar se observó al cuantificar fenoles de bajo peso molecular por HPLC-DAD.

Finalmente, en base a las observaciones y a las condiciones de este estudio, es posible concluir que el deshoje tardío afecta la concentración de algunos compuestos fenólicos de las semillas de bayas del cultivar Carménère, aunque este efecto sería altamente dependiente de la exposición de las hileras.

Palabras Claves

Compuestos Fenólicos

Semilla

Deshoje

Carménère

ABSTRACT

Vine canopy defoliation modifies the cluster microclimate by removing leaves. Present defoliation practices are undertaken late (weeks before harvest) in order to improve some of the grape chemical characteristics in some cultivars. Despite its widespread use, the effects of this late defoliation are still unknown. In this study, the effect of Carménère cultivar defoliation applied four weeks before harvest was evaluated by analyzing the phenolic compounds of the berry seeds. Leafless rows with northern and southern exposure were compared to their corresponding control counterparts without defoliation.

The study showed that seed weight was not affected by late defoliation. However, the seeds subject to defoliation treatments showed lower contents of total phenols and tannins at the harvest date, although these changes were highly dependent on the exposure treatments. In the case of the gelatin index, the seeds from defoliated treatments presented higher values during the test, showing a sharp rise in the last sampling.

The methodology used to estimate the proanthocyanidins polymerization degree using dimethylaminocinnamaldehyde, did not show difference between treatments. However, when using the nucleophilic phloroglucinol to estimate the mean degree of polymerization (mDP) and average molecular weight (aMW), it was observed that the seeds which were subject to defoliation treatments showed lower values of mDP and aMW, but only in certain samples. The same analysis demonstrated that the percentage of galloylation (% G) of the seeds from defoliated treatments, did not show statistically significant differences when compared to controls. Similar behavior was observed during the quantification of low molecular weight phenols by HPLC-DAD.

The results of this investigation indicate that late defoliation affects the concentration of some of the phenolic compounds of the Carménère cultivar berry seeds. However, this effect may be highly dependent on the exposure of the rows.

Key Words

Phenolic Compounds

Seed

Defoliation

Carménère

INTRODUCCIÓN

La importancia de los compuestos fenólicos radica en su directa influencia en las características organolépticas de la uva y del vino tales como color, astringencia y amargor. Dichos compuestos derivan del metabolismo secundario de los vegetales (Dewick y Haslam, 1969; Heller y Forkmann, 1993; Peña-Neira, 2006a; Ávalos y Pérez-Urria, 2009). La ruta de biosíntesis de los compuestos fenólicos es la vía fenilpropanoide, la cual se origina a partir del aminoácido fenilalanina y depende en gran medida de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La actividad de la PAL es termo y lumínico dependiente (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986; Sparvoli *et al.*, 1994; Hunter y Ruffner, 1997; Peña-Neira, 2006a) y da origen en una primera instancia al ácido cinámico, base de gran parte de los compuestos fenólicos flavonoides (Robinson y Davis, 2000; Forkmann y Martens, 2001; Hiratzuka *et al.*, 2001; Peña, 2005; Bogs *et al.*, 2006; Downey *et al.*, 2006; Kennedy, 2008).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos están formados por un anillo bencénico unido a uno o varios grupos hidroxilos. De acuerdo a su clasificación, pueden dividirse en dos grupos: los no flavonoides y los flavonoides. Dentro de los no flavonoides, se encuentran los ácidos fenólicos (ácidos benzoicos como el ácido gálico y ácidos cinámicos) y los estilbenos. Al grupo de los flavonoides pertenecen los flavonoles, antocianos y proantocianidinas (Flanzy, 2000; Zoecklein *et al.*, 2001; Zamora, 2003; Monagas *et al.*, 2005). Referente a la constitución de los frutos de *Vitis vinifera* L., los compuestos fenólicos se concentran principalmente en hollejos y semillas. Asimismo, los flavonoles y antocianos son abundantes en los hollejos; los primeros parecen contribuir tanto al amargor como al color del vino al actuar como copigmentos de antocianinas, mientras que a los segundos se les atribuye el color rojo en uvas y en vinos tintos (Cheyner y Rigaud, 1986; Gawel, 1998; Downey *et al.*, 2003b; Rodríguez-Montealegre, *et al.*, 2006). Las proantocianidinas, conocidas también como flavan-3-oles o taninos condensados, están presentes mayormente en las semillas (60-75%) y son las principales responsables de la astringencia, amargor y estabilización de la materia colorante de los vinos, especialmente los tintos (Kennedy *et al.*, 2000a; Jordao *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003a; Roby *et al.*, 2004; Monagas *et al.*, 2005; Pastor del Río y Kennedy, 2006; Hatzidimitriou *et al.*, 2007; Hufnagel y Hofmann, 2008).

Las proantocianidinas presentan como estructura base a las procianidinas [(+)-catequina y (-)-epicatequina] y las prodelfinidinas [(+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina]. El nivel de astringencia y amargor que aportan al vino está determinado por su grado de galoilación (estructuras base unidas al ácido gálico) y por su grado de polimerización (tamaño de las proantocianidinas) (Monagas *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2004; Peña-Neira, 2006b). Las semillas presentan proantocianidinas con un menor grado de polimerización y un mayor grado de galoilación comparado con las de los hollejos, lo que explica el mayor nivel de astringencia y amargor aportado por las mismas (Prieur *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 2000b; Jordao *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003a; Peña-Neira, 2006b; Canals

et al., 2008). Durante la maduración de la baya, las proantocianidinas de las semillas experimentan una importante evolución tanto en su concentración como en su composición, disminuyendo y/o cambiando de tamaño de polimerización desde la pinta en adelante, al parecer por procesos de oxidación (Kennedy *et al.*, 2000a; Kennedy y Jones, 2001; Downey *et al.*, 2006; Peña-Neira, 2006a).

La síntesis de los compuestos fenólicos en el proceso de maduración se ve influenciado por diversos factores, entre los que destacan las condiciones climáticas, prácticas culturales y cultivar, por mencionar algunos de los más importantes (Jackson y Lombard, 1993; Broussaud *et al.*, 1999; Ojeda *et al.*, 2002; Downey *et al.*, 2006; Kennedy, 2008). Desde esta perspectiva, la luz y la temperatura afectan la fotosíntesis y la síntesis de azúcares, ácidos y metabolitos secundarios. En relación a esto último, el manejo de la canopia es una práctica que constituye una alternativa para modificar el régimen de luz disponible para la vid, entre otros, a través de una serie de técnicas que modifican la posición y cantidad de brotes, racimos y hojas, con la finalidad de impactar positivamente en la composición final de la baya, y por tanto, del vino (Smart, 1985; Bergqvist *et al.*, 2001; Muñoz *et al.*, 2002; Downey *et al.*, 2006; Peña-Neira, 2006a; Kennedy, 2008). Al respecto, la remoción de hojas o deshoje, es una técnica que se ha convertido en una labor de uso común en los viñedos (Lavín y Pardo, 2000; Muñoz *et al.*, 2002; Fredes *et al.*, 2010).

En la vid, el deshoje se realiza principalmente desde el cuajado hasta finales de pinta (Blouin y Gimbertau, 2002; Reynier, 2002; Vidal, 2004). Consiste en la supresión de un número variable de hojas que se encuentran próximas a los racimos o sombreando a los mismos, alterando el microclima de la zona de la fruta; en consecuencia, aumenta la radiación incidente y la temperatura de las bayas, así como también disminuye la humedad relativa (Jackson y Lombard, 1993; Lavín y Pardo, 2000; Muñoz *et al.*, 2002; Salazar y Melgarejo, 2005). La disminución de la humedad trae consigo un menor riesgo de enfermedades fungosas y bacterianas, de manera que esta técnica favorece la mantención de la sanidad en los racimos al quedar estos más ventilados y sueltos (Pszczółkowski *et al.*, 1985; Lavín y Pardo, 2000; Salazar y Melgarejo, 2005). Por otro lado, el aumento controlado de la temperatura provoca un incremento en los procesos metabólicos de la planta asociado al desarrollo y acumulación de metabolitos, por lo que al deshoje se le atribuyen ventajas como la de mejorar la acumulación de antocianinas y flavonoles (Haselgrove *et al.*, 2000; Downey *et al.*, 2006; Kennedy, 2008). Sin embargo, temperaturas superiores a los 30 °C afectarían negativamente en la síntesis de antocianinas (Coombe, 1987). Finalmente, algunos autores señalan que el deshoje permite atenuar aromas herbáceos determinados por las pirazinas, compuestos aromáticos sensibles a la luz y que se degradan en exposición directa a ella, típico de ciertos cultivares como el Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Merlot, Sauvignon Blanc y Carménère (Arnold y Bledsoe, 1990; Roujou de Boubée *et al.*, 2000; Pszczolkowski, 2004; Belancic y Agosin, 2007). No obstante lo anterior, Gómez (2010) no encontró efectos en la disminución de las dos principales pirazinas presentes en los hollejos de bayas del cv. Carménère al aplicar diferentes tratamientos de deshoje.

Entre los cultivares de *Vitis vinifera* mencionados anteriormente, el cv. Carménère se ha adaptado muy bien al suelo y clima seco de Chile y es motivo de estudios de selección clonal para promoverlo como variedad emblemática de nuestro país (Pszczolkowski, 2004; Fernández *et al.*, 2007). Se caracteriza por ser un cultivar de maduración tardía y por poseer un alto contenido de pirazinas en bayas. Con el objetivo de lograr una disminución del contenido de aromas herbáceos y una optimización de la madurez fenólica, estas características han implicado retrasar significativamente su fecha de cosecha, requiriendo a menudo de un deshoje extra en verano o en la época final de la maduración (Belancic y Agosin, 2007; Gil y Pszczolkowski, 2007; Mattivi *et al.*, 2009). Este deshoje, denominado como tardío, consiste en la eliminación de hasta la octava a décima hoja desde la base de la planta. Se realiza entre 3 a 5 semanas antes de la cosecha, principalmente en viñedos destinados a la producción de uvas y vinos Premium, y se ha asociado a una mejora en las características fenólicas de las bayas (Ordoñez, 2009). Sin embargo, actualmente no existen registros científicos que respalden dicha información.

Estudios previos han demostrado que el deshoje afecta la síntesis y composición de los compuestos fenólicos durante el desarrollo de la baya (Kliewer y Antcliff, 1970; Hunter *et al.*, 1995). Algunos autores han observado que la concentración de antocianinas en hollejos de bayas del cv. Cabernet Sauvignon tiende a aumentar por efecto de un deshoje parcial y que tiende a ser mayor mientras más tarde se aplique la defoliación (Hunter *et al.*, 1991). A pesar de lo anterior, los resultados no han sido concordantes, y además las investigaciones se han enfocado primordialmente en el estudio del efecto del deshoje sobre el contenido y composición de las antocianinas y flavonoles de los hollejos de bayas, existiendo escasa información con respecto a las proantocianidinas y, menor aún, referente a la presencia de estos compuestos en las semillas de bayas. En este sentido solo existe un trabajo previo en el que Galaz (2010), aplicando diferentes tratamientos de deshoje temprano (pre-envero y envero), determinó que no existe efecto sobre la concentración de taninos, su grado medio de polimerización o la proporción de flavan-3-oles monómeros, oligómeros o polímeros en bayas del cv. Carménère.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado diferencias en la composición fenólica de las semillas durante la maduración entre distintos cultivares (Fuleki y Ricardo da Silva, 1997; Santos-Buelga *et al.*, 1995; Rodríguez-Montealegre *et al.*, 2006). Comparativamente, de todas las variedades de uva para la producción de vino, la que ha sido más estudiada, debido a su gran difusión entre los países vitivinícolas, corresponde al cv. Cabernet Sauvignon (Crippen y Morrison, 1986; Santos-Buelga *et al.*, 1995; Peña-Neira, 2004; Kennedy *et al.*, 2000b; Rodríguez-Montealegre *et al.*, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de la importancia del cv. Carménère en Chile y de la cotidianeidad de la técnica del deshoje en nuestro país, los estudios de su efecto en la composición fenólica de bayas de uvas han sido limitados y, más aún, referente a las semillas de las mismas. De acuerdo a los antecedentes expuestos, se ha propuesto para el presente estudio el siguiente objetivo:

Evaluar el efecto de un deshoje tardío sobre la composición fenólica en semillas de bayas del cv. Carménère.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Lugar del estudio

Los análisis físicos y químicos de semillas se llevaron a cabo en los laboratorios de Enología y Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Material vegetal

Para la realización del estudio se utilizaron semillas provenientes de bayas del cultivar Carménère, las cuales fueron almacenadas en un congelador marca Fensa a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bolsas de cierre hermético marca Ziploc. Las bayas se obtuvieron de plantas de 7 años de edad conducidas en espaldera simple con orientación Este-Oeste, regadas mediante riego por goteo, con una producción promedio estimada de 6 ton/ha, plantadas sobre pie franco en un predio de la viña Santa Ema ubicada en el Valle del Maipo, comuna de Isla Maipo, Región Metropolitana, Chile (Figura 1).

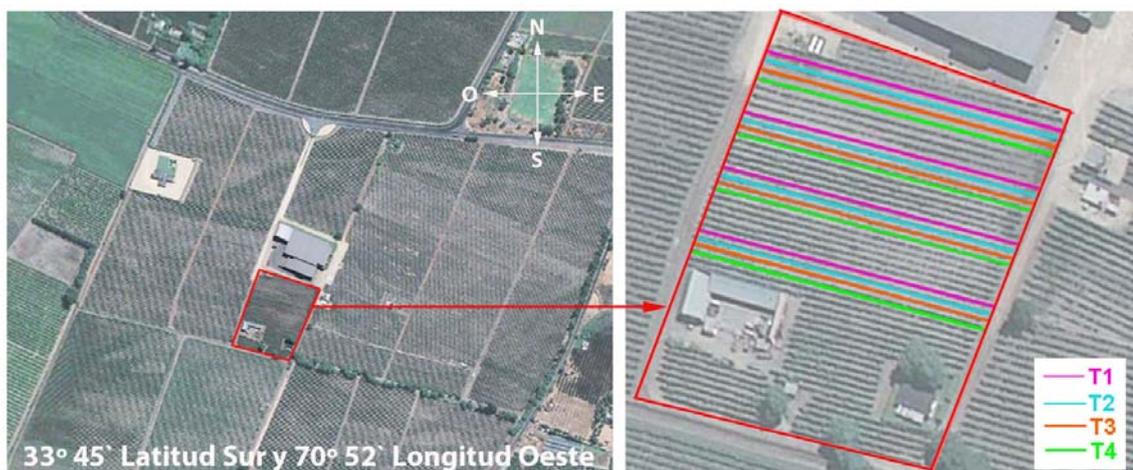


Figura 1. Foto aérea predio viña Santa Ema. Líneas de distintos colores corresponden a los diferentes tratamientos aplicados a las hileras seleccionadas para el estudio según su exposición a la luz.

Reactivos

Los estándares de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de ácido gálico (G-7384), (+)-catequina (C-1251), (-)-epicatequina (E-1753) y (-)-epicatequina-3-*O*-galato (E-3893), así como de dimetilaminocinamaldehído, floroglucinol (P-3502) y membranas filtrantes de 0,45 μm , fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos). Todos los reactivos grado pro-análisis y grado HPLC se adquirieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

Instrumentación

En la preparación de los extractos de semillas y para la posterior extracción de los compuestos fenólicos e índices se emplearon: balanza electrónica marca Denver Instrument modelo XL-3100D, minipimer marca Braun (300 Watt), agitador magnético marca Fisatom modelo 752A, bomba de vacío marca Thomas (220V), centrífuga marca Thermo Scientific Heraeus Labofuge 200, espectrofotómetro UNICAM modelo Helios Gamma 2000, pHmeter Hanna Instruments modelo pH 211 y Cromatógrafo Líquido de Alta Eficacia (HPLC-DAD) marca Agilent Technologies 1200 Series. El equipo de HPLC-DAD estaba constituido por un inyector automático modelo L-7200, un detector de arreglo de fotodiodos alineados modelo L-7455 y una columna Waters Nova-Pak C₁₈ (4 μm , 3,9 mm de diámetro interno por 300 mm de largo) adquirida en Waters (Irlanda) para los análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular. En los estudios de floroglucinol por HPLC-DAD se empleó una columna LiChro Cart 100 RP-18 (4 mm de diámetro interno por 250 mm de largo) adquirida en Agilent Technologies (Santa Clara, C.A., Estados Unidos).

Metodología

Tratamientos

Los tratamientos fueron aplicados a las hileras seleccionadas según su exposición a la luz (figuras 1 y 2):

Tratamiento 1 (T1): Control, hilera de exposición norte.

Tratamiento 2 (T2): Control, hilera de exposición sur.

Tratamiento 3 (T3): Con deshoje tardío, hilera de exposición norte.

Tratamiento 4 (T4): Con deshoje tardío, hilera de exposición sur.



Figura 2. Esquema de la exposición a la luz de hileras seleccionadas para el estudio con la aplicación de los diferentes tratamientos. Hileras de exposición norte (T1/T3). Hileras de exposición sur (T2/T4). Nótese que hileras de exposición norte presentan un total de horas de exposición a la luz considerablemente mayor que hileras de exposición sur.

Procedimiento

Cada tratamiento constó de cuatro repeticiones consistentes en hileras de 100 plantas cada una, para lo cual se seleccionaron 4 hileras al azar para cada tratamiento, resultando un total de 16 hileras seleccionadas para efectos del estudio (figuras 1 y 3).

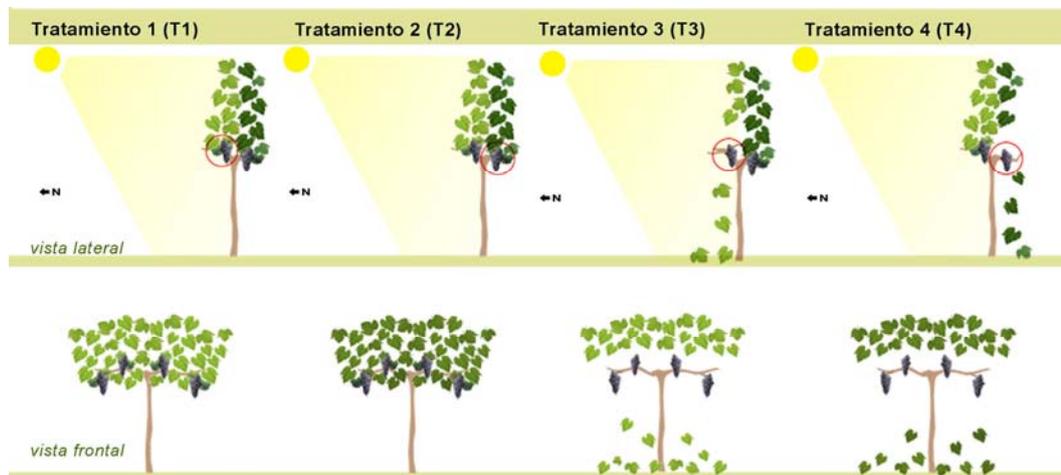


Figura 3. Esquema de los distintos tratamientos aplicados a las hileras seleccionadas según su exposición a la luz solar.

Los muestreos fueron realizados semanalmente a partir de 5 semanas antes de cosecha, recolectando un total de 100 bayas por hilera desde distintos racimos de acuerdo a su

exposición en el tratamiento. Durante la cuarta semana previa a la cosecha, correspondiente al segundo muestreo, se aplicó el deshoje tardío a las hileras de los tratamientos respectivos (Cuadro 1) (Figura 3).

Cuadro 1. Fechas de muestreo

Muestreo	Fecha de muestreo	
Muestreo 1 (M1)	14 abril	
Muestreo 2 (M2)	21 abril	(Aplicación del deshoje)
Muestreo 3 (M3)	28 abril	
Muestreo 4 (M4)	5 mayo	
Muestreo 5 (M5)	9 mayo	(Cosecha)

Las bayas fueron tomadas a partir del hombro, centro y cola de cada racimo. Una vez cosechadas, las muestras de bayas fueron almacenadas en un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4).



Figura 4. Esquema de selección de bayas recolectadas para el estudio y separación de las semillas.

Previo a los análisis, las muestras fueron descongeladas separando manualmente las semillas de cada baya.

Preparación del extracto de semillas

Luego de extraídas las semillas desde las bayas, estas fueron secadas, pesadas y procesadas de acuerdo a la metodología propuesta por Venicie *et al.* (1997). Así, las semillas fueron trituradas utilizando una minipimer y mezcladas con 40 mL de medio vínico (solución hidroalcohólica con 10% v/v de etanol y 5 g/L de ácido tartárico). A continuación, el pH de la solución fue ajustado a 3,6 y las muestras fueron aforadas con agua destilada hasta completar los 200 g. La mezcla fue macerada por 2 horas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación constante.

Transcurrido este tiempo, el sobrenadante fue centrifugado (5000 rpm por 30 minutos) y filtrado a través de una membrana de 0,45 μm .

Determinaciones analíticas

Análisis Básicos:

- Peso de 100 semillas

Análisis de Polifenoles en semillas:

- Fenoles totales: Mediante análisis espectrofotométrico de DO 280 nm (García-Barceló, 1990).
- Taninos totales: Mediante la reacción de Bate-Smith (1981).
- Índice de taninos: Mediante el índice de gelatina (Glories, 1978).
- Grado de polimerización de taninos condensados: Por el método de la *p*-dimetilaminocinamaldehído (DMACH) (Vivas *et al.*, 1994).
- Grado de polimerización de taninos condensados: Por el método del floroglucinol propuesto por Kennedy y Jones (2001) y modificado por Obreque-Slier *et al.* (2010). Los extractos de semillas fueron concentrados y secados bajo presión (3 mL) y redissueltos en 2,5 mL de metanol. Una solución fue preparada con 0,25 g de ácido ascórbico, 1,25 g de floroglucinol, 215 μL de ácido clorhídrico concentrado y completada a 25 mL con metanol (solución C). A la solución proantocianidínica en metanol se agregó 0,5 mL de metanol, se reactivó con 0,5 mL de solución A a 50 °C por 20 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 0,5 mL de acetato de sodio acuoso 200 mM con el fin de detener la reacción. La muestra obtenida se analizó por HPLC-DAD. El método utiliza un gradiente binario cuya fase móvil contiene ácido acético (fase móvil A) en agua (1% v/v) y metanol (fase móvil B). Los picos obtenidos de las muestras fueron monitoreados a DO 280 nm.
- Compuestos fenólicos de bajo peso molecular: Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) (Peña-Neira *et al.*, 2004).

Diseño de experimento y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue totalmente al azar e incluyó cuatro tratamientos con cuatro repeticiones de cada uno. La unidad experimental fue de 100 plantas.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) y en el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos se aplicó la prueba de rango múltiple de Tukey con un nivel de significancia de 5%.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Minitab versión 13.32.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Básicos

Peso de semillas de 100 bayas

La Figura 5 muestra la evolución del peso de semillas/100 bayas de los diferentes tratamientos aplicados a plantas del cultivar Carménère durante las 5 semanas del ensayo. Es posible observar que, los valores de peso de semillas de las bayas de todos los tratamientos disminuyen hacia la fecha de cosecha, comportamiento coincidente con lo descrito por otros autores (Kennedy *et al.*, 2000a; Downey *et al.*, 2003a; Pastor del Río y Kennedy, 2006).

De acuerdo a Peña-Neira (2006a), la temperatura de la baya normalmente alcanzaría valores de entre 5 a 10 °C por sobre la temperatura promedio ambiental. Por otra parte, un informe de la Asociación Nacional de Ingenieros Agrónomos Enólogos de Chile (2006) menciona que la temperatura promedio en el Valle del Maipo entre los meses de abril y mayo alcanza los 25 °C, por lo que la temperatura de la baya pudo aumentar por sobre los 30 °C durante el estudio. Esto último, afectaría no solo la división y elongación celular, si no que también aumentaría la tasa de transpiración y deshidratación de la baya, y en consecuencia, de las semillas, lo que influiría en la disminución de su peso final (Crippen y Morrison, 1986).

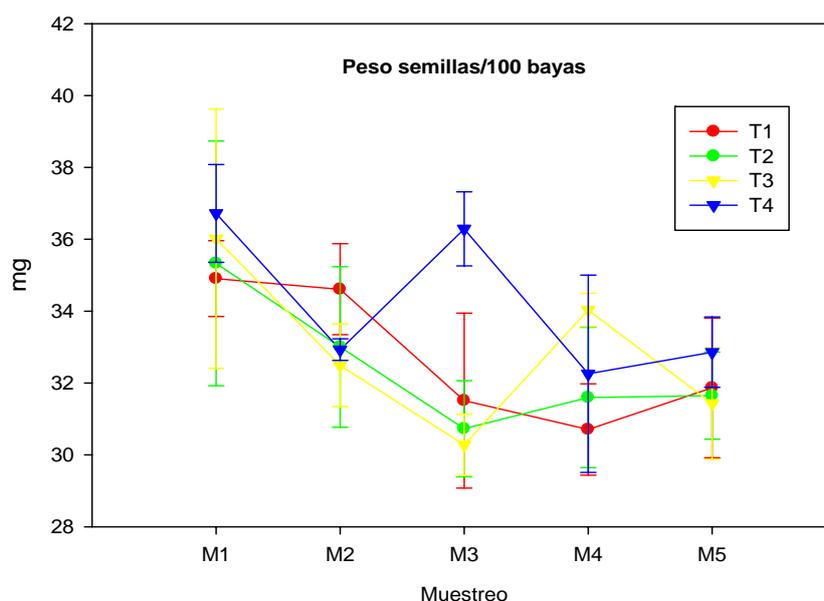


Figura 5. Evolución del peso de semillas/100 bayas 5 semanas antes de cosecha.

De modo comparativo, se pudo observar que a pesar que las semillas del tratamiento con deshoje en la exposición norte (T3) presentaron los menores valores de peso de semillas y que las del tratamiento con deshoje en la exposición sur (T4) presentaron los mayores valores en 3 de los 5 muestreos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, salvo en el tercer muestreo (Cuadro 2, Apéndice I). Este comportamiento coincide con los estudios realizados por Downey *et al.* (2004), Yamane *et al.* (2006) y Galaz (2010) en bayas del cultivar Syrah, Cabernet Sauvignon y Carménère, respectivamente, quienes no observaron diferencias significativas entre los pesos de bayas sombreadas y expuestas al sol.

Análisis de Polifenoles en semillas

Fenoles Totales

La evolución del contenido de fenoles totales en las semillas de los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 6. En todos los tratamientos se observa una tendencia decreciente del contenido de fenoles totales hacia el final del estudio. Esta tendencia es coincidente con los resultados obtenidos en otros trabajos (Kennedy *et al.*, 2000a; Obreque-Slier *et al.*, 2010). Cabe destacar que, mientras las semillas de los tratamientos de exposición norte (T1 y T3) presentaron una disminución drástica entre el tercer y cuarto muestreo, las semillas de los tratamientos de exposición sur (T2 y T4) presentaron una disminución gradual de la concentración de fenoles totales durante el ensayo, apreciación que se respalda estadísticamente (Cuadro 3, Apéndice I).

Por otra parte, las semillas de los tratamientos controles (T1 y T2) mostraron mayores contenidos de fenoles totales que las semillas de tratamientos con deshoje tardío (T3 y T4), siendo el tratamiento T3 el que mostró las menores concentraciones en 4 de los 5 muestreos, lo cual fue respaldado estadísticamente en algunas fechas de muestreo (Cuadro 3, Apéndice I).

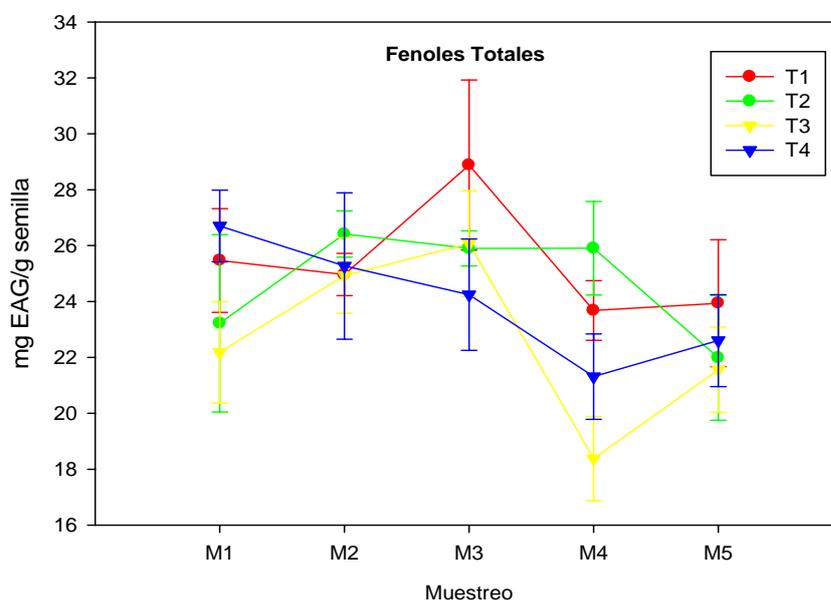


Figura 6. Evolución de la concentración de fenoles totales 5 semanas antes de cosecha.

Referente a lo anterior, es importante mencionar que no obstante la luz y temperatura promueven la formación de compuestos fenólicos (Downey *et al.*, 2006), condiciones de altas temperaturas y/o luminosidad se asociarían a una detención de los procesos metabólicos y a una disminución de la concentración de dichos compuestos en la vid, cuando las temperaturas superan los 30 °C (Coombe, 1987).

Taninos Totales

De acuerdo a lo observado en la Figura 7, la concentración de taninos totales en las semillas provenientes de los tratamientos T1 y T4, disminuye drásticamente entre el primer y segundo muestreo, para luego presentar valores constantes hacia el final del estudio. Estos resultados se asemejan a lo descrito por Obreque-Slier *et al.* (2010) y Kennedy *et al.* (2000a). Un comportamiento similar mostraron las semillas del tratamiento T2 entre los 2 primeros muestreos. Sin embargo, posteriormente sus concentraciones variaron significativamente hacia la fecha de cosecha. Contrariamente, las semillas del tratamiento T3, no presentaron concentraciones diferentes de taninos totales entre el primer y quinto muestreo (Cuadro 4, Apéndice I).

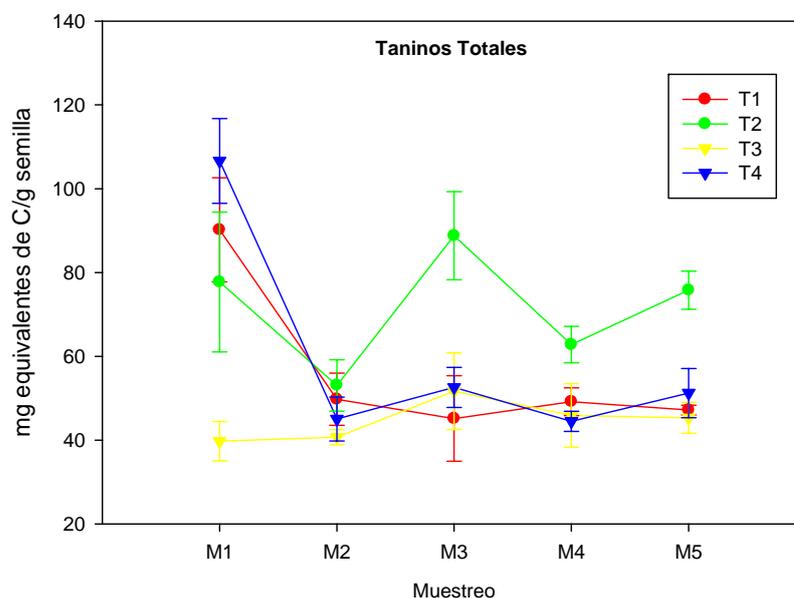


Figura 7. Evolución de la concentración de taninos totales 5 semanas antes de cosecha.

Comparativamente, las semillas del tratamiento sin deshoje tardío en la exposición sur (T2) mostraron los valores más altos de concentración de taninos totales en contraste con los demás tratamientos, mientras que las semillas del tratamiento con deshoje en la exposición norte (T3) obtuvieron los valores más bajos en la mayoría de los muestreos (Cuadro 4, Apéndice I).

Asimismo, a pesar que el tratamiento T4 presentó menores concentraciones de taninos totales comparado con su tratamiento control (T2), el tratamiento T3 no evidenció tales diferencias con su control (T1), salvo en el primer muestreo. Esto último coincide con lo observado por Downey *et al.* (2004).

Dicho de otra manera, en los tratamientos con condiciones de sombreado o menor cantidad de horas de luz durante el día (T2 y T4), un deshoje tardío produciría una disminución de la concentración de taninos totales en las semillas, mientras que en tratamientos en condiciones de mayor luz (T1 y T3), modificaciones de la arquitectura de la canopia no produciría cambios en dicha concentración. Esto podría reflejar que la mayor cantidad de horas de luz y temperatura recibida debido a un deshoje tardío, afectaría solo aquellas semillas de bayas que se encuentran en la exposición con menor cantidad de luz y temperatura y no aquellas que poseen una condición suficiente de estos parámetros.

Al respecto, Bergqvist *et al.* (2001) y Mabrouk y Sinoquet (1998) sugieren que la concentración fenólica en la uva dependería de los efectos de complejas interacciones entre la luz y la temperatura sobre los racimos y que la exposición de las hileras sería el principal determinante al aplicar un deshoje.

Índice de Gelatina

La Figura 8 muestra que la tendencia del índice de gelatina en las semillas de todos los tratamientos fue decreciente hacia el final del estudio, lo que concuerda con lo observado por Obreque-Slier *et al.* (2010). En el caso de los tratamientos deshojados tardíamente (T3 y T4), esta disminución fue evidentemente significativa hasta el cuarto muestreo, para aumentar abrupta y significativamente en el quinto.

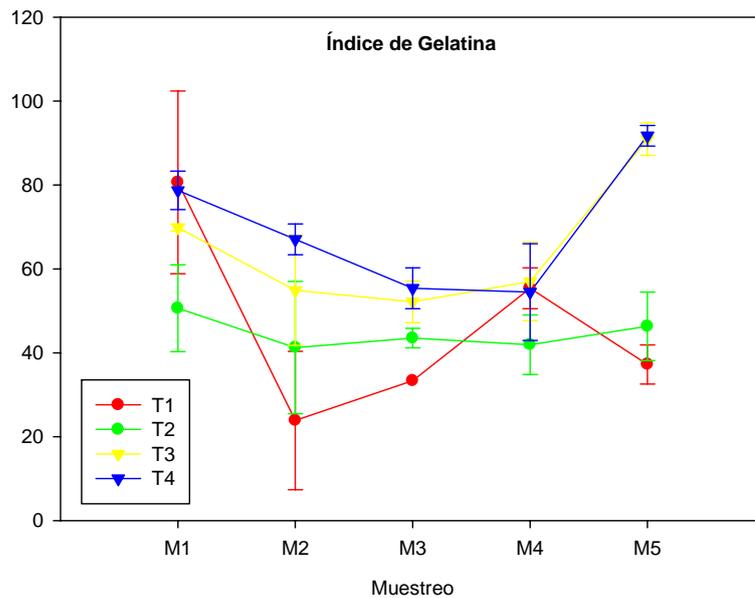


Figura 8. Evolución del índice de gelatina 5 semanas antes de cosecha.

El índice de gelatina relaciona la capacidad de una gelatina para precipitar las proantocianidinas de un extracto con la percepción de astringencia (Glories, 1984). Por lo tanto, el aumento de este índice en la fecha de cosecha, demostraría la mayor capacidad de estos compuestos por ser precipitados por la gelatina utilizada, lo que podría relacionarse con su capacidad de producir astringencia. Este punto es de alta relevancia, ya que, un deshoje realizado bajo las condiciones de este estudio, sumado a cosechas tardías (propio del cultivar Carménère), provocarían una hidrólisis de las proantocianidinas más polimerizadas de las semillas hacia las últimas fechas de muestreo (Obreque-Slier *et al.*, 2010), generando proantocianidinas más reactivas con la gelatina.

Este último aspecto se vio fuertemente respaldado al comparar los tratamientos deshojados (T3 y T4) con sus respectivos controles (T1 y T2), donde los primeros mostraron mayores valores de índices de gelatina que los segundos (Cuadro 5, Apéndice I).

Grado de polimerización de taninos condensados

La Figura 9, muestra el grado de polimerización de los taninos condensados mediante la utilización del *p*-dimetilaminocinamaldehído (índice DMACH). Este aldehído reacciona con proantocianidinas poco polimerizadas en medio ácido, permaneciendo inalterado frente a fenoles simples, ácido fenólicos, taninos hidrolizables y antocianos (Vivas *et al.*, 1994). En este estudio, se pudo observar que los extractos de semillas mostraron valores de este índice que variaron entre 36,1 y 92,9. De acuerdo a Vivas *et al.*, (1994), valores cercanos a 200 representarían a proantocianidinas poco polimerizadas (PM igual a 600), mientras que valores cercanos a 50 indicarían que estos compuestos están más polimerizados (PM entre 2000-3000).

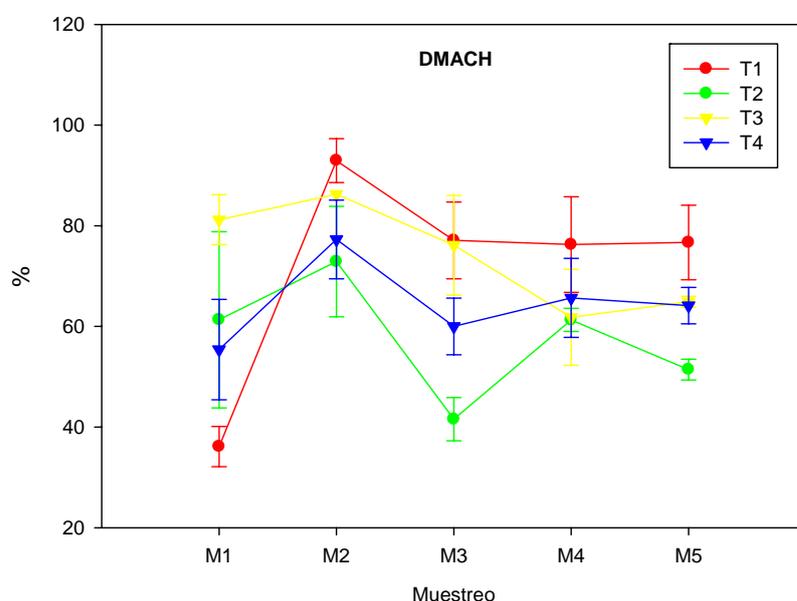


Figura 9. Evolución del grado de polimerización de taninos condensados 5 semanas antes de cosecha.

Asimismo, fue posible observar que los extractos de semillas de los 4 tratamientos del estudio, muestran un índice de DMACH creciente entre la primera y segunda fecha de muestreo, para luego descender gradualmente hacia la cosecha. De acuerdo a los valores observados por Vivas *et al.* (1994), esto representaría un aumento del grado de polimerización hacia proantocianidinas más polimerizadas desde el segundo muestreo hasta la fecha de cosecha, tendencia observada por diversos autores en otros estudios (Peña-Neira, 2006a).

Comparativamente, fue posible observar que los tratamientos de la exposición norte (T1 y T3) presentaron mayores valores del índice DMACH que los tratamientos de la exposición sur (T2 y T4) (Cuadro 6, Apéndice I). Esto indicaría que los tratamientos más expuestos a

condiciones de luz y temperatura, presentarían mayoritariamente proantocianidinas poco polimerizadas. Es interesante notar que el tratamiento T2 (control exposición sur), presentó los menores valores del índice DMACH en 4 de los 5 muestreos, indicando que a pesar de estar menos expuesto, obtuvo proantocianidinas más polimerizadas que los tratamientos restantes. En relación a lo anterior, la exposición de las hileras estaría constituyendo nuevamente un factor determinante en la concentración fenólica de las semillas, al igual que para el caso de los taninos totales.

Cuantificación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante análisis de HPLC-DAD

La Figura 10 muestra un total de 15 compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides, presentes en semillas del cultivar Carménère, identificados y cuantificados por HPLC-DAD. Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular identificados fueron: 3 monómeros [(+)-catequina (C), (-)-epicatequina (EC) y (-)-epicatequina-3-*O*-galato (ECG)], 4 proantocianidinas diméricas [catequina-(4 α →8)-catequina (B3), epicatequina-(4 β →8)-catequina (B1), catequina-(4 α →8)-epicatequina (B4) y epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (B2)], 3 dímeros esterificados con ácido gálico (GD1, GD2 y GD3), una proantocianidina trímica [epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-catequina] (TC1), diversas proantocianidinas (P1, P2 y P3) y sólo un compuesto no flavonoide [ácido gálico (AG)]. Los compuestos fenólicos anteriormente mencionados han sido identificado previamente por diversos autores (Kennedy y Jones, 2001; Peña-Neira *et al.*, 2004; Obreque-Slier *et al.*, 2010).

En este estudio, se pudo apreciar que la mayoría de los compuestos fenólicos identificados en semillas de los diferentes tratamientos presentaron una tendencia en continua disminución durante el ensayo, con variaciones significativas entre los muestreos en algunos casos (Cuadro 7, Apéndice I). Este comportamiento ha sido observado anteriormente por otros autores (Kennedy *et al.*, 2000a; Kennedy y Jones, 2001; Rodríguez-Montealegre *et al.*, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2010).

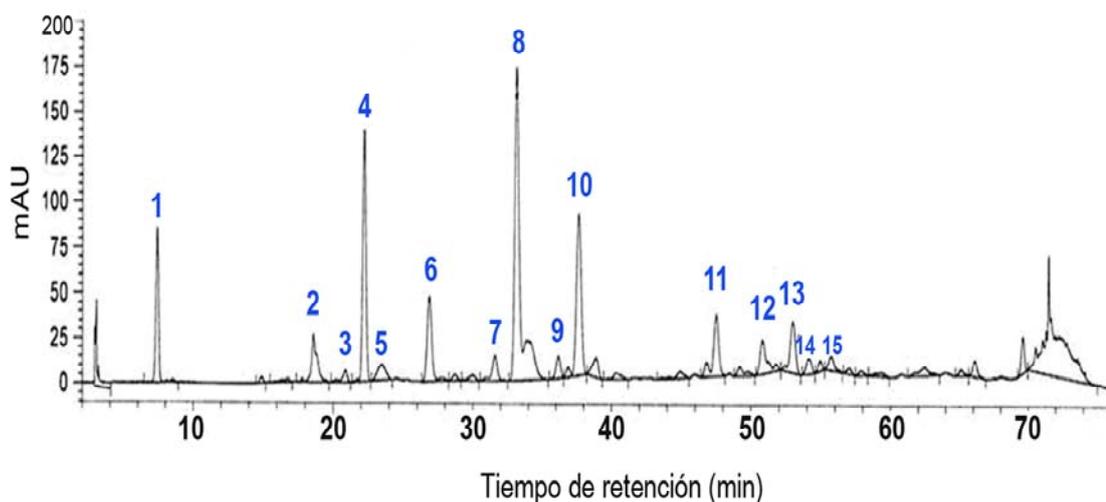


Figura 10. Cuantificación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante análisis de HPLC-DAD en extractos de semillas del cv. Carménère. Los picos indicados en el cromatograma corresponden a: (1) ácido gálico (AG); (2) catequina-(4 α →8)-catequina (B3); (3) epicatequina-(4 β →8)-catequina (B1); (4) (+)-catequina (C); (5) epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-catequina (TC1); (6) catequina-(4 α →8)-epicatequina (B4); (7) epicatequina-(4 β →8)-epicatequina (B2); (8) (-)-epicatequina (EC); (9) procianidina 1 (P1); (10) dímero esterificado con ácido gálico 1 (GD1); (11) (-)-epicatequina-3-*O*-galato (ECG); (12) procianidina 2 (P2); (13) dímero esterificado con ácido gálico 2 (GD2); (14) procianidina 3 (P3); (15) dímero esterificado con ácido gálico 3 (GD3).

De acuerdo a los autores mencionados, lo anterior se debería a procesos oxidativos propios de los estados fenológicos de madurez de la baya y a condiciones acuosas propias de este estudio (Kennedy *et al.*, 2000b; Kennedy y Jones, 2001; Peña-Neira, 2006a). En concordancia con diversos estudios (Oszmianski *et al.*, 1986; Kennedy *et al.*, 2000a; Jordao *et al.*, 2001), el monómero de EC fue el más abundante, seguido por los monómeros de C y finalmente de ECG (Cuadro 7, Apéndice I). Esto es contrario a lo observado por Obreque-Slier *et al.* (2010) en estudios realizados en el mismo cultivar, en los cuales a pesar de mostrar concentraciones similares a las de este estudio, observó que el monómero más abundante fue el de C. Esto podría indicar que la relación entre C y EC esta fuertemente influenciada por factores ambientales y manejos culturales (Jackson y Lombard, 1993; Broussaud *et al.*, 1999; Bergqvist *et al.*, 2001; Ojeda *et al.*, 2002; Peña-Neira, 2006a; Kennedy, 2008; Downey *et al.*, 2006), y menos influenciada por el efecto del cultivar.

Por otro lado, a pesar que los valores de EC y C fueron mayores en las semillas del tratamiento T1 y menores en las del tratamiento T4 en 3 de los 5 muestreos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, salvo en el primer muestreo (Figura 11) (Cuadro 7, Apéndice I).

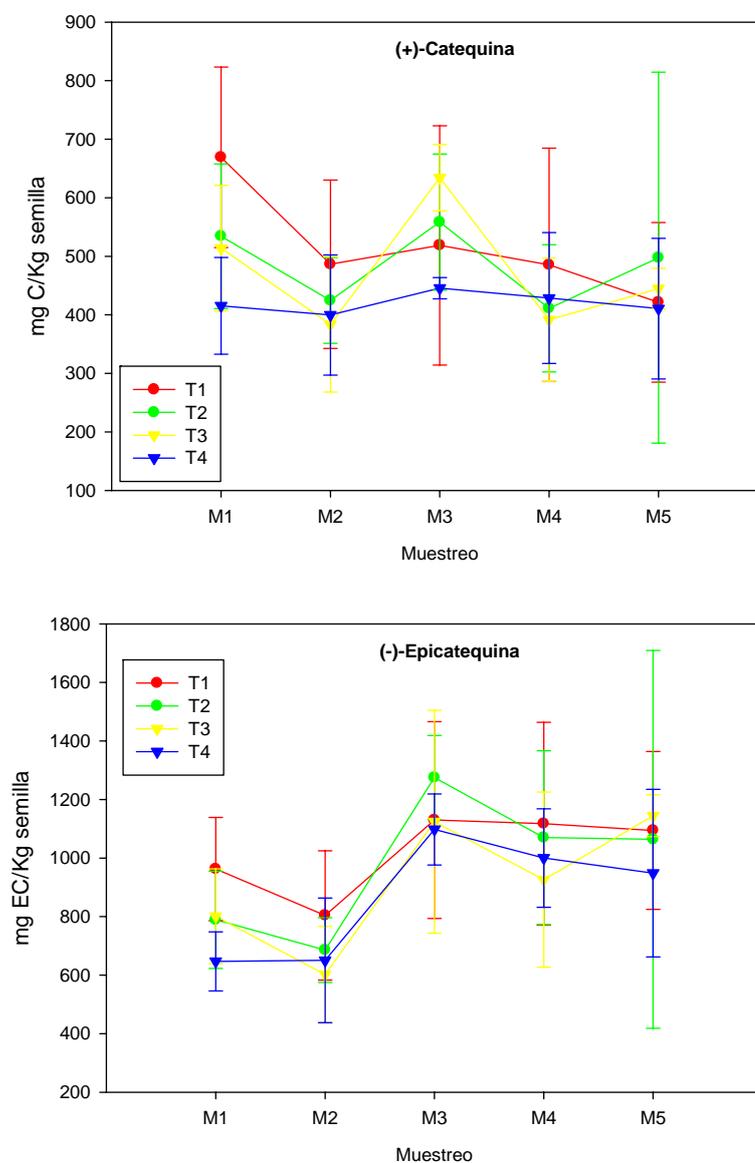


Figura 11. Evolución de los monómero de (+)-catequina (C) y (-)-epicatequina (EC) en semillas 5 semanas antes de cosecha.

Comparativamente y de modo general, se pudo observar que los extractos de semillas de los tratamientos controles (T1 y T2) presentaron las mayores concentraciones de los demás compuestos identificados, mientras que en tratamiento deshojado en la exposición sur (T4), los extractos de semillas presentaron los menores valores. Esto se relacionaría fuertemente con los valores del índice de DMACH, que indicaban que semillas del tratamiento sin deshoje en exposición sur (T2) mostraban los menores valores de este índice, debido a que los compuestos fenólicos se encontraban más polimerizados y por lo tanto, estaban menos

identificables mediante HPLC-DAD, pues esta última técnica estima preferentemente a compuestos fenólicos poco polimerizados (monómeros, dímeros y trímeros) (Sun *et al.*, 1998; Geny *et al.*, 2003; Monagas *et al.*, 2003; Peña-Neira, 2004).

Floroglucinólisis

La Figura 12, muestra el grado de polimerización de los taninos condensados en semillas mediante catálisis ácida en presencia de floroglucinol propuesto por Kennedy y Jones (2001) y modificado por Obreque-Slier *et al.* (2010). Las concentraciones y tendencias de estos compuestos son mostradas en el Cuadro 8 del Apéndice I. A partir de las concentraciones de estos compuestos fueron calculados los valores de G_{Pm}, P_{Mp} y %G.

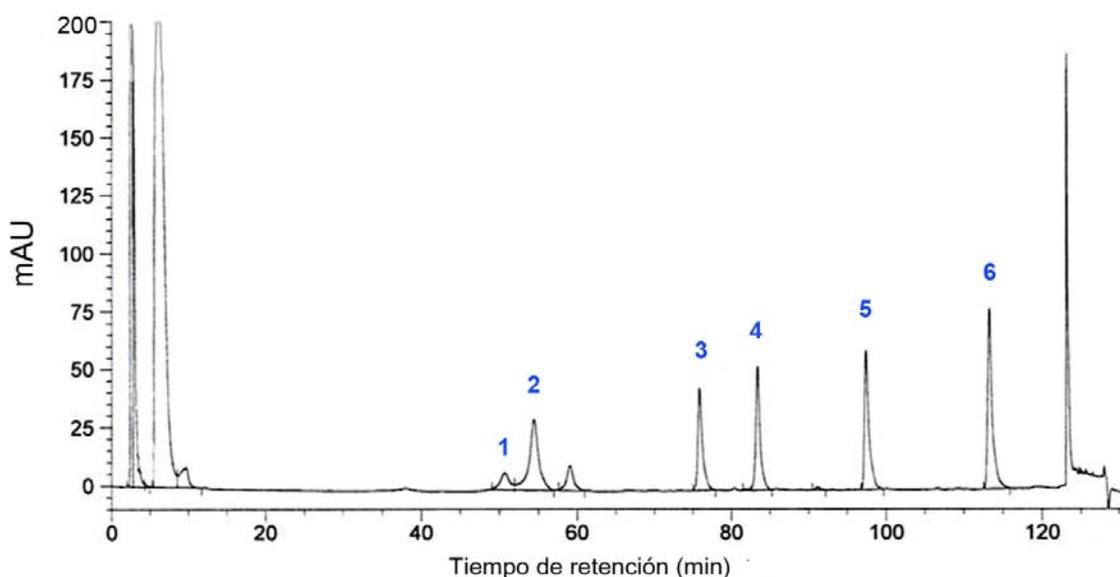


Figura 12. Cromatograma de catálisis ácida en presencia de floroglucinol en extractos de semillas del cv. Carménère. Los picos corresponden a: (1) (+)-catequina unida a floroglucinol (C-F); (2) (-)-epicatequina unida a floroglucinol (EC-F); (3) (+)-catequina (C); (4) (-)-epicatequina-3-*O*-galato unida a floroglucinol (ECG-F); (5) (-)-epicatequina (E); (6) (-)-epicatequina-3-*O*-galato (ECG).

En el caso del G_{Pm} y P_{Mp}, fue posible observar valores que variaron entre 2,5-3,3 y 859,8-1128,5, respectivamente, coincidente con lo observado por Obreque-Slier *et al.* (2010) en el mismo cultivar (Figura 13). Asimismo, fue posible observar que el tratamiento control con exposición sur (T2) presentó los mayores valores de G_{Pm} y P_{Mp} en 4 de los 5 muestreos comparado con los otros tratamientos, diferencias que fueron avaladas estadísticamente en las tres primeras fechas (Cuadro 8, Apéndice I). Esto indicaría que el tratamiento control T2

(menos horas de luz), presentó compuestos fenólicos más polimerizados, observación contraria a la de otros autores (Downey *et al.*, 2003a). Esto coincide fuerte y claramente con lo observado en el índice DMACH, que indicó que este tratamiento presentó proantocianidinas más polimerizadas que los tratamientos restantes.

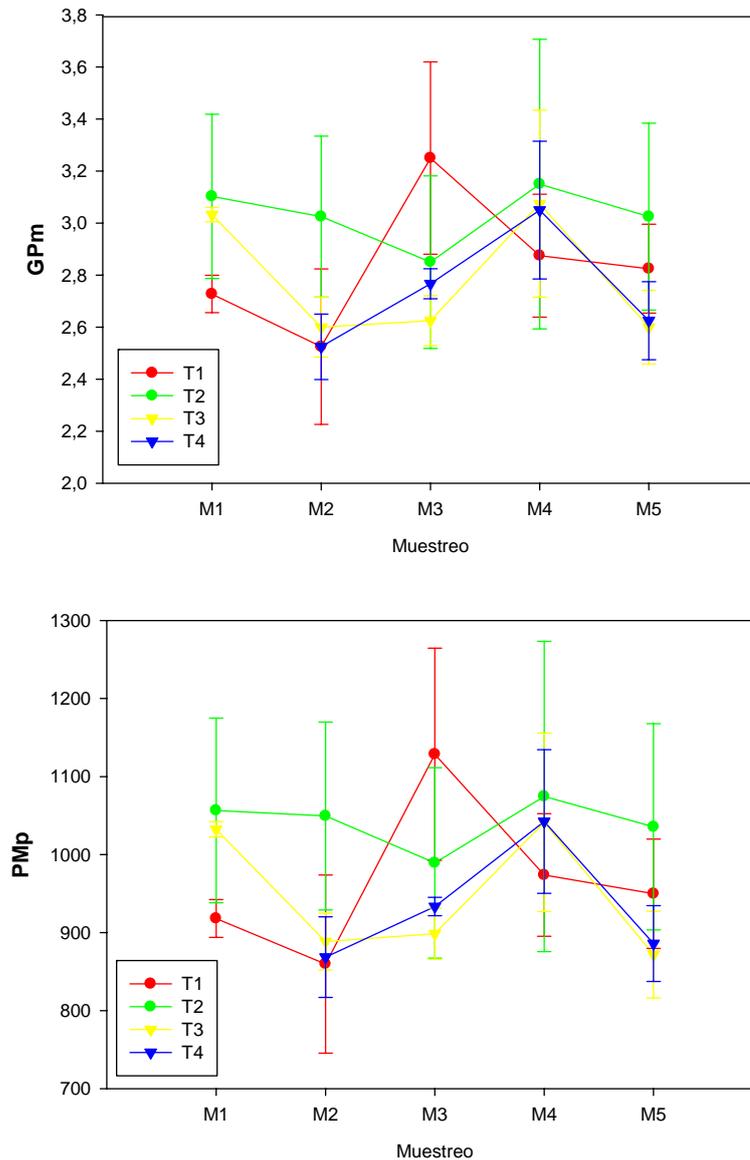


Figura 13. Evolución del grado medio de polimerización (Gpm) y peso molecular promedio (Pmp) de las proantocianidinas de las semillas 5 semanas antes de cosecha.

En el caso del porcentaje de galoilación (% G), los valores observados en este estudio son mayores que los observados por Obreque-Slier *et al.* (2010) en el mismo cultivar. Esto

último se debería a las condiciones ambientales y culturales diferenciales entre ambos estudios. Tal como muestra la Figura 14, el % G de los extractos de semillas de los 4 tratamientos aumenta entre el primer y segundo muestreo, disminuyendo gradualmente hacia el final del estudio. Esto indicaría que los compuestos fenólicos galoilados están en menor concentración hacia la fecha de cosecha, lo que podría tener una fuerte incidencia en algunos aspectos sensoriales, tales como el amargor (Prieur *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 2000b; Jordao *et al.*, 2001; Peña-Neira, 2006b; Canals *et al.*, 2008).

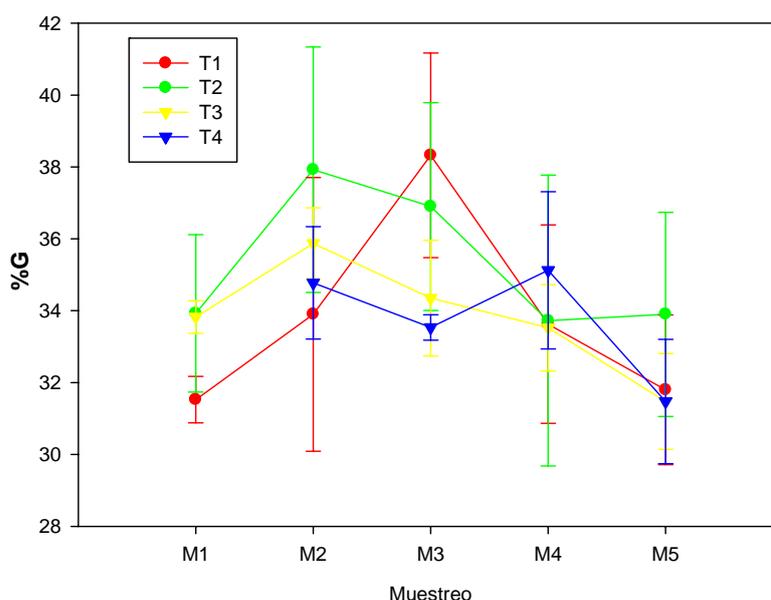


Figura 14. Evolución del porcentaje de galoilación (%G) de las proantocianidinas de las semillas 5 semanas antes de cosecha.

De forma comparativa, se pudo observar que las semillas de los tratamientos controles o sin deshoje (T1 y T2) presentaron porcentajes de galoilación estadísticamente invariables entre el primer y último muestreo. Este comportamiento fue contrario a lo observado en los tratamientos deshojados (T3 y T4), donde se observó una tendencia a disminuir hacia el final del estudio, aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 8, Apéndice I). Esta observación indicaría que el deshoje podría tener efecto sobre las proantocianidinas galoiladas en semillas que estuvieron más expuestas a condiciones ambientales.

Finalmente y a modo de discusión, la elevada desviación estándar observada para la mayoría de las variables determinadas (Cuadros 2-8, Apéndice I), explicaría el que no se observaran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados. Desde una perspectiva enológica práctica, los resultados presentados en este trabajo evidencian la

heterogeneidad que pueden presentar las bayas al final del proceso de maduración y la relevancia del muestreo al instante de definir el momento óptimo de cosecha.

CONCLUSIONES

En este estudio se evaluó el efecto de la aplicación de un deshoje realizado cuatro semanas antes de cosecha sobre la composición fenólica de las semillas de bayas del cultivar Carménère.

Las semillas provenientes de los tratamientos deshojados presentaron menores concentraciones de fenoles y taninos totales, así como también mostraron mayores valores de índice de gelatina durante el ensayo. Asimismo, las semillas de los tratamientos con deshoje presentaron menores valores de G_{Pm} y P_{Mp}, pero sólo en algunos muestreos. A pesar que las concentraciones de algunos compuestos identificados en las semillas mediante HPLC-DAD presentaron valores diferentes entre los tratamientos deshojados y sus respectivos controles, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. De la misma manera, no se observaron dichas diferencias entre los tratamientos en los valores del %G de las proantocianidinas, peso de semillas y grado medio de polimerización mediante el uso de DMACH.

De acuerdo a las observaciones anteriormente descritas y bajo las condiciones de este ensayo, es posible concluir que el deshoje tardío afecta la concentración de algunos compuestos fenólicos de las semillas de bayas del cultivar Carménère, aunque este efecto estaría fuertemente relacionado con la exposición de las hileras.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación Nacional de Ingenieros Agrónomos Enólogos de Chile. 2006. Informe de vendimia 2006. Disponible en: <http://www.enologo.cl/INFORME%20VENIDIMIA%202006.doc>. Leído el 25 de junio de 2010.

Ávalos-García, A. y E. Pérez-Urria. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal 2 (3): 119-145.

Arnold, R.A. and A.M. Bledsoe. 1990. The effect of various leaf removal treatments on the aroma and flavor of Sauvignon Blanc wine. American Journal of Enology and Viticulture 41: 74-76.

Bate-Smith, E. 1981. Astringent tannins of the leaves of Geranium species. Phytochemistry 20: 211-216.

Belancic, A. and E. Agosin. 2007. Methoxypyrazines in grapes and wines of *Vitis vinifera* cv. *Carménère*. American Journal of Enology and Viticulture 58: 462-469.

Bergqvist, J., N. Dokoozlian and N. Ebisuda. 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): 1-7.

Blouin, J. y G. Guimberteau. 2002. Maduración y madurez de la uva. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 151p.

Bogs, J., A. Ebadi, D. Mc David and S.P. Robinson. 2006. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. Plant Physiology 140: 279-291.

Broussaud, F., V. Cheynier, C. Asselin and M. Moutounet. 1999. Flavonoid compositional differences of grapes among site test plantings of Cabernet Franc. American Journal of Enology and Viticulture 50: 277-284.

Canals, R., C. Llaudy, J.M. Canals and F. Zamora. 2008. Influence of the elimination and addition of seeds on the color, phenolic composition and astringency of red wine. European Food Research and Technology 226: 1183-1190.

Crippen, D.D. and J.C. Morrison. 1986. The effects of sun exposure on the phenolic content of Cabernet Sauvignon berries during development. American Journal of Enology and Viticulture 37: 243-247.

- Coombe, B.G. 1987. Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Horticulturae* 206: 23-35.
- Cheyrier, V. and J. Rigaud. 1986. HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 248–252.
- Dewick, M. P. and E. Haslam. 1969. Phenol biosynthesis in higher plants. Gallic acid. *Biochemical Journal* 113: 537-42.
- Downey, M.O., J.S. Harvey and S.P. Robinson. 2003a. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal Grape Wine Research* 9: 15-27.
- Downey, M.O., J.S. Harvey and S.P. Robinson. 2003b. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal Grape Wine Research* 9: 110-121.
- Downey, M.O., J.S. Harvey and S.P. Robinson. 2004. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal Grape Wine Research* 10: 55-73.
- Downey, M.O., N.K. Dokoozlian and M.P. Krstic. 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.
- Fernández, K., J. Kennedy and E. Agosin. 2007. Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3675-3680.
- Flancy, C. 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Primera edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 783 p.
- Forkmann, G. and S. Martens. 2001. Metabolic engineering and applications on flavonoids. *Plant Biotechnology Journal* 12: 155-160.
- Fredes, C., Y. Moreno, S. Ortega and E. Von Bennewitz. 2010. Vine balance: a study case in *Carménère* grapevines. *Ciencia e Investigación Agraria* 37(1): 143-150.
- Fuleki, T. and J. M. Ricardo-da-Silva. 1997. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1156-1160.
- Galaz, B. 2010. Evaluación del efecto de diferentes regímenes lumínicos en racimos de *Vitis vinifera* L. cv. Carménère sobre los compuestos fenólicos de hollejos. Tesis Magíster en Enología y Vitivinicultura. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 79 p.

- García-Barceló, J. 1990. Técnicas analíticas para vino. Ediciones FAB. Barcelona, España. 1713 p.
- Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 74-95.
- Geny, L., C. Saucier, S. Bracco, F. Daviaud and Y. Glories. 2003. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 8051-8054.
- Glories, Y. 1978. Recherches sur la matière colorantes des vins rouges. Thèse doctorat d'état, Université de Bordeaux II. 364 p.
- Gil, G. and P. Pszczolkowski. 2007. Viticultura, Fundamentos para optimizar producción y calidad. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 535 p.
- Gómez, C. 2010. Efecto de la luz solar sobre la concentración de metoxipirazinas en bayas del cv. Carménère. Tesis Magíster en Enología y Vitivinicultura. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 51 p.
- Haselgrove, L., D. Botting, R. Van Heeswijk, P.B. Høj, P.R. Dry, C. Ford and P.G. Iland. 2000. Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 141-149.
- Hatzidimitriou, E., N. Nenadis and M.Z. Tsimidou. 2007. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (aw) conditions. *Food Chemistry* 105: 1504–1511.
- Heller, W. and G. Forkmann. 1993. Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed). *The flavonoids: Advances in research since 1986*. Chapman & Hall. Londres, Inglaterra. 499-536.
- Hiratsuka, S., H. Onodera, Y. Kawai, T. Kubo, H. Itoh and R. Wada. 2001. Enzyme activity changes during anthocyanin synthesis in Olympia grape berries. *Scientia Horticulturae* 90: 255-264.
- Hufnagel, J.C. and T. Hofmann. 2008. Orosensory-directed identification of astringent mouth feel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1376–1386.
- Hunter, J. J., O. T. De Villiers and J. E. Watts. 1991. The effects of partial defoliations on quality characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes. II Skin color, skin sugar and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture* 42: 13-18.
- Hunter, J.J., H.P. Ruffner, C.G. Volschenk and D.J. Le Roux. 1995. Partial defoliation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon/99 Richter: effect on root growth, canopy

efficiency, grape composition, and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 306-314.

Hunter, J.J. and H.P. Ruffner. 1997. Diurnal and seasonal changes in nitrate reductase activity and nitrogen content of grapevines: effect of canopy management. *Vitis* 36: 1–6.

Jackson, D. I. and P.B. Lombard. 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality - a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 44 (4): 409-430.

Jordao, A., J. Ricardo-da-Silva and O. Laureano. 2001. Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelão Francês and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (3): 230-234.

Kennedy, J.A., G. Troup, J. Pilbrow, D. Hutton, D. Hewitt, C. Hunter, R. Ristic, P. Iland and G. Jones. 2000a. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal Grape Wine Research* 6: 244-254.

Kennedy, J.A., M.A. Matthews and A.L. Waterhouse. 2000b. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55: 77-85.

Kennedy, J.A., Y. Hayasaka, S. Vidal, E.J. Waters and G.P. Jones. 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5348-5355.

Kennedy, J. and G.P. Jones. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1740-1746.

Kennedy, J. 2008. Grape and wine phenolics: observations and recent findings. *Ciencia e Investigación Agraria* 35(2): 107-120.

Kliewer, W.M. and A.J. Antcliff. 1970. Influence of defoliation, leafdarkening and cluster shading on the growth and composition of Sultana grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 21: 26-36.

Lavín, A. y M. Pardo. 2001. Épocas de deshoje y sus efectos sobre la composición química de mostos y composición química y calidad sensorial de vinos de la cv. Chardonnay y Cabernet Sauvignon, en el área de Cauquenes. *Agricultura Técnica* 61(2): 129-139.

Mabrouk, H. and H. Sinoquet. 1998. Indices of 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.

Mattivi, F., U. Vrhovsek, D. Masuero and D. Trainotti. 2009. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal Grape Wine Research* 15: 27-35.

- Monagas, M., C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, O. Lureano and J.M. Ricardo-da-Silva. 2003. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6475-6481.
- Monagas, M., B. Bartolomé and C. Gómez-Cordovés. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition* 45: 85-118.
- Muñoz, R., J. Pérez, P.H. Pszczolkowski y E. Bordeu. 2002. Influencia del nivel de carga y microclima sobre la composición y calidad de bayas, mosto y vino de Cabernet Sauvignon. *Ciencia e Investigación Agraria* 29(2): 115-125.
- Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora-Marín, J.M. Ricardo-da-Silva and O. Laureano. 2010. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6) : 3591-3599.
- Ojeda, H., C. Andary, E. Creaba, A. Carbonneau and A. Deloire. 2002. Influence of pre and post veraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* var. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture* 53 (4): 261–267.
- Ordóñez, J. 2009. Efecto del deshoje tardío y orientación lumínica sobre la composición física y química de hollejos de bayas del cultivar Carménère. Memoria Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 44 p.
- Oszmianski, J., F. Romeyer, J. Sapis and J. Macheix. 1986. Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 7-12.
- Pastor del Rio, J. and J.A. Kennedy. 2006. Development of proanthocyanidin in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 125–132.
- Peña-Neira, A., M. Dueñas, A. Duarte, T. Hernández, I. Estrella and E. Loyola. 2004. Effects of ripening stages of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon in the Maipo Valley (Chile). *Vitis* 43: 51-57.
- Peña, A. 2005. En uvas tintas factores que regulan el color. *Revista Vendimia*, Diciembre 2005: 12-14.
- Peña-Neira, A. 2006a. Cambios composicionales de la baya durante el proceso de maduración y su importancia en la calidad de la uva y el vino. Disponible en: <http://www.gie.uchile.cl/publicaciones/index.html>. Leído el 14 de Agosto de 2009.

- Peña-Neira, A. 2006b. En la calidad de uvas y vino los taninos y su importancia. Revista Vendimia, Abril 2006: 18-20.
- Prieur, C., J. Rigaud, V. Cheynier and M. Moutounet. 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36(3): 781-784.
- Pszczółkowski, P.H., A. Morales y S. Cava, 1985. Composición química y calidad de mostos y vinos obtenidos de racimos diferentemente asoleados. *Ciencia e Investigación Agraria* 12(3): 181-187.
- Pszczolkowski, P. 2004. La invención del Carménère (*Vitis vinifera* L.) en Chile, desde la mirada de uno de sus actores. Universidad de Talca. Revista UNIVERSUN 19: 150-165.
- Reynier, A. 2002. Manual de Viticultura. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 497 p.
- Robinson, S.P. and C. Davies. 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 175-188.
- Roby, G., J.F. Harbertson, D.A. Adams and M.A. Matthews. 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: anthocyanins and tannins. *Australian Journal Grape Wine Research* 10: 100-107.
- Rodríguez-Montealegre, R., R. Romero-Peces, J.L. Chacón-Vozmediano, J. Martínez – Gascueña and E. García-Romero. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 687–693.
- Roubelakis-Angelakis, K.A. and W.M. Kliewer. 1986. Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 275–280.
- Roujou de Boubee, D., C. Van-Leeuwen and D. Dubourdieu. 2000. Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Red Bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4830-4834.
- Salazar, D. y P. Melgarejo. 2005. Viticultura: técnicas de cultivo de la vid, calidad de la uva y atributos de los vinos. Primera edición. Editorial AMV y Mundi-Prensa. Madrid, España. 325 p.
- Santos-Buelga, C., E.M. Francia-Aricha and M.T. Escribano-Bailón, 1995. Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 :197-201.
- Smart, R.E. 1985. Principles of grapevine canopy management microclimate manipulation with implications for yield and quality. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 36: 230-239.

Sparvoli, F., C. Martin, A. Scienza, G. Gavazzi and CH. Tonelli. 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Molecular Biology* 24: 743–755.

Sun, B., L. Conceicao, J. M. Ricardo-da-Silva and I. Spranger. 1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1390-1396.

Venencie, C., M. Uveira et S. Guet. 1997. Maturité polyphénolique du raisin mûre en place d'une méthode d'analyse de routine. *Revue française d'œnologie*, Novembre, N° 167: 36-41.

Vidal, S., L. Francis, A. Noble, M. Kwiatkowski, V. Cheynier and E. Waters. 2004. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chemical Acta* 513 (1): 57-65.

Vivas, N., Y. Glories, L. Lagune, C. Saucier et M. Augustin. 1994. Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 28(4): 319-336.

Yamane, T., S.T. Jeong, N. Goto-Yamamoto, Y. Koshita and S. Kobayashi. 2006. Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *American Journal of Enology and Viticulture* 57 (1): 54-59.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 224 p.

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

APÉNDICES

Apéndice I

Cuadro 2. Valores de peso de semillas (mg) de 100 bayas durante el ensayo.

	T1	DS		T2	DS		T3	DS		T4	DS	
M1	34,9	± 1,1	a B	35,3	± 3,4	a A	36,0	± 3,6	a B	36,7	± 1,4	a B
M2	34,6	± 1,3	a B	33,0	± 2,2	a A	32,5	± 1,2	a AB	32,9	± 0,3	a A
M3	31,5	± 2,4	a AB	30,7	± 1,3	a A	30,3	± 0,9	a A	36,3	± 1,0	b B
M4	30,7	± 1,3	a A	31,6	± 2,0	a A	34,0	± 0,5	a AB	32,3	± 2,7	a A
M5	31,9	± 1,9	a AB	31,7	± 1,2	a A	31,4	± 1,5	a AB	32,9	± 1,0	a A

Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada fecha de muestreo (según prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de muestreo para cada tratamiento ($p \leq 0,05$).

Cuadro 3. Concentración de fenoles totales (mg equivalente ácido gálico/g de semilla) en semillas durante el ensayo.

	T1	DS		T2	DS		T3	DS		T4	DS	
M1	25,5	± 1,9	ab AB	23,2	± 3,2	ab AB	22,2	± 1,8	a B	26,7	± 1,3	b B
M2	25,0	± 0,8	a AB	26,4	± 0,8	a B	24,9	± 1,3	a BC	25,3	± 2,6	a AB
M3	28,9	± 3,0	b B	25,9	± 0,6	ab AB	26,1	± 1,9	ab C	24,2	± 2,0	a AB
M4	23,7	± 1,1	bc A	25,9	± 1,7	c AB	18,4	± 1,5	a A	21,3	± 1,5	ab A
M5	23,9	± 2,3	a A	22,0	± 2,2	a A	21,6	± 1,5	a AB	22,6	± 1,6	a A

Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada fecha de muestreo (según prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de muestreo para cada tratamiento ($p \leq 0,05$).

Cuadro 4. Concentración de taninos totales (mg equivalentes de (+)-catequina/g de semilla) en semillas durante el ensayo.

	T1	DS	T2	DS	T3	DS	T4	DS
M1	90,2 ± 12,4	bc B	77,7 ± 16,7	b BC	39,8 ± 4,7	a A	106,6 ± 10,11	c B
M2	49,8 ± 6,2	ab A	53,1 ± 6,2	b A	40,7 ± 1,8	a A	45,0 ± 5,23	ab A
M3	45,2 ± 10,2	a A	88,8 ± 10,5	b C	51,7 ± 9,1	a A	52,6 ± 4,79	a A
M4	49,2 ± 3,3	a A	62,8 ± 4,3	b AB	45,9 ± 7,6	a A	44,5 ± 2,38	a A
M5	47,2 ± 1,2	a A	75,8 ± 4,6	b BC	45,3 ± 3,7	a A	51,2 ± 5,87	a A

Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada fecha de muestreo (según prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de muestreo para cada tratamiento ($p \leq 0,05$).

Cuadro 5. Índice de Gelatina

	T1	DS	T2	DS	T3	DS	T4	DS
M1	80,6 ± 21,8	b C	50,6 ± 10,4	a A	69,8 ± 0,8	ab B	78,7 ± 4,6	b BC
M2	23,9 ± 16,5	a A	41,3 ± 15,8	ab A	54,9 ± 13,1	b AB	67,0 ± 3,7	b AB
M3	33,3 ± 0,0	a AB	43,5 ± 2,3	b A	52,1 ± 5,0	c AB	55,4 ± 4,9	c A
M4	55,4 ± 4,9	a BC	41,9 ± 7,1	a A	57,0 ± 9,4	a A	54,5 ± 11,5	a A
M5	37,2 ± 4,7	a AB	46,3 ± 8,2	a A	90,9 ± 3,9	b C	91,7 ± 2,5	b C

Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada fecha de muestreo (según prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de muestreo para cada tratamiento ($p \leq 0,05$).

Cuadro 6. DMACH (%)

	T1	DS	T2	DS	T3	DS	T4	DS
M1	36,1 ± 4,0	a A	61,3 ± 17,5	bc AB	81,2 ± 5,0	c C	55,4 ± 10,0	ab A
M2	92,9 ± 4,4	b C	72,9 ± 11,0	a B	86,3 ± 0,0	ab C	77,3 ± 7,8	a B
M3	77,1 ± 7,6	c B	41,6 ± 4,3	a A	76,2 ± 9,9	c BC	60,0 ± 5,6	b A
M4	76,3 ± 9,5	a B	61,3 ± 2,3	a AB	61,8 ± 9,5	a A	65,7 ± 7,9	a AB
M5	76,7 ± 7,4	c B	51,4 ± 2,1	a A	64,9 ± 1,1	b AB	64,1 ± 3,6	b AB

Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada fecha de muestreo (según prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de muestreo para cada tratamiento ($p \leq 0,05$).

Cuadro 7. Concentración de fenoles de bajo peso molecular en semillas durante el ensayo (mg/kg de semilla).

		T1		DS		T2		DS		T3		DS		T4		DS					
AG	M1	143,0	±	20,3	b	B	102,0	±	14,6	a	A	94,0	±	13,9	a	A	83,0	±	6,0	a	A
	M2	95,4	±	16,1	a	A	105,2	±	8,6	a	A	104,3	±	24,0	a	A	102,1	±	20,9	a	A
	M3	118,0	±	19,5	ab	AB	123,6	±	7,7	ab	A	147,0	±	20,1	b	B	98,7	±	8,5	a	A
	M4	112,9	±	23,6	a	AB	104,0	±	17,2	a	A	98,5	±	14,3	a	A	100,8	±	14,7	a	A
	M5	112,7	±	24,5	a	AB	108,4	±	35,7	a	A	121,3	±	10,6	a	AB	110,5	±	16,5	a	A
B3	M1	101,2	±	27,2	a	A	189,4	±	43,9	b	C	179,8	±	43,7	b	B	61,6	±	9,0	a	A
	M2	66,4	±	10,5	a	A	66,0	±	6,1	a	AB	54,3	±	9,9	a	A	56,6	±	10,6	a	A
	M3	114,8	±	81,0	a	A	60,7	±	3,9	a	A	79,4	±	9,1	a	AB	156,9	±	75,0	a	B
	M4	162,1	±	82,4	a	A	150,5	±	69,3	a	BC	82,6	±	62,6	a	AB	75,5	±	22,0	a	AB
	M5	66,0	±	10,7	a	A	65,5	±	32,0	a	AB	136,0	±	86,1	a	AB	79,4	±	31,1	a	AB
B1	M1	65,9	±	8,9	b	A	51,0	±	13,6	ab	A	55,7	±	8,3	ab	AB	42,3	±	5,9	a	A
	M2	52,2	±	10,6	a	A	60,4	±	8,3	a	A	48,2	±	15,8	a	A	44,9	±	13,4	a	A
	M3	52,2	±	11,1	a	A	61,8	±	4,2	a	A	77,7	±	6,8	b	B	54,9	±	6,0	a	AB
	M4	53,4	±	15,1	a	A	59,3	±	21,8	a	A	50,1	±	19,1	a	AB	68,6	±	5,3	a	B
	M5	72,7	±	10,3	a	A	53,9	±	26,0	a	A	54,4	±	10,4	a	AB	48,8	±	17,5	a	AB
C	M1	669,2	±	154,2	b	A	534,3	±	123,6	ab	A	513,9	±	107,4	ab	AB	415,3	±	82,6	a	A
	M2	486,5	±	143,8	a	A	424,5	±	73,2	a	A	383,6	±	115,5	a	A	399,7	±	102,6	a	A
	M3	518,7	±	204,5	a	A	558,5	±	116,2	a	A	634,3	±	56,7	a	B	445,5	±	18,1	a	A
	M4	485,4	±	199,5	a	A	411,1	±	108,7	a	A	391,6	±	105,3	a	A	428,6	±	111,8	a	A
	M5	421,5	±	136,4	a	A	497,6	±	316,9	a	A	445,0	±	34,5	a	AB	410,5	±	120,1	a	A
TC1	M1	135,4	±	32,7	a	C	108,5	±	14,8	a	CD	107,3	±	17,6	a	C	123,4	±	30,4	a	B
	M2	108,6	±	21,1	a	BC	98,0	±	4,3	a	BC	81,7	±	19,7	a	ABC	88,0	±	4,7	a	AB
	M3	71,9	±	28,5	a	AB	83,0	±	6,0	a	B	89,8	±	9,5	a	BC	59,1	±	10,1	a	AB
	M4	55,8	±	13,7	a	A	59,3	±	4,8	a	A	60,8	±	3,8	a	A	87,5	±	45,2	a	AB
	M5	73,5	±	11,9	a	AB	121,0	±	7,9	b	D	69,3	±	0,9	a	AB	62,4	±	4,9	a	AB
B4	M1	286,8	±	63,7	a	A	263,8	±	47,5	a	A	267,9	±	56,0	a	AB	224,3	±	34,9	a	A
	M2	263,9	±	26,7	a	A	261,9	±	23,5	a	A	202,4	±	61,3	a	A	227,6	±	66,4	a	A
	M3	263,2	±	51,8	a	A	320,8	±	35,2	ab	A	354,2	±	16,3	b	B	284,6	±	45,1	ab	A
	M4	304,2	±	79,4	a	A	309,0	±	98,7	a	A	273,7	±	89,3	a	AB	287,8	±	38,5	a	A
	M5	327,5	±	53,8	a	A	297,8	±	182,8	a	A	344,8	±	27,6	a	B	259	±	85,1	a	A
B2	M1	100,4	±	27,8	a	A	102,5	±	18,0	a	A	100,7	±	11,2	a	A	78,7	±	9,2	a	A
	M2	78,9	±	13,4	a	A	89,6	±	7,1	a	A	78,3	±	18,5	a	A	72,6	±	21,6	a	A
	M3	85,1	±	6,3	a	A	95,8	±	12,4	a	A	100,0	±	33,9	a	A	91,9	±	8,4	a	A
	M4	87,2	±	21,7	a	A	93,0	±	28,8	a	A	87,0	±	28,2	a	A	92,1	±	20,1	a	A
	M5	92,6	±	17,2	a	A	98,9	±	28,1	a	A	108,0	±	24,7	a	A	67,2	±	23,5	a	A
EC	M1	962,6	±	176,7	a	A	788,9	±	166,2	a	A	800,7	±	162,2	a	AB	646,8	±	100,7	a	A
	M2	804,1	±	220,7	a	A	685,5	±	110,7	a	A	602,1	±	164,3	a	A	650,4	±	213,2	a	A

(continúa)

Cuadro 7 (continuación)

		T1	DS		T2	DS		T3	DS		T4	DS	
	M3	1129,9	± 336,2	a A	1275,2	± 143,4	a A	1124,0	± 380,8	a AB	1097,9	± 121,2	a B
	M4	1117,2	± 346,4	a A	1070,0	± 297,2	a A	926,5	± 299,4	a AB	1000,4	± 168,2	a AB
	M5	1094,4	± 269,8	a A	1064,0	± 645,5	a A	1144,7	± 71,5	a B	948,5	± 286,3	a AB
P1	M1	98,4	± 17,7	a C	81,5	± 15,3	a A	79,5	± 16,0	a A	67,6	± 8,8	a A
	M2	83,6	± 4,6	a BC	86,1	± 6,9	a A	69,5	± 16,1	a A	70,8	± 16,0	a A
	M3	65,0	± 9,3	ab AB	75,9	± 5,8	bc A	80,8	± 1,6	c A	58,6	± 7,6	a A
	M4	52,5	± 19,1	a A	69,2	± 17,6	a A	63,2	± 16,6	a A	72,6	± 5,4	a A
	M5	73,5	± 12,0	a ABC	70,6	± 38,4	a A	75,9	± 5,1	a A	60,7	± 16,5	a A
GD1	M1	264,0	± 60,1	a A	226,1	± 62,1	a AB	229,6	± 52,1	a AB	161,7	± 24,8	a A
	M2	161,5	± 31,5	a A	188,4	± 19,6	a A	133,8	± 46,6	a A	147,5	± 29,8	a A
	M3	229,9	± 102,8	a A	319,9	± 42,7	a B	295,5	± 67,3	a B	199,9	± 41,0	a A
	M4	188,0	± 64,3	a A	227,8	± 92,6	a AB	169,1	± 54,7	a A	198,3	± 65,4	a A
	M5	224,4	± 27,7	a A	156,1	± 35,8	a A	227,8	± 5,7	a AB	209,5	± 83,0	a A
ECG	M1	192,3	± 41,4	a A	181,9	± 54,9	a A	186,2	± 36,1	a B	138,2	± 16,7	a A
	M2	123,8	± 25,0	a A	157,0	± 19,2	a A	123,0	± 40,1	a AB	125,2	± 25,4	a A
	M3	130,9	± 47,8	a A	171,5	± 25,6	a A	163,2	± 29,3	a AB	141,4	± 24,1	a A
	M4	138,0	± 35,8	a A	154,0	± 54,9	a A	105,4	± 35,1	a A	160,1	± 48,6	a A
	M5	143,0	± 12,5	a A	102,7	± 39,5	a A	143,4	± 11,5	a AB	125,6	± 36,8	a A
P2	M1	268,5	± 176,0	b B	69,7	± 31,2	ab AB	81,9	± 34,0	ab A	43,1	± 7,9	a A
	M2	57,8	± 26,9	a A	58,3	± 13,8	a A	68,4	± 51,9	a A	99,1	± 43,3	a AB
	M3	112,1	± 68,8	a AB	103,1	± 103,4	a AB	201,1	± 174,5	a A	120,9	± 54,8	a AB
	M4	186,2	± 54,4	a AB	183,8	± 53,5	a B	113,5	± 26,1	a A	199,5	± 70,6	a B
	M5	138,6	± 73,8	a AB	122,9	± 40,0	a AB	150,6	± 74,5	a A	80,1	± 44,3	a A
GD2	M1	71,1	± 11,4	a A	73,5	± 18,2	a A	76,6	± 7,7	a A	60,5	± 2,8	a A
	M2	65,7	± 3,7	a A	76,7	± 6,3	a A	66,0	± 11,0	a A	66,4	± 5,2	a A
	M3	63,0	± 12,1	a A	70,5	± 3,7	a A	72,7	± 5,6	a A	60,4	± 3,8	a A
	M4	66,1	± 8,7	a A	72,0	± 10,6	a A	60,3	± 7,9	a A	73,6	± 4,1	a A
	M5	68,9	± 7,7	a A	65,2	± 13,1	a A	70,6	± 2,4	a A	63,0	± 10,7	a A
P3	M1	93,4	± 14,7	b A	64,7	± 16,3	a A	71,2	± 9,4	ab A	85,6	± 9,8	ab A
	M2	77,2	± 36,9	a A	105,8	± 10,4	a A	78,6	± 24,7	a A	86,4	± 17,9	a A
	M3	64,3	± 15,3	a A	68,5	± 5,9	a A	55,8	± 15,7	a A	65,4	± 12,7	a A
	M4	60,2	± 25,6	a A	66,9	± 36,2	a A	63,7	± 19,5	a A	120,1	± 51,0	a A
	M5	71,9	± 10,7	a A	69,3	± 40,4	a A	82,5	± 6,2	a A	69,6	± 19,0	a A
GD3	M1	61,2	± 6,2	a A	51,0	± 20,1	a A	51,4	± 4,2	a A	43,7	± 2,6	a A
	M2	49,3	± 8,3	a A	58,5	± 1,6	a A	54,2	± 4,9	a AB	50,0	± 2,3	a A
	M3	53,0	± 10,6	a A	62,2	± 2,8	a A	61,4	± 4,4	a B	50,9	± 5,1	a A
	M4	55,8	± 6,2	ab A	57,1	± 4,8	ab A	50,0	± 4,9	a A	63,4	± 3,8	b B

(continúa)

Cuadro 7 (continuación)

	T1	DS		T2	DS		T3	DS		T4	DS	
M5	58,9 ±	7,6 a	A	51,0 ±	6,9 a	A	59,0 ±	4,1 a	AB	52,7 ±	7,7 a	A

Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada fecha de muestreo (según prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de muestreo para cada tratamiento ($p \leq 0,05$).

Cuadro 8. Grado de polimerización de taninos condensados en semillas durante el ensayo.

		T1	DS		T2	DS		T3	DS		T4	DS	
C-F (mg/g)	M1	392,8 ±	155,7 a	AB	388,8 ±	146,2 a	A	343,1 ±	49,6 a	A	NR		
	M2	246,0 ±	53,0 a	A	358,1 ±	148,2 a	A	284,1 ±	36,5 a	A	256,9 ±	31,3 a	A
	M3	489,5 ±	128,9 a	AB	433,4 ±	98,8 a	A	475,3 ±	172,4 a	A	494,9 ±	138,0 a	A
	M4	359,6 ±	75,5 a	A	360,0 ±	208,3 a	A	435,1 ±	68,5 a	A	543,8 ±	161,5 a	A
	M5	695,8 ±	248,8 a	B	731,6 ±	270,9 a	A	478,6 ±	103,4 a	A	516,7 ±	234,0 a	A
E-F (mg/g)	M1	1438,6 ±	710,4 a	A	1485,8 ±	598,9 a	A	1239,9 ±	227,4 a	A	NR		
	M2	678,1 ±	138,8 a	A	932,4 ±	275,3 a	A	804,0 ±	122,3 a	A	687,5 ±	63,2 a	A
	M3	1251,3 ±	375,1 a	A	1169,1 ±	188,5 a	A	1214,2 ±	319,8 a	A	816,7 ±	211,9 a	AB
	M4	1599,1 ±	380,1 a	A	1169,8 ±	611,3 a	A	1191,6 ±	336,0 a	A	1238,0 ±	388,1 a	B
	M5	1191,3 ±	407,1 a	A	1254,6 ±	473,3 a	A	908,0 ±	191,1 a	A	1082,5 ±	217,5 a	AB
C (mg/g)	M1	893,2 ±	464,4 a	A	730,5 ±	261,0 a	A	650,3 ±	98,7 a	AB	NR		
	M2	476,4 ±	59,0 a	A	528,8 ±	131,6 a	A	557,9 ±	47,7 a	A	503,6 ±	73,1 a	A
	M3	600,5 ±	103,1 a	A	739,2 ±	98,3 a	A	815,2 ±	132,7 a	B	600,9 ±	121,7 a	A
	M4	824,0 ±	87,5 b	A	526,2 ±	178,3 a	A	543,6 ±	55,7 a	A	686,6 ±	157,3 ab	A
	M5	835,2 ±	285,9 a	A	753,2 ±	207,6 a	A	696,1 ±	123,5 a	AB	728,1 ±	171,8 a	A
ECG-F (mg/g)	M1	716,5 ±	341,8 a	A	820,5 ±	338,2 a	A	661,7 ±	92,1 a	A	NR		
	M2	463,9 ±	131,2 a	A	694,0 ±	209,2 a	A	585,5 ±	102,7 a	A	470,1 ±	56,7 a	A
	M3	961,2 ±	301,6 a	A	895,7 ±	169,4 a	A	833,7 ±	220,5 a	A	590,3 ±	161,6 a	A
	M4	852,4 ±	107,9 a	A	624,0 ±	351,7 a	A	649,7 ±	71,0 a	A	769,2 ±	225,2 a	A
	M5	780,5 ±	338,5 a	A	850,6 ±	342,0 a	A	588,4 ±	139,1 a	A	650,6 ±	143,8 a	A
EC (mg/g)	M1	1244,4 ±	616,8 a	A	1044,2 ±	316,2 a	A	914,6 ±	157,4 a	A	NR		
	M2	925,6 ±	69,2 a	A	925,3 ±	182,9 a	A	1090,9 ±	134,1 a	AB	943,1 ±	144,2 a	A
	M3	1121,3 ±	153,4 a	A	1261,5 ±	173,1 a	A	1467,7 ±	333,0 a	B	974,6 ±	234,6 a	A
	M4	1340,7 ±	132,0 a	A	845,6 ±	292,4 a	A	1019,8 ±	38,6 a	A	1186,0 ±	511,4 a	A
	M5	1243,0 ±	465,0 a	A	1168,2 ±	318,0 a	A	1093,8 ±	200,7 a	AB	1239,7 ±	150,7 a	A
ECG (mg/g)	M1	1096,2 ±	529,9 a	A	1101,4 ±	487,9 a	A	943,2 ±	150,6 a	AB	NR		
	M2	749,5 ±	175,9 a	A	984,4 ±	220,1 a	A	951,9 ±	114,0 a	AB	797,2 ±	65,5 a	A
	M3	1231,6 ±	391,5 a	A	1229,1 ±	277,3 a	A	1227,3 ±	176,9 a	B	861,5 ±	172,5 a	A
	M4	1228,9 ±	167,4 a	A	926,5 ±	477,6 a	A	955,7 ±	123,1 a	AB	1183,5 ±	309,7 a	A
	M5	1095,8 ±	434,5 a	A	1218,8 ±	479,8 a	A	882,5 ±	200,9 a	A	993,4 ±	237,5 a	A
GPm	M1	2,7 ±	0,1 a	AB	3,1 ±	0,3 b	A	3,0 ±	0,0 ab	B	NR		
	M2	2,5 ±	0,3 a	A	3,0 ±	0,3 b	A	2,6 ±	0,1 ab	A	2,5 ±	0,1 a	A
	M3	3,3 ±	0,4 b	B	2,9 ±	0,3 ab	A	2,6 ±	0,1 a	A	2,8 ±	0,1 ab	AB
	M4	2,9 ±	0,2 a	AB	3,2 ±	0,6 a	A	3,1 ±	0,4 a	B	3,1 ±	0,3 a	B
	M5	2,8 ±	0,2 a	AB	3,0 ±	0,4 a	A	2,6 ±	0,1 a	A	2,6 ±	0,2 a	A
%G	M1	31,5 ±	0,6 a	A	33,9 ±	2,2 a	A	33,8 ±	0,5 a	AB	NR		
	M2	33,9 ±	3,8 a	AB	37,9 ±	3,4 a	A	35,9 ±	1,0 a	B	34,8 ±	1,6 a	AB

(continúa)

Cuadro 8 (continuación)

	T1	DS		T2	DS		T3	DS		T4	DS		
M3	38,3 ±	2,8 a	B	36,9 ±	2,9 a	A	34,4 ±	1,6 a	B	33,5 ±	0,4 a	AB	
M4	33,6 ±	2,8 a	AB	33,7 ±	4,0 a	A	33,5 ±	1,2 a	AB	35,1 ±	2,2 a	B	
M5	31,8 ±	2,1 a	A	33,9 ±	2,8 a	A	31,5 ±	1,3 a	A	31,5 ±	1,7 a	A	
PMm	M1	918,1 ±	24,3 a	A	1056,6 ±	118,4 b	A	1032,4 ±	9,8 ab	B	NR		
	M2	859,8 ±	114,1 a	A	1049,4 ±	120,3 b	A	888,5 ±	36,4 ab	A	868,6 ±	51,7 ab	A
	M3	1128,5 ±	135,8 b	B	989,3 ±	122,0 ab	A	898,6 ±	32,8 a	A	933,5 ±	11,8 ab	AB
	M4	973,8 ±	78,5 a	AB	1074,5 ±	198,8 a	A	1041,3 ±	114,3 a	B	1042,3 ±	92,0 a	B
	M5	949,8 ±	70,0 a	AB	1035,6 ±	132,1 a	A	871,9 ±	55,4 a	A	886,1 ±	48,6 a	A

Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para cada fecha de muestreo (según prueba de Tukey, $p \leq 0,05$). Letras mayúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas entre las fechas de muestreo para cada tratamiento ($p \leq 0,05$). NR: no realizado.