UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PROANTOCIANIDINAS EN PIELES DE BAYAS DE *Vitis vinifera* L. cv. Carménère.

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magister en Enología y Vitivinicultura.

FRANCISCA VALENTINA PALACIOS PERALTA

Director de Tesis
CLAUDIO PASTENES VILLARREAL
ELIAS OBREQUE SLIER

Profesores consejeros

Marcela Medel Maraboli
Remigio López Solís

SANTIAGO – CHILE
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PROANTOCIANIDINAS EN PIELES DE BAYAS DE *Vitis vinifera* L. cv. Carménère.

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Vitivinicultura y Enología

FRANCISCA VALENTINA PALACIOS PERALTA

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
DIRECTORES DE TESIS		
Claudio Pastenes Villarreal Ingeniero Agrónomo, Dr.	7,0	Aprobado
Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,7	Aprobado
PROFESORES CONSEJEROS		
Marcela Medel Ingeniera Agrónoma Enóloga, Dra.	6,8	Aprobado
Remigio López Bioquímico, Dr.	6,3	Aprobado

Santiago, Chile
2015

EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PROANTOCIANIDINAS EN PIELES DE BAYAS DE *Vitis vinifera* L. cv. Carménère.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Pienso en el largo camino recorrido para la realización de esta tesis y van a pareciendo todas las caras a las cuales me gustaría agradecer.

En primer lugar a mis profesores guías Claudio Pastenes y Elías Obreque por darme la oportunidad de trabajar con ellos y por brindarme siempre su apoyo y conocimientos.

A todo el laboratorio de fisiología del estrés en plantas, a los que aún son parte de él y también a los que partieron en busca de otros rumbos. En especial a Úrsula Arriagada, la que siempre estuvo presente para ayudarme en lo que fuera necesario, por sus gratas conversaciones y amistad. A Luis Villalobos por su buena voluntad en resolver mis dudas y su incondicional ayuda. A mis compañeros y amigos, Camila Ribalta, Felipe Reyes y Nicolás Ríos con los que compartí largos días de mediciones en el campo y en el laboratorio, gracias a ustedes el trabajo no se volvía pesado, siempre había buena conversación y risas, recordaré siempre con cariño aquellos días.

Finalmente dedico este trabajo a mi familia, en especial a mi abuelita Rafía, la que estando en vida me llenó de amor y siempre me incitó para que fuera una profesional. A mi madre Sandra por su incondicional amor y apoyo, a mi padre Carlos y a mis hermanos Carlos y Cristóbal, gracias a ustedes soy la persona que soy.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA 1
Revisión bibliográfica 2
Polifenoles: definición, clasificación y síntesis 2
Efecto del déficit hídrico sobre la composición fenólica 5
Literatura citada 7
CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO 10
Resumen 11
Abstract 12
Introducción 13
Hipótesis 14
Objetivo 14
Materiales y métodos 15
Lugar de trabajo 15
Material vegetal 15
Diseño experimental y tratamientos 15
Manejo del experimento 15
Evaluaciones 16
Análisis estadístico 22
Resultados 23
Evolución del potencial hídrico xilemático de medio día 23
Análisis básicos 25
Análisis fenólicos 27
Discusión 33
Potenciales xilemáticos 33
Análisis básicos 33
Análisis fenólicos 34
Conclusiones 37
Referencias 38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de flavanoles 3
Figura 2. Esquema simplificado de la biosíntesis de flavanoles..... 4
Figura 3. (A) Estructura generalizada de las proantocianidinas en bayas de Vitis vinifera L. (B) Mecanismo de reacción hipotético que explica la catálisis ácida de las proantocianidinas. Floroglucinol actuaría como nucleófilo..... 19
Figura 4. Esquema de fraccionamiento de taninos. 21
Figura 5. Evolución del potencial hídrico xilemático (A), riego acumulado (B) y evapotranspiración de cultivo (C) durante la temporada 24
Figura 6. Evolución del peso promedio por baya (A) y peso promedio de piel (B). 25
Figura 7. Evolución de sólidos solubles (A), pH (B) y acidez total (C) 26
Figura 8. Evolución de la concentración de antocianos (A) totales, fenoles totales (B) y taninos totales (C) de piel..... 28
Figura 9. Evolución de las fracciones mono (A), oligo (B) y polimérica (C) de pieles 30
Figura 10. Evolución en el grado medio de polimerización (mDP) (A) y del peso molecular medio (B) de proantocianidinas. 31
Figura 11. Evolución del grado de galoilación de proantocianidinas 31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Condiciones de gradiente utilizadas en el análisis floroglucinólisis..... 17
Cuadro 2. Porcentaje de las unidades de extensión y terminales de las proantocianidinas de la piel de bayas aisladas mediante floroglucinólisis por tratamiento en las distintas fechas de muestreo 32

CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA

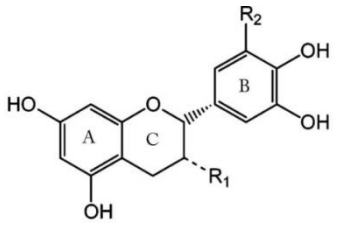
EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PROANTOCIANIDINAS EN PIELES DE BAYAS DE *Vitis vinifera* L. cv. Carménère.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Polifenoles: definición, clasificación y síntesis

Los polifenoles corresponden a metabolitos secundarios que participan en las principales características organolépticas de los vinos. Químicamente, estos compuestos contienen un anillo bencénico sustituido por a lo menos un grupo hidroxilo como base. Los polifenoles se clasifican en dos grandes grupos: los no flavonoides (ácidos hidroxicinámicos, ácidos benzoicos y estilbenos) (Waterhouse, 2002) y los compuestos flavonoides (antocianos, flavonoles y proantocianidinas) (Haslam, 1998).

Las proantocianidinas constituyen uno de los grupos más abundantes en el vino y bayas, participando en las características organolépticas de astringencia, amargor y en fenómenos de copigmentación (Kennedy *et al*., 2006). Estos flavonoides se ubican en vacuolas presentes en semillas, hollejos y raquis de los racimos, pudiendo estar en forma de monómeros, oligómeros o polímeros, por lo cual son también llamados taninos condensados. Las proantocianidinas poseen la propiedad de transformarse en antocianidinas al encontrarse en un medio fuertemente ácido. Así, se distinguen dos grupos dependiendo del tipo de antocianidina capaces de formar: las procianidinas compuestas por los monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina y las prodelfinidinas donde se encuentran la (-)-epigalocatequina y (-)-galocatequina (Figura 1) (Monagas *et al*., 2005). Sumado a lo anterior, se encuentran los flavanoles esterificados con ácido gálico, llamados taninos galoilados (Gawel, 1998).



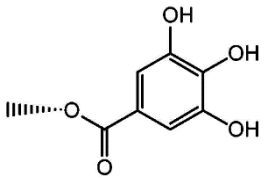
Monómeros de Flavan-3-ol	R_1	R_2
(+)-catequina	OH	H
(-)-epicatequina	OH	H
(-)-epigalocatequina	OH	OH
(-)-epicatequina-3-*O*-galato		H

Figura 1. Estructura de flavanoles (Cortell y Kennedy, 2006).

La ruta de síntesis de los fenilpropanoides (Figura 2), se inicia con la formación del aminoácido fenilalanina que proviene de la ruta del ácido shikimico. La primera enzima que participa en la síntesis fenólica es la fenil amonio liasa, responsable de convertir a la fenilalanina en ácido cinámico. Este último, luego de una serie de reacciones, produce p-cumaril-CoA que sumando a la adición de tres moléculas de manolil-CoA, dan origen al intermediario trihidroxichalcona, catalizado por la enzima chalcona sintasa (Conde *et al*., 2007; Heller y Forkmann, 1993). A partir de este compuesto, y tras la ocurrencia de otras reacciones, se generan los dehidroflavonoles que serán el sustrato para la síntesis de flavonoles, y el intermediario biosintético para la formación de flavanoles y antocianos (Heller y Forkmann, 1993). Las enzimas que participan en la formación de los flavan-3-oles son la leucoantocianidina reductasa que convierte la leucoantocianidina en catequina y la antocianidina reductasa que trasforma la cianidina en epicatequina (Kennedy, 2007). Las proantocianidinas resultan de la unión de uno de estos dos compuestos a una unidad de extensión que corresponde a una forma activada de leucocianidina formándose un dímero, luego a este último se van a agregando más unidades de extensión formándose así una cadena (Kennedy, 2007).

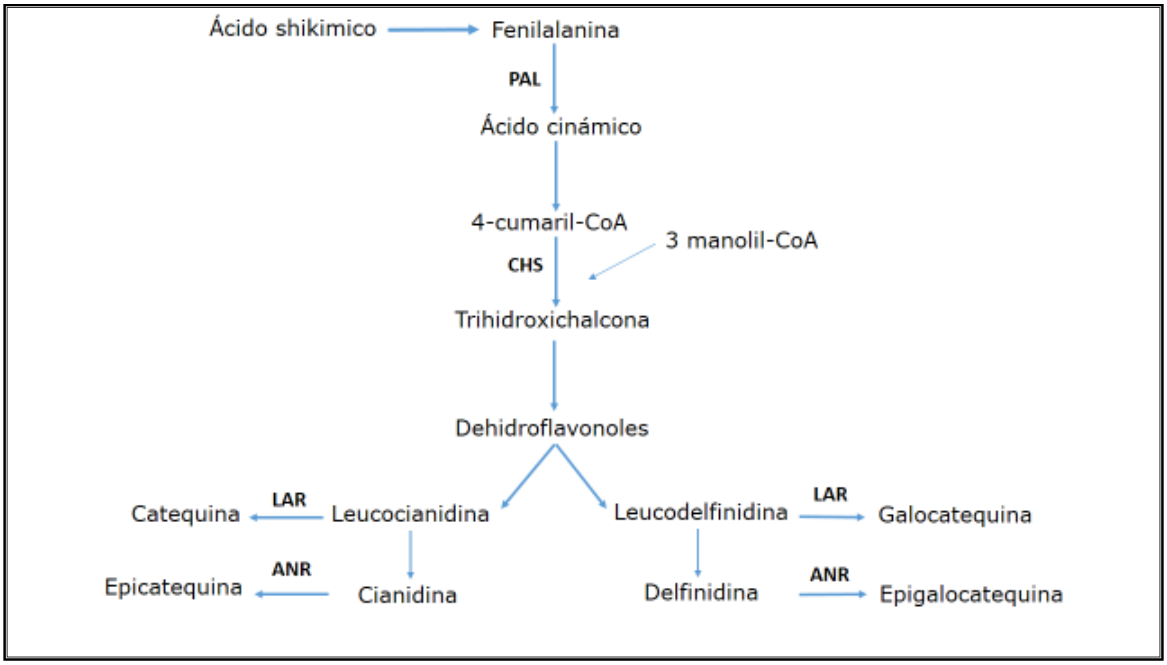


Figura 2. Esquema simplificado de la biosíntesis de flavanoles. PAL: fenilalanina amonio liasa, CHS: chalconasintasa, LAR: leucoantocianidinareductasa, ANR: antocianidinareductasa (Elaboración propia).

La biosíntesis de proantocianidinas en la piel de las bayas ocurre temprano en la temporada en la floración, para luego detenerse un poco antes de envero, en donde se ha observado que la activación de los genes que codifican para las enzimas LAR y ANR declina a bajos niveles (Downey *et al.*, 2003). En las semillas la síntesis puede continuar hasta una o dos semanas después de envero (Kennedy, 2007). Sin embargo, en estudios realizados por Galaz (2010), se observó una nueva síntesis de estos compuestos en hollejo a partir de aproximadamente 40 días después de pinta.

Durante el desarrollo y maduración de la baya, las proantocianidinas se van polimerizando y su grado de galoilación va disminuyendo, lo cual afectaría su grado de astringencia y amargor. Se ha establecido que las proantocianidinas con un grado medio de polimerización cercano a 10 serían más astringentes, mientras que las cercanas a 4 unidades serían más amargas (Peña, 2006).

Por otro lado, se ha observado que diversos factores ambientales afectan la concentración y composición de las proantocianidinas en las bayas, tales como las características del suelo, luz, manejos vitícolas, estado nutricional y la disposición de agua (Downey *et al.*, 2006). Este último, es uno de los factores que se ha relacionado estrechamente con el aumento de los compuestos fenólicos en las bayas (Mathews *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2002).

Efecto del déficit hídrico sobre la composición fenólica

Un déficit hídrico ocurre cuando la tasa de transpiración de las plantas excede la captación de agua (Bray, 1997). Este déficit puede llegar a producir un estrés hídrico en la planta, que se define como un cambio en las condiciones hídricas que influye de manera adversa en el crecimiento y/o desarrollo de las plantas, teniendo una serie de respuestas fisiológicas como el cierre estomático, reducción de fotosíntesis, menor división celular, etc. (Salisbury y Ross,1995) Una forma de evaluar el efecto de este estrés, es mediante la medición del potencial xilemático de la planta, el cual considera valores de potenciales entre -0,6 MPa y -0,9 MPa como un estado de estrés leve (Van Leeuwen *et al*., 2009), mientras que de -1,1 MPa a -1,4 MPa son considerados como un estrés moderado a severo (Van Leeuwen *et al*., 2009).

El aumento en el contenido de flavonoides en las bayas de vid, por efecto de un estrés hídrico, se ha asociado en primera instancia a la disminución en el tamaño de las bayas, ya que aumentaría la relación entre piel y pulpa, produciéndose una concentración de estos compuestos. Por otra parte, un estrés generaría la producción de ABA, responsable del cierre estomático y de procesos de maduración de la fruta (Antolin *et al.*, 2008). Esta hormona actúa como mediador en la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en la biosíntesis de compuestos fenólicos, generando una mayor producción de ellos bajo una condición de déficit hídrico (Gambetta *et al*., 2010). Sin embargo, autores como Robby *et al*., (2004) postulan las proantocianidinas serían más sensibles a aumentos debido a un menor tamaño de baya que por un efecto directo sobre la biosíntesis.

Por otra parte, Chalmers (2007) observó que la concentración final de los taninos totales en los hollejos aumentó significativamente, lo cual se relacionaría con la influencia del estrés hídrico sobre la biosíntesis de estos compuestos entre floración y envero.Del mismo modo, Ojeda *et al.* (2002), observó que un estrés provocado post-envero provocó un aumento en la biosíntesis de proantocianidinas en hollejos. Asimismo, se ha observado que en plantas de Cabernet Sauvignon sometidas a un mínimo riego, se incrementa la concentración de proantocianidinas de la piel y se obtiene un mayor grado de polimerización que los hollejos de uvas de plantas bajo una condición de mayor riego (Kennedy *et al.*, 2002). Por otra parte, Ollé *et al*. (2011), observaron un aumento en el contenido total de proantocianidinas en plantas de vid sometidas a un estrés hídrico antes de envero, en comparación a plantas sometidas a un estrés después de envero. En cuanto al grado medio de polimerización, estos autores observaron que los hollejos provenientes del tratamiento con un estrés antes de envero, presentó un mayor grado de polimerización al final de la temporada, seguido por el tratamiento luego de envero con respecto a un control.

A partir de lo anterior, se observa que el estrés hídrico afecta la concentración de proantocianidinas en los hollejos de uvas de *Vitis vinifera* L. Sin embargo, limitada información existe acerca del déficit hídrico sobre la composición de las proantocianidinas. Más aún, no existen estudios que utilicen como modelo de estudio la variedad Carménère, cepa emblemática chilena. Por lo tanto, el conocimiento relativo del riego deficitario controlado y su impacto sobre la concentración y composición de proantocianidinas de bayas podría ser de gran valor para la toma de decisiones de manejos vitivinícolas de riego en la industria del vino en Chile y el mundo.

LITERATURA CITADA

Antolín, M.C.; H. Santesteban; E. Santa Maria; J. Aguirreolea and M. Sanchez-Diaz. 2008. Involvement of abscisic acid and polyamines in berry ripening of *Vitis vinifera* (L.) subjected to water deficit irrigation. Australian Journal.of Grape and Wine Research, 14:123-133.

Bray, E. Plant responses to water deficit. 1997. Trends in plant science, 2: 48-54.

Chalmers, Y. 2007. Influence by sustained deficit irrigation on physiology and phenolic compounds on winegrapes and wine. Doctor of Philosophy. School of Agriculture and Discipline of Wine and Horticulture, University of Adelaide. 172 p.

Conde C.; P. Silva; N. Fontes; A.C.P. Dias; R.M. Tavares; M.J. Sousa; A. Agasse; S. Delrot and H. Gerós, 2007. A. Review: Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. Global Science Books, 1:12-15.

Cortell, J. and Kennedy, J. 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (Vitis vinifera L.) Pinot Noir fruit and extraction in a model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 8510-8520.

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

Downey, M.; N. Dokoozlian and M. 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): 257-268.

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 ingeniera agrónoma y grado en magister en enología y vitivinicultura. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 79 p.

Gambetta GA; M.A. Matthews; T.H. Shaghasi; A.J. McElrone and S.D Castellarin. 2010. Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. Planta, 232: 219–234.

Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. Australian Journal of Grape and Wine Research, 4: 74-95.

Haslam, E. 1998. Practical poliphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. United Kingdom. Univerity of Cambridge. 412 p.

Heller, W. and Forkmann, G. 1993. Byosinthesis of flavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed). The flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall. Londres, Inglaterra, 499-536.

Kennedy, J.; M. Matthews and A. Waterhouse. 2000. Changes in grape seed polyphenols during ripening. Phytochemistry, 55:7-85.

Kennedy, J.; M. Matthews and A. Waterhouse. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. American Journal of Enology and Viticulture, *53*(4): 268-274.

Kennedy, J.; C. Sucier and Y. Glories. 2006. Grape and wine phenolics: History and perspective. American Society for Enology and Viticulture, 57:3.

Kennedy, J. 2007. Grape and Wine Tannins: Production, perfection, perception. [En línea]. Practical Winery and Vineyard. Recuperado en: < http://www.researchgate.net/publication/257198597_Grape_and_Wine_Tannins_Production_Perfection_Perception >. Consultado el: 10 de Abril 2015.

Matthews, M.A.; R. Ishii; M.M. Anderson and O'Mahony, M. 1990. Dependence of wine sensory attributes on vine water status. Journal of the Science of Food and Agriculture, 51:321–335.

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.

Ojeda, H.; C. Andary; E. Kraeva; 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* cv. Shiraz. American Journal of Enology and Viticulture, 53(4): 261-267.

Ollé, D; J. Guiraud; J. Souquet; N. Terrier; A. Ageorges; V. Cheynier and C. Verries. 2011. Effect of pre- and post- veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin acumulation during Shiraz berry development. Australian Journal of Grape and Wine Research 17: 90-100.

Peña-Neira, A. 2006. En la calidad de uvas y vinos: Los taninos y su importancia. Revista Vendimia (Abril): 18-20.

Roby G., J. Harbeston, D. Adams and M. Matthews. 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. Australian Journal of Grape and Wine Research, 10:100–107.

Salisburri, F y Roos, C.1995. Fisiología de las plantas. Editorial paraninfo. Madrid. España. 993p.

Van Leeuwen, C., O. Tregoat, X. Choné, B. Bois, D. Pernet and J-P. Gaudillère. 2009. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How

can it be assessed for vineyard management purposes? Journal international des sciences de la vigne et du vin 43: 121–134.

Waterhouse, A. 2002. Wine phenolics. Annals of New York Academy of Science, 957: 21-36.

CAPÍTULO II: ARTÍCULO CIENTÍFICO

EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA CONCENTRACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PROANTOCIANIDINAS EN PIELES DE BAYAS DE *Vitis vinifera* L. cv. Carménère.

RESUMEN

Las proantocianidinas corresponden a polifenoles de alta relevancia en las características organolépticas de los vinos, pues participan en las propiedades de astringencia, amargor y copigmentación. Se ha descrito que diversos factores ambientales y manejos culturales afectan la biosíntesis de estos compuestos en las bayas de uva. Así, se ha demostrado que la disponibilidad de agua afecta la concentración de proantocianidinas en los hollejos de las bayas. Sin embargo, limitada información existe acerca del efecto de la disponibilidad hídrica sobre la composición de proantocianidinas y no existe ningún estudio realizado con la cepa Carménère. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de distintos niveles de déficit hídrico sobre la composición de las proantocianidinas durante la maduración de pieles de bayas de Carménère. Los tratamientos de distintos regímenes de riego aplicados a las plantas fueron (T1) 0,8 mm h^{-1}; (T2) 1,6 mm h^{-1}; (T3) 3,2 mm h^{-1}; (T4) 4,8 mm h^{-1}, mientras que los potenciales xilemáticos promedio fueron -1,1MPa (± 0,04), -1,0 MPa (± 0,05), -0,9MPa (±0,06) y -0,83MPa (± 0,05) respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el peso de baya y hollejo, así como tampoco en los valores de taninos totales, grado medio de polimerización y porcentaje de galoilación. No obstante, diferencias en la concentración de las fracciones oligo y poliméricas fueron reportadas entre los distintos tratamientos, mientras que el porcentaje de (-)-epicatequina-3-*O*-galato varió puntualmente entre los tratamientos durante el estudio. En conclusión, la disponibilidad hídrica afecta ciertos parámetros de la composición de proantocianidinas de piel presentes en uva vinífera.

Palabras claves: Estrés hídrico, Potencial xilemático, Taninos condensados.

ABSTRACT

Proanthocyanidins are polyphenols of high relevance for the wine organoleptics characteristics, being that they partipate on astringency, bitterness and copigmentation properties. It has been described that environmental factors and cultural practices affect the biosynthesis of these compounds in the grape of vines. This way it has been shown that the water availability affect the proanthocyanidins concentration of berry skin. Nevertheless, the information about how the water stress affect the proanthocyanidin composition is limited and there is not data about Carménère strain. This investigation's purpose is to determine the effect of differents levels of water déficit on the proanthocyanidins's skin composition during berries ripening. The differents treatments of irrigation regimes applied to the vines where (T1) 0,8 mm h-1; (T2) 1,6 mm h-1; (T3) 3,2 mm h-1; (T4) 4,8 mm h-1, and the mean xylem potential where -1,1MPa (±0,04), -1,0 MPa (± 0,05), -0,9MPa (±0,06) y -0,83MPa (± 0,05), respectively. Non significant differences where found about berry weight and the skin weight. Neither was there differences on total tannins, mean degree of polymerization and galloylation percentage. However, differences on the concentration of oligomeric and polimeric fractions were reported between treatments. The (-)-epicatechin-3-O-gallate percentage various promptly between treatments during the study. In conclusion, the water availability affects the composition of the skin of some proanthocyanidins in wine grapes.

Key words: Water stress, Xylem potential, Condense tannins.

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles corresponden a metabolitos secundarios de las bayas y participan en importantes propiedades organolépticas de los alimentos (Cheynier *et al*., 1997, 2006; Vidal *et al*., 2003; Kennedy *et al*., 2006). Los dos grupos de polifenoles con mayor presencia tanto en bayas como en el vino corresponden a antocianos y proantocianidinas o taninos condensados (Mattivi *et al*., 2002). Estos últimos han sido considerados de alta relevancia, por su aporte en la astringencia y amargor del vino (Conde *et al*., 2007). Además, se ha descrito que estos compuestos serían responsables de la estabilidad del color en vinos tintos debido a su interacción con los antocianos (Kennedy *et al.*, 2006).

El metabolismo y biosíntesis de estos compuestos en las bayas se ve afectada por factores ambientales como la luz, temperatura, y por manejos culturales (Downey *et al*., 2004). Dentro de los manejos culturales, uno de los más utilizados a nivel global para la producción de vino de calidad es la restricción hídrica en las vides (Mathews *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2002; Acevedo *et al*., 2010). Este manejo se basa en la aplicación de una cantidad de agua menor a la demandada por la planta, produciendo bayas más pequeñas con una mayor relación piel *versus* pulpa. Además, se ha observado que algunas fitohormonas, como el ácido absísico, generaría una mayor actividad de la ruta fenilpropanoide, promoviendo su acumulación (Castellarin *et al*., 2007; Deluc *et al*., 2009; Lovisolo *et al*., 2010).

Diversos estudios han evaluado el efecto del estrés hídrico sobre el metabolismo secundario en distintas variedades de vid, especialmente a aquel asociado a las proantocianidinas. En Merlot, se ha observado un aumento de proantocianidinas al momento de cosecha para el tratamiento de mayor restricción (Buchetti *et al*., 2011). De la misma manera, Ollé *et al.*, (2011) obtuvo mayores contenidos de proantocianidinas en algunos momentos de la maduración de la baya con un estrés en post-envero con respecto al control en la cepa Syrah, así como también se han observado aumentos en los flavanoles totales al momento de cosecha en tratamientos severos de déficit (Ollé *et al*.; 2011). En relación a las características químicas de estas proantocianidinas, se ha visto un menor grado medio de polimerización de proantocianidinas en bayas con mayor riego a lo largo del crecimiento y desarrollo de las bayas, pero sin diferencias al momento de cosecha (Kennedy *et al.*, 2002). Autores como Deluc *et al*., (2009) y Castellarin *et al.* (2007) han confirmado el efecto que tiene un estrés hídrico sobre el aumento en la expresión de genes que participan en la vía metabólica de antocianos y proantocianidinas en variedades como Cabernet sauvignon y Chardonnay. Sin embargo, no existen estudios que utilicen como modelo a la variedad Carménère, cepa emblemática de Chile. En Chile, esta variedad permaneció confundida con Merlot y Cabernet Franc debido a sus similitudes ampelográficas (Fernández *et al*., 2007). Actualmente, Chile es el país con mayor extensión territorial de esta variedad, con un total de 10.700 Ha plantadas (SAG, 2013). Algunos estudios han reportado importantes diferencias fenólicas de esta variedad con respecto a Cabernet Sauvignon, Merlot y Cabernet Franc (Obreque *et al*., 2010; Obreque *et al*., 2012).

A partir de lo anteriormente descrito, es posible visualizar que las proantocianidinas corresponden a polifenoles de alta relevancia en la producción de vinos. Sin embargo, no

existen reportes acerca del efecto del estrés hídrico sobre la composición de estos compuestos en las uvas de la variedad emblemática chilena Carménère. Asimismo y a pesar que la mayoría de las investigaciones previas reportan cambios en la concentración de las proantocianidinas, limitadas investigaciones han estudiado el efecto del déficit hídrico sobre la composición de las proantocianidinas de las pieles de las bayas.

HIPÓTESIS

Un mayor nivel de déficit hídrico aumenta la concentración y el grado medio de polimerización de proantocianidinas en pieles de bayas de *Vitis vinifera* L. cv. Carménère.

OBJETIVO

Determinar el efecto de distintos niveles de déficit hídrico sobre la concentración y composición química de proantocianidinas en pieles de bayas de vid cv. Carménère.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo

El ensayo se realizó durante la temporada 2011-2012, en la viña Haras de Pirque, ubicada en la región vitivinícola del Maipo, comuna de Pirque, Región Metropolitana, Chile (33º 41' latitud Sur y 70º 37' longitud Oeste). Los análisis se realizaron en el laboratorio de Fisiología del Estrés en Plantas del Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Material vegetal

Para la realización del estudio se usaron bayas provenientes de vides (*Vitis vinifera* L. cv. Carménère) de aproximadamente 13 años de edad, conducidas en espaldera simple sobre pie franco, con riego por goteo, con un marco de plantación de 2 m entre hilera y 1 m sobre hilera, orientadas en dirección Norte-Sur.

Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental del ensayo se realizó en bloques completamente aleatorizados, con 4 tratamientos y 5 repeticiones. Cada bloque correspondió a una repetición y cada uno constó con 20 plantas seleccionadas, 5 plantas para cada tratamiento. La unidad experimental correspondió a cinco plantas, de las cuales se obtuvieron las muestras compuestas con 50 bayas.

El experimento constó de 4 tratamientos, que correspondieron a distintos regímenes de riego aplicados mediante riego por goteo, utilizando una combinación de goteros de distinto gasto, correspondientes a: (T1) 0,8 mm h^{-1}; (T2) 1,6 mm h^{-1}; (T3) 3,2 mm h^{-1}; (T4) 4,8 mm h^{-1}.

Manejo del experimento

La aplicación de los diferentes tratamientos se realizó mediante riego por goteo, el cual fue instalado independientemente del sistema de riego que poseía la viña. Previo a la aplicación de los tratamientos, se suprimió el riego hasta llegar a un potencial xilemático similar en el total de las plantas (-1,2 MPa) y se realizaron calicatas para asegurar que no existiera traslape de raíces entre las hileras. Los tratamientos de riego se aplicaron en el periodo de tiempo comprendido entre dos semanas antes de pinta y cosecha. Los riegos se realizaron de manera de mantener las plantas de T4 con potenciales hídricos xilemáticos de medio día en valores cercanos a -0,8 MPa. Para esto, los momentos de riego y la duración del mismo, dependieron de los niveles de evaporación de bandeja y los valores de potencial hídrico que fueron medidos semanalmente.

La recolección de muestras para análisis en laboratorio fue manual y constó de 50 bayas tomadas aleatoriamente desde los racimos de las cinco plantas que totalizan cada repetición, las que fueron inmediatamente almacenadas para su posterior análisis en laboratorio. Las muestras fueron recolectadas a los 15 días antes de pinta y 3, 20, 36, 50 y 64 días después de pinta.

Evaluaciones

Se midió el estatus hídrico de la planta mediante la utilización de una cámara de presión, tipo Scholander (Scholander *et al*., 1965), con la cual se determinó el potencial xilemático de la planta. Este procedimiento se realizó al medio día al menos una vez por semana. Las hojas evaluadas fueron cubiertas una hora antes de la medición, con bolsas plásticas aluminizadas (PSM Instrument, USA).

La Evapotranspiración del cultivo (ETc) fue estimada usando el método de la bandeja evaporativa (Allen *et al*., 2006). La ET_0 fue obtenida usando los datos de evaporación diaria de la Viña Haras de Pirque corregidos por un coeficiente de bandeja (kb= 0,8). Tanto ETc como ET_0 fueron expresados en mm d^{-1}. Los valores de coeficiente de cultivo (kc) usados fueron 0,55, 0,30, 0,20 y 0,20 para enero, febrero, marzo y abril, respectivamente. Estos valores son comúnmente usados en cepas tintas en el valle del Maipo (Acevedo *et al*., 2010). La ETc se calculó como el producto de kc y ET_0.

Análisis básicos

Las bayas recolectadas en cada muestreo fueron almacenadas en frío y posteriormente se midió su peso. Además, se separó el hollejo de la pulpa y semillas, los cuales fueron secados con papel absorbente, pesados y guardados a -20° C para su posterior análisis.

Sólidos solubles: la concentración de sólidos solubles se obtuvo utilizando un refractómetro manual Arquimed, ajustando el cero con agua destilada (OIV, 2011).

Acidez total: la determinación de la acidez total se efectuó por titulación con NaOH 0,1 N utilizando fenoftaleína como indicador (OIV, 2011).

pH: el valor del pH se midió con un potenciómetro Hanna modelo pH 21 (OIV, 2011)

Análisis fenólicos

Para la extracción de los compuestos fenólicos se utilizó el método de Venencie *et al.* (1997). El procedimiento consistió en adicionar a hollejos provenientes de 50 bayas 20 mL de medio vínico (solución acuosa de etanol al 10% v/v con 5 g L^{-1} de ácido tartárico), ajustar el pH a 3,6 y luego se agregó agua destilada hasta un peso de 100 g. La mezcla se maceró a temperatura ambiente (20°C) durante 2 h con agitación constante. Transcurrido este tiempo,

se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos y posteriormente se filtró (filtro Millipore de 0,45 µm).

Fenoles totales: los compuestos fenólicos totales se determinaron mediante el método de Glories (1984).

Antocianos totales: la determinación de antocianos totales se realizó mediante la decoloración con bisulfito sódico (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965).

Taninos totales: los taninos totales se determinaron mediante la reacción de Bate-Smith (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1966).

Catálisis ácida en presencia de floroglucinol. El grado medio de polimerización de los taninos se determinó mediante una catálisis ácida en presencia de floroglucinol (Figura 3) (Kennedy y Jones, 2001b). Para aislar los polímeros de flavan-3-oles de cada extracto de hollejo se utilizó la columna Toyopearl HW-40F. El procedimiento consistió en realizar un lavado con 20 mL de una solución acuosa de etanol al 55% v/v con 0,05% v/v de ácido trifluoroacético, luego colocar 7,5 mL del extracto de hollejo y en seguida, eluir los antocianos, monómeros y oligómeros flavan-3-oles, con 50 mL de la solución descrita anteriormente. La fracción polimérica se obtuvo con la elución de 30 mL de una solución de acetona al 60% v/v en agua destilada. Los polímeros de flavan-3-oles aislados se concentraron bajo vacío a 30 °C. Luego, se disolvieron en 250 µL de metanol y se mezclaron con el mismo volumen de una solución 0,1 N de HCl en metanol que contenía 50 g L^{-1} de floroglucinol y 10 g L^{-1} de ácido ascórbico. Las proantocianidinas y el floroglucionol fueron colocados a 50 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se agregó 250 µL de acetato de sodio 200 mM en agua para detener la reacción. Por último, la muestra se centrifugó a 11500 rpm por 15 minutos y se filtró con membranas Millipore de 0,22 µm.

Los productos de la reacción fueron analizados en un cromatógrafo líquido Agilent modelo 1200, el cual consta de una bomba modelo G1311A, un inyector automático modelo G1329A, un detector de arreglo de fotodiodos modelo G1315B y una columna Waters Nova Pak C_{18} (tamaño de partícula 4 µm, 300 x 3,9 mm). El volumen de inyección fue de 50 µL. Se utilizó una gradiente binaria que consistió en una solución acuosa de ácido acético al 1% v/v (solvente A) y metanol (solvente B) (Cuadro 1). Los picos eluidos fueron monitoreados a 280 nm.

Cuadro 1. Condiciones de gradiente utilizadas en el análisis floroglucinólisis.

Tiempo	Solvente (mL L^{-1})	
min	A	B
0,0	950	50
10,0	950	50
30,0	800	200
55,0	600	400

Los diferentes compuestos fueron identificados según sus espectros de absorción y comparando los tiempos de retención con los indicados en la literatura. La cuantificación se realizó utilizando los siguientes estándares externos: EGC (Epigalocatequina) para EGC-unida a floroglucinol (EGC-F), C (Catequina) para C y C-unida a floroglucinol (C-F), EC (Epicatequina) para EC-unida a floroglucinol (EC-F) y EC-3-*O*-G (Epigalocatequina-3-O-galato) para EC-3-*O*-G- unida a floroglucinol (EC-3-*O*-G-F).

El grado medio de polimerización, el porcentaje de galoilación (%G) y el porcentaje de cada subunidad fueron calculados como el índice molar de las unidades totales (unidades de extensión más las unidades terminales) con respecto a las unidades terminales, el índice molar de las unidades galoiladas con respecto a las unidades totales y el índice molar de cada subunidad con respecto a las subunidades totales, respectivamente.

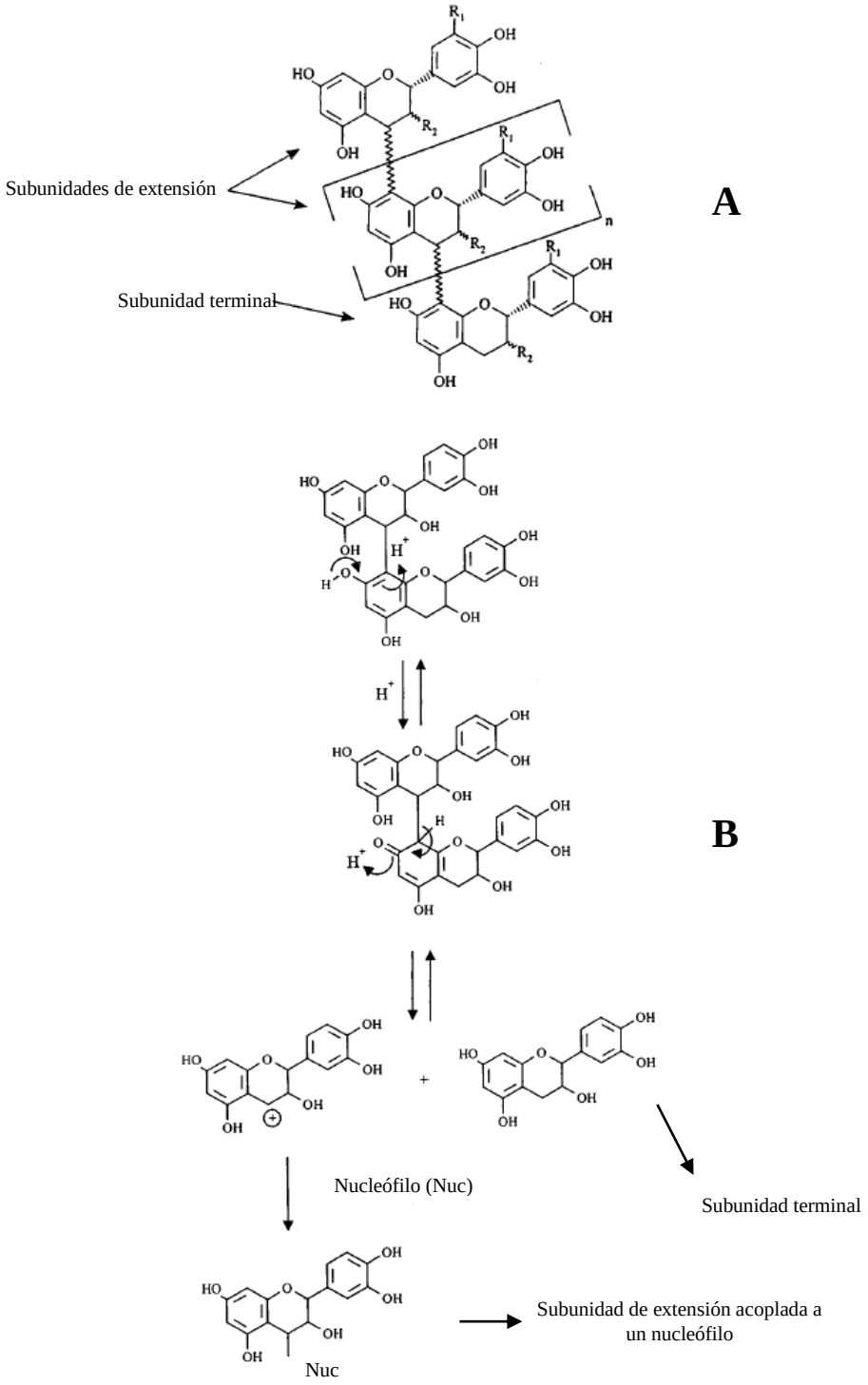


Figura 3. (A) Estructura generalizada de las proantocianidinas en bayas de *Vitis vinifera* L. (B) Mecanismo de reacción hipotético que explica la catálisis ácida de las proantocianidinas. Floroglucinol actuaría como nucleófilo (Kennedy y Jones, 2001b).

Fraccionamiento de taninos. La separación de los taninos se realizó mediante cartuchos Waters Sep-Pak C_{18} (Figura 4) (Monagas *et al*., 2003). El extracto de hollejo (8 mL) se concentró hasta sequedad en un rotavapor a 30 °C y luego, se restituyó en 20 mL de tampón fosfato pH 7,0. Cuando fue necesario, se ajustó el pH a 7,0 con soluciones de NaOH o HCl. Dos cartuchos Sep-Pak C_{18} conectados en serie (en la parte superior se colocó un cartucho Waters Sep-Pak Plus tC_{18} Environmental y en la parte inferior un Waters Sep-Pak Plus Short tC_{18}) fueron condicionados con 10 mL de metanol, 20 mL de agua destilada y 10 mL de tampón fosfato pH 7,0. A continuación, se pasaron las muestras a través de los cartuchos e inmediatamente, los ácidos fenólicos se eliminaron por elución con 10 mL de tampón fosfato pH 7,0 al 12,5 % v/v en agua destilada. Después de secar los cartuchos durante dos horas con N_2, la elución de los monómeros y oligómeros flavan-3-oles (fracciones FI y FII, respectivamente) se llevó a cabo con 25 mL de acetato de etilo, seguida por la elución de las proantocianidinas poliméricas (fracción FIII) con 15 mL de metanol. Para separar las fracciones I y II, el acetato de etilo se evaporó en un rotavapor a 30 °C, se restituyó en 3-30 mL de tampón fosfato pH 7,0 y finalmente se redepositó en la misma serie de cartuchos precondicionada como se describió arriba. Éstos nuevamente se secaron con N_2 durante 1½ h, y los monómeros se separaron de los oligómeros por elución secuencial con 25 mL de éter dietílico (FI) y 15 mL de metanol (FII). Las tres fracciones fueron concentradas hasta sequedad en un rotavapor a 30 °C y redisueltas en 3-5 mL de metanol. El contenido total de cada fracción se determinó mediante el ensayo de la vainillina.

Ensayo de la vainillina. La concentración de las fracciones obtenidas (FI, FII y FIII) se determinó según el método descrito por Sun *et al*. (1998b). A 1 mL de la muestra se le adicionó 2,5 mL de H_2SO_4 al 25% v/v en metanol y 2,5 mL de vainillina al 1% p/v en metanol. Se preparó simultáneamente un blanco de la misma forma, pero sustituyendo la vainillina al 1% p/v en metanol por metanol puro. En el caso de FI la absorbancia a 500 nm se midió después de un tiempo de reacción de 15 minutos a 30 °C. Para las fracciones FII y FIII, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y la lectura se realizó hasta que la máxima absorbancia a 500 nm fuera alcanzada. Todas las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro UV-vis Jasco modelo V-530.

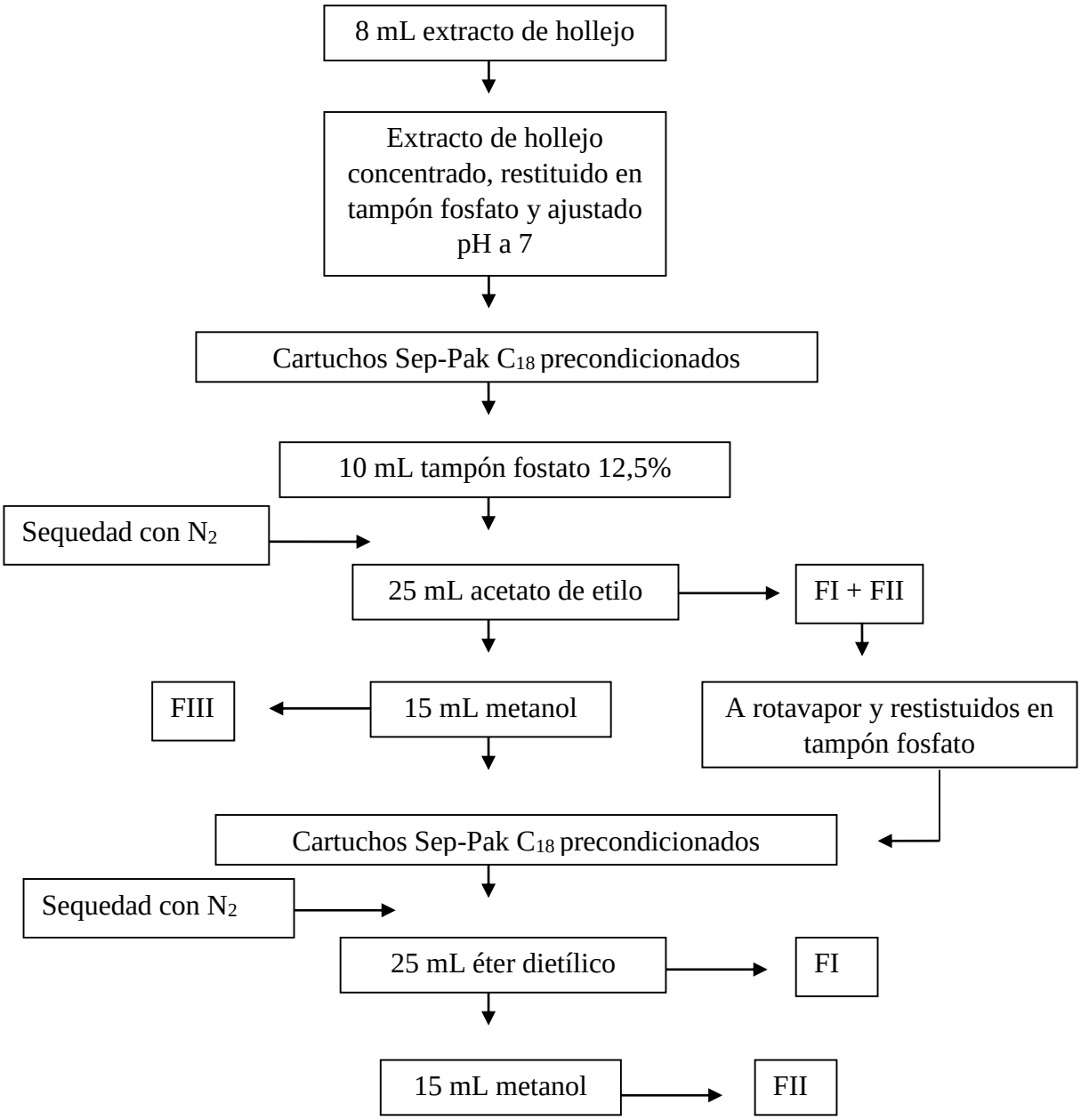


Figura 4. Esquema de fraccionamiento de taninos.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un test de Normalidad y homogeneidad de varianzas, luego se realizó el análisis de varianza (ANDEVA), con un $p \leq 0,05$.Cuando existieron diferencias significativas se aplicó la prueba de separación de medias por medio de la prueba de Tukey con el fin de identificar las diferencias entre los tratamientos. Todos los análisis se realizaron con el programa JMP® 8.0 (SAS Institute inc. USA)

RESULTADOS

Evolución del potencial hídrico xilemático de medio día

La Figura 5A muestra los valores de los potenciales xilemáticos de los distintos tratamientos. Los valores promedio observados correspondieron a -1,1 MPa (± 0,04), -1,0 MPa (± 0,05), -0,9 MPa (± 0,06) y -0,83 MPa (± 0,05) para los tratamientos T1, T2, T3 y T4, respectivamente. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos T1 y T4 en casi todas las fechas de muestreo. Paralelamente, en la figura 5B se muestra la cantidad de riego acumulado durante la temporada, el que alcanzó valores de 244 (T1), 488 (T2), 976 (T3) y 1464 (T4) m^3 ha^{-1} para cada tratamiento, correspondiente a 0,061, 0,122, 0,244 y 0,366 m^3 $planta^{-1}$. Del mismo modo, se observó que el porcentaje de la evapotranspiración de cultivo presentó valores promedio de 15%, 30%, 60% y 90% para T1, T2, T3 y T4, respectivamente (Figura 5C).

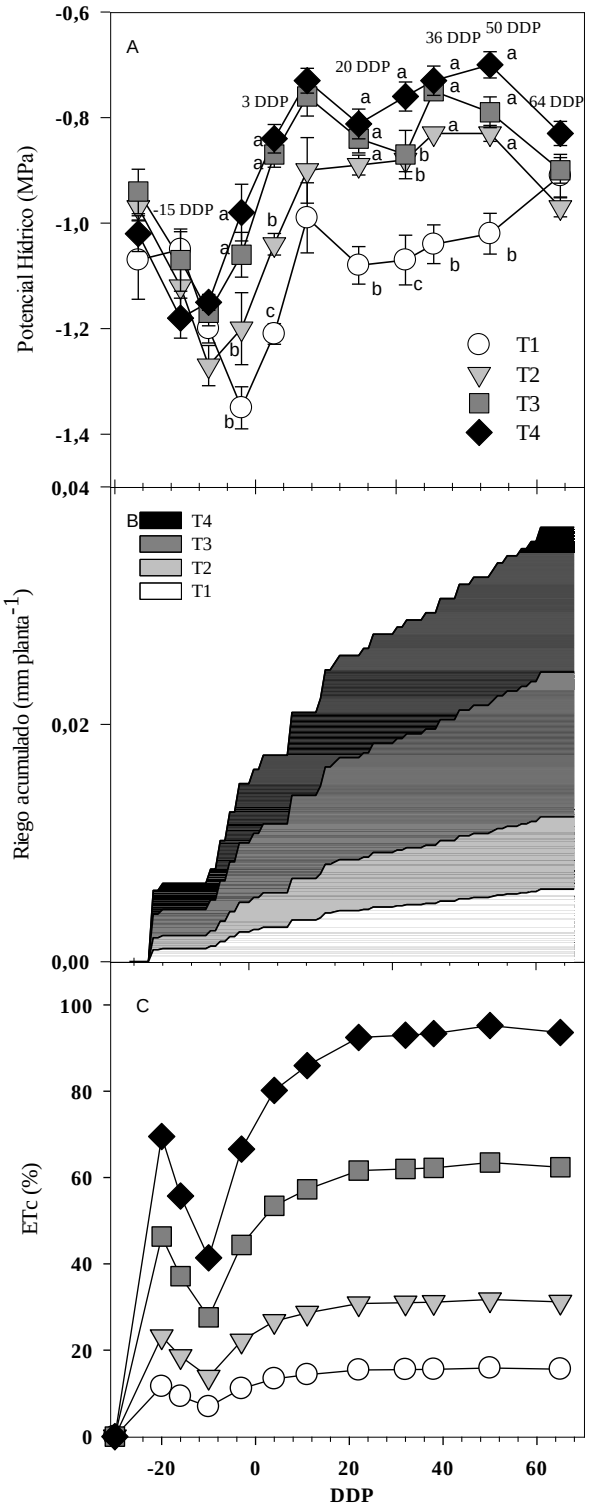


Figura 5. Evolución del potencial hídrico xilemático (A), riego acumulado (B) y evapotranspiración de cultivo (C) durante la temporada. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para una misma fecha ($p \leq 0,05$). T1: 0,8 mm h^{-1}; T2: 1,6 mm h^{-1}; T3: 3,2 mm h^{-1}; T4: 4,8 mm h^{-1}. DDP: días después de pinta.

Análisis básicos

En la Figura 6A se muestra el peso promedio por baya de los tratamientos del estudio. Se observó un aumento progresivo a partir de los 15 días antes de pinta hasta los 36 días después de pinta, para luego mantener valores de peso constantes. Ninguna diferencia estadísticamente significativa fue observada entre los tratamientos en las distintas fechas de muestreo. Similar comportamiento fue observado al evaluar el peso promedio de las pieles (Figura 6B), obteniéndose un aumento sostenido durante toda la temporada, sin encontrarse diferencias significativas entre tratamientos

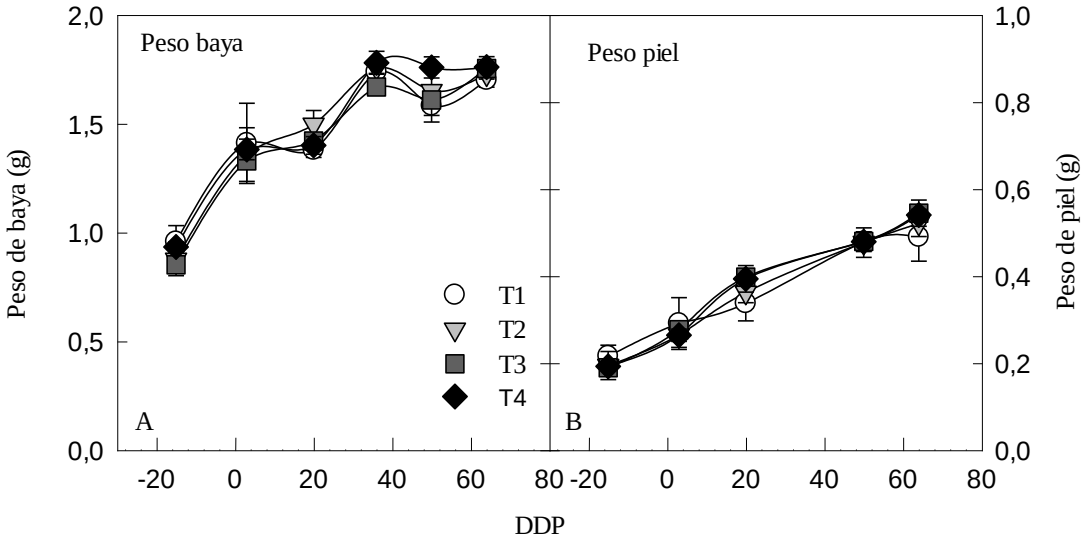


Figura 6. Evolución del peso promedio por baya (A) y peso promedio de piel (B). T1: 0,8 mm h^{-1}; T2: 1,6 mm h^{-1}; T3: 3,2 mm h^{-1}; T4: 4,8 mm h^{-1}. DDP: días después de pinta

En Figura 7A se muestra la evolución de los sólidos solubles de la baya durante el estudio. Se observó un aumento gradual de los sólidos solubles en todos los tratamientos durante toda la temporada, para alcanzar un valor promedio de 23,7 ° Brix en la fecha de cosecha. A pesar de lo anterior, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las fechas de muestreo entre los distintos tratamientos. En el caso de los valores de pH, variaron gradualmente entre 2.2 y 4.05 durante el estudio y no se observaron diferencias entre los tratamientos (Figura 7B). Por su parte, la acidez total (Figura 7C) de los tratamientos del estudio disminuyó fuertemente desde los 15 días antes de pinta hasta envero, para luego mantener valores cercanos a 3,0 g L^{-1} equivalentes de ácido tartárico hacia el final del estudio.

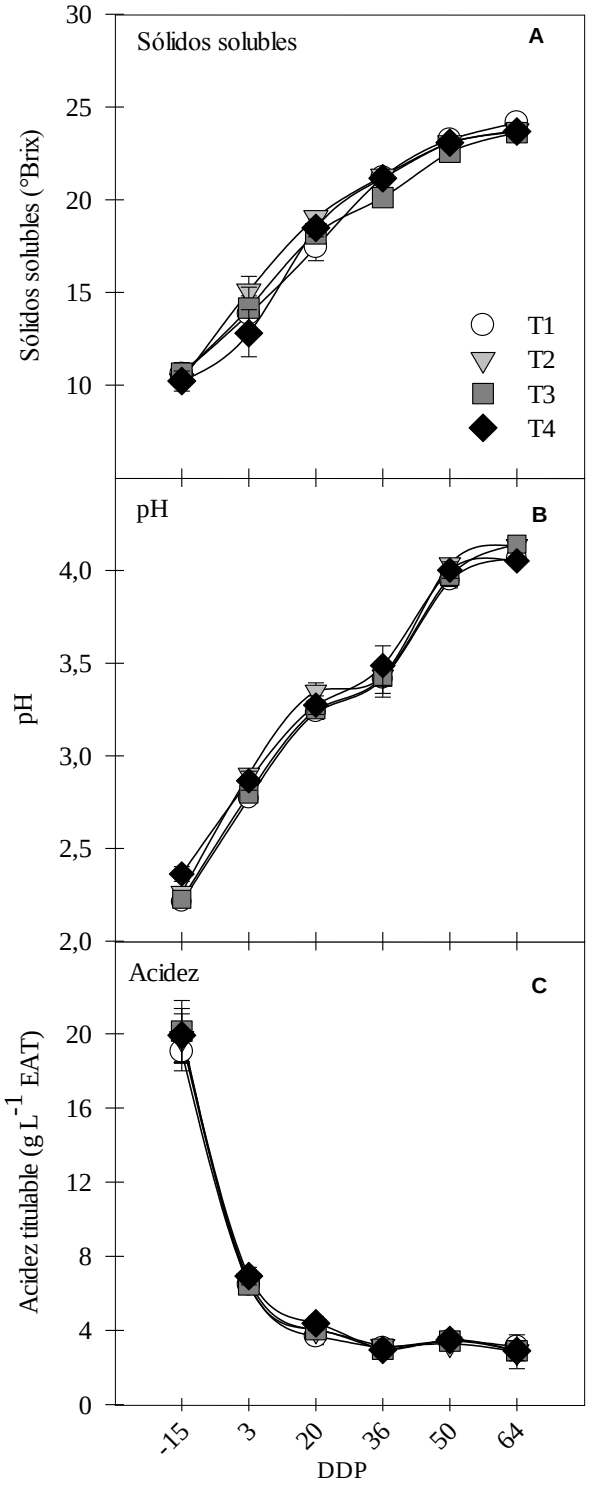


Figura 7. Evolución de sólidos solubles (A), pH (B) y acidez total (C). T1: 0,8 mm h^{-1}; T2: 1,6 mm h^{-1}; T3: 3,2 mm h^{-1}; T4: 4,8 mm h^{-1}. EAT: Equivalentes de ácido tartárico, DDP: días después de pinta.

Análisis fenólicos

La concentración de antocianos totales (Figura 8A) presentó un aumento durante toda la temporada en todos los tratamientos, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos a los 64 días después de pinta, en donde T1 obtuvo el mayor contenido de antocianos totales con respecto al resto, alcanzando un valor promedio de 7,1 mg g^{-1} de equivalentes de malvidina. En la concentración de fenoles totales de la piel de las bayas (Figura 8B) se observó una disminución paulatina en todos los tratamientos, alcanzando valores cercanos a 6 mg equivalentes de ácido gálico al final de la temporada. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos a los 20 días después de pinta, donde el tratamiento de menor riego (T1) tuvo el mayor contenido de fenoles totales y el tratamiento de más riego (T4) la menor concentración de estos compuestos. Finalmente en la Figura 8C se muestra la concentración de taninos totales de piel. Estos compuestos se mantuvieron constantes desde los 15 días antes de pinta hasta los 20 días después de pinta para luego aumentar levemente hasta el final de la temporada. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los muestreos.

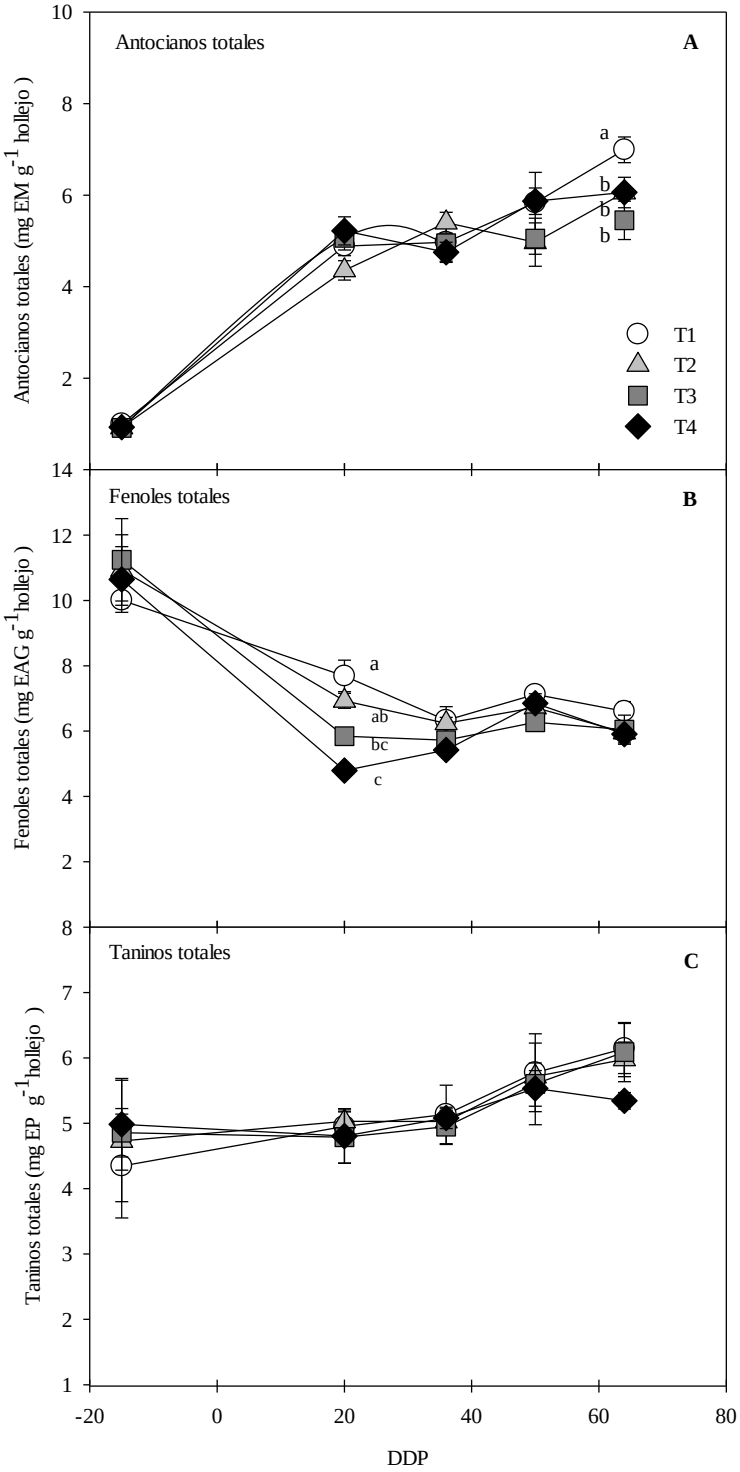


Figura 8. Evolución de la concentración de antocianos totales (A), fenoles totales (B) y taninos totales (C) de piel. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para una misma fecha ($p \leq 0,05$). T1: 0,8 mm h^{-1}; T2: 1,6 mm h^{-1}; T3: 3,2 mm h^{-1}; T4: 4,8 mm h^{-1}. EM: equivalentes de malvidina, EAG: equivalentes de ácido gálico, EP: equivalentes de proocianidinas, DDP: días después de pinta.

En la Figura 9 se observa la evolución en la concentración de la fracción mono, oligo y polimérica de flavan-3-oles de las pieles de bayas. En general, la fracción polimérica fue la más abundante seguida por la oligomérica y monomérica. La concentración de las tres fracciones disminuyó gradualmente a lo largo del estudio (Figura 9). Se observaron diferencias significativas en la fracción monomérica a los 15 días antes de pinta siendo el tratamiento T4 el que obtuvo la menor concentración (Figura 9 A). Por su parte, la fracción oligomérica mostró que a los 15 días antes de pinta los tratamientos T2 y T3 obtuvieron los mayores valores de oligómeros, mientras que al final del estudio T4 presentó el mayor contenido de oligómeros (Figura 9 B). En cuanto a la fracción polimérica (Figura 9C), esta presentó diferencias significativas entre los tratamientos durante las primeras etapas del estudio, para luego presentar concentraciones similares al final del estudio.

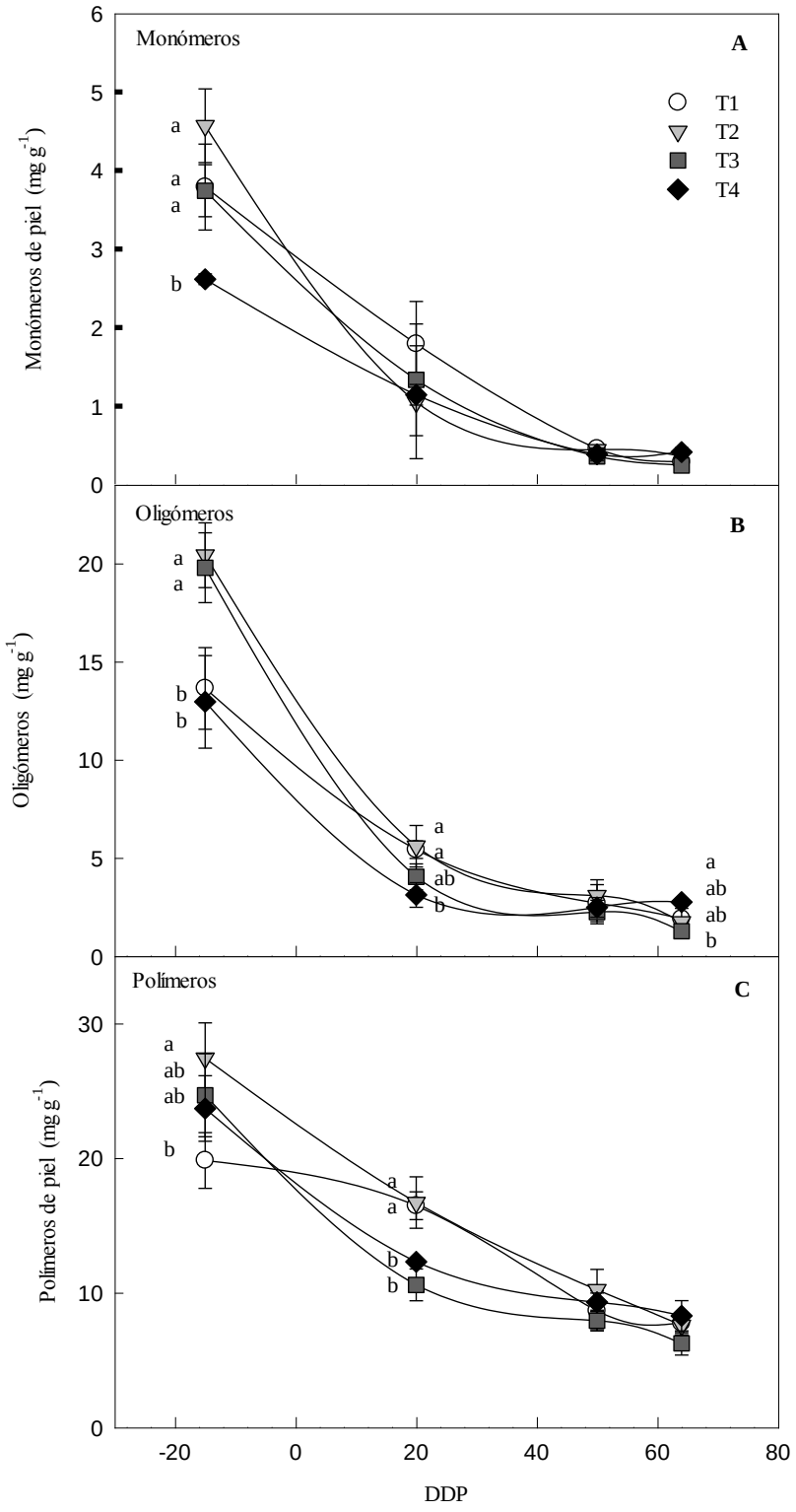


Figura 9. Evolución de las fracciones mono (A), oligo (B) y polimérica (C) de pieles. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para una misma fecha ($p \leq 0,05$). T1: 0,8 mm h^{-1}; T2: 1,6 mm h^{-1}; T3: 3,2 mm h^{-1}; T4: 4,8 mm h^{-1}. DDP: días después de pinta.

En la Figura 10 se muestran los valores del grado medio de polimerización de las proantocianidinas y su peso molecular medio, los que variaron entre 7-9 aproximadamente y 2.500-3.000, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las fechas de muestreo entre los distintos tratamientos.

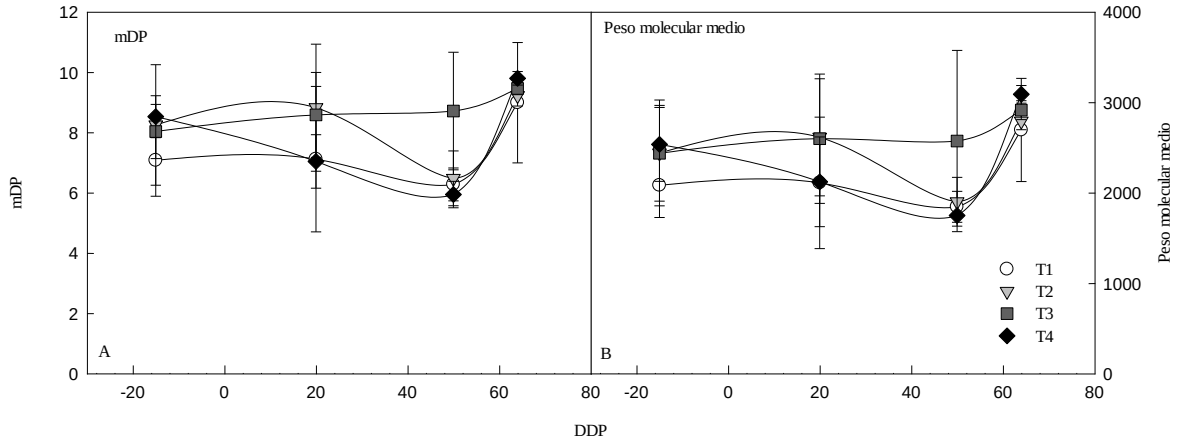


Figura 10. Evolución en el grado medio de polimerización (mDP) (A) y del peso molecular medio (B) de proantocianidinas. T1: 0,8 mm h^{-1}; T2: 1,6 mm h^{-1}; T3: 3,2 mm h^{-1}; T4: 4,8 mm h^{-1}. DDP: días después de pinta.

Del mismo modo, se observó que el porcentaje de galoilación durante la temporada varió entre un 2% y 8 % y que en ninguna de las fechas de muestreo se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 11).

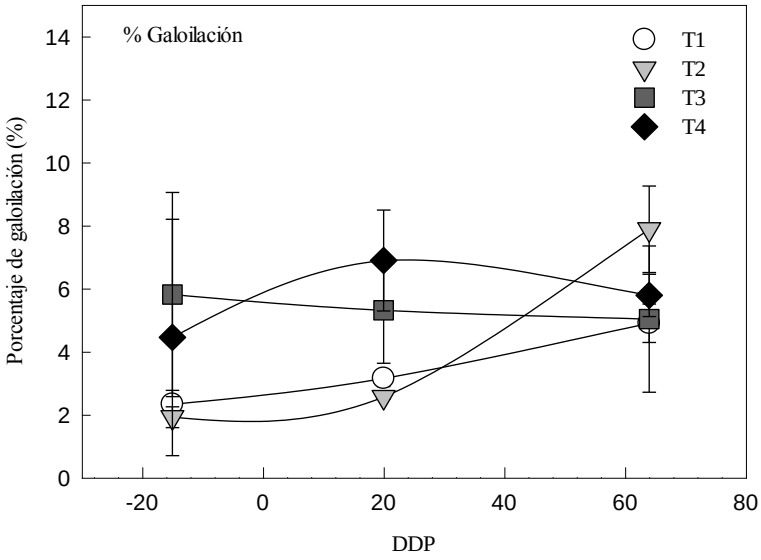


Figura 11. Evolución del grado de galoilación de proantocianidinas.T1: 0,8 mm h^{-1}; T2: 1,6 mm h^{-1}; T3: 3,2 mm h^{-1}; T4: 4,8 mm h^{-1}. DDP: días después de pinta.

En el Cuadro 2, se muestran las diferentes subunidades constitutivas de los flavan-3-oles de las pieles de las bayas del estudio. Las subunidades de extensión de las procianidinas caracterizadas fueron EGC (1), C (2), EC (3) y EC-3-*O*-G (4). C (5) fue la única subunidad terminal observada. Durante todo el periodo de estudio la subunidad encontrada en mayor cantidad fue EC. En cuanto al porcentaje de EGC se obtuvieron diferencias significativas a los 15 días antes de pinta, donde los mayores porcentajes corresponden a T2 y T3. El tratamiento 4 mostró el mayor porcentaje de EC, mientras que el tratamiento 3 el menor a los 15 días antes de pinta. EC-3-*O*-galato tuvo diferencias significativas a los 64 días después de pinta, teniendo a T2 con el mayor porcentaje y a T4 con el menor.

Cuadro 2. Porcentaje de las unidades de extensión y terminales de las proantocianidinas de la piel de bayas aisladas mediante floroglucinólisis por tratamiento en las distintas fechas de muestreo. Cada valor corresponde al promedio ± la desviación estándar.

Compuesto (%)	Fecha (ddp[6])	T1	T2	T3	T4
	-15	14,22 ± 0,31 b	28,42 ± 0,61 a	28,01 ± 2,82 a	18,39 ± 3,81 b
EGC-F[1]	**20**	26,95 ± 8,93	24,36 ± 17,7	28,07 ± 1,03	11,99 ± 11,4
	50	34,74 ± 8,27	37,98 ± 0,72	41,75 ± 1,24	37,65 ± 7,92
	64	19,79 ± 3,23	20,03 ± 2,13	19,93 ± 2,54	23,86 ± 5,56
	-15	14,62 ± 3,31	12,23 ± 3,05	10,19 ± 1,61	8,352 ± 1,93
C-F[2]	**20**	8,911 ± 3,64	10,81 ± 4,53	9,352 ± 0,82	11,31 ± 3,58
	50	11,15 ± 3,52	7,943 ± 5,22	5,341 ± 1,29	6,042 ± 2,52
	64	14,51 ± 1,86	12,02 ± 0,77	13,42 ± 0,73	13,99 ± 2,16
	-15	53,64 ± 4,7 ab	45,61 ± 1,7 ab	42,44 ± 4,35 b	54,35 ± 5,71 a
EC-F[3]	**20**	48,82 ± 4,51	49,63 ± 10,1	45,11 ± 3,07	52,59 ± 10,2
	50	39,37 ± 4,36	38,57 ± 6,79	38,42 ± 0,96	40,92 ± 4,22
	64	49,12 ± 4,02	46,23 ± 1,57	50,45 ± 0,89	46,67 ± 4,23
	-15	3,471 ± 0,64	2,852 ± 0,49	8,443 ± 4,61	6,493 ± 5,33
EC-3-O-G-F[4]	**20**	4,662 ± 0,36	3,834 ± 0,14	7,742 ± 2,38	9,993 ± 5,73
	50	Nd[7]	Nd[7]	Nd[7]	Nd[7]
	64	6,691 ± 1,22 ab	10,74 ± 1,45 a	6,791 ± 3,9 ab	5,232 ± 1,23 b
	-15	14,06 ± 2,42	10,88 ± 1,46	10,95 ± 1,38	12,43 ± 0,77
C[5]	**20**	10,65 ± 1,13	11,38 ± 2,82	9,732 ± 1,17	14,11 ± 3,31
	50	14,74 ± 1,98	15,49 ± 0,86	14,81 ± 1,01	15,43 ± 1,22
	64	9,84 ± 0,66	10,33 ± 0,35	10,32 ± 0,52	10,22 ± 0,45

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$). (1) (-)-Epigalocatequina unida a floroglucinol (2) (+)-Catequina unida a floroglucinol (3) (-)-

Epicatequina unida a floroglucinol (4) (-)-Epicatequina-3-*O*-galato unida a floroglucinol (5) (+)-Catequina (6) Días después de pinta (7) No existen datos.

DISCUSIÓN

Potenciales xilemáticos

El potencial xilemático medido en pre alba y a medio día (Ψx) indicativo del estado hídrico de las plantas, se caracteriza por su baja variabilidad y alta sensibilidad (McCutchan and Shackel, 1992). Este parámetro resulta de la transpiración de la planta completa y la conductividad hidráulica del suelo y del continuo raíz-suelo (Chonea *et al*., 2001). Según Van Leeuwen *et al.* (2009), los valores de Ψx entre -0,6 y -0,9 MPa son considerados una condición de estrés leve, mientras que entre -1,1 y -1,4 MPa son considerados como un estrés moderado a severo en vides viníferas. De acuerdo a esto, es posible observar que los tratamientos de riego, efectivamente resultaron en niveles de Ψx contrastante entre tratamientos y que los tratamientos T3 y T4 correspondieron a un estrés leve, el T2 a moderado y el T1 a severo (Figura 5).

Análisis básicos

El tamaño final de baya es importante en su calidad organoléptica, por el efecto que tiene sobre la relación piel *versus* pulpa (Champagnol, 1998), y se sabe que producto de déficit hídricos este parámetro se afecta negativamente, al igual que el peso de las pieles (McCarthy, 1997; Ojeda *et al*., 2002; Basile *et al*., 2011). Se ha sugerido que el efecto del estrés hídrico sobre el tamaño de baya dependerá de la severidad de este y de la etapa de desarrollo en que se aplique (Basile *et al*., 2011). Así, se han reportado efectos notorios en el tamaño de bayas cuando el estrés hídrico se realiza entre floración y envero, más que entre envero y cosecha (McCarthy, 1997; Ojeda *et al*., 2002). Posiblemente esto último explica que en el presente estudio los distintos niveles de riego no resultaran en diferencias significativas en la alometría de bayas (Figura 6).

En el período de maduración de las bayas, la concentración de azúcares aumenta fuertemente, al contrario de la concentración de ácidos, reflejada en un aumento del pH del mosto (Iland y Gago, 2002). Esto último, producto de una menor síntesis de ácido málico y/o una mayor tasa de respiración. Esta merma en la acidez puede acelerarse en plantas bajo estrés, posiblemente por aumentos en la temperatura en las bayas (Reynolds *et al*., 2007; Salón, 2005). En relación a la concentración de sólidos solubles, se ha reportado que el estrés hídrico tiene un impacto, por una parte adelantando el inicio de la maduración (Lebon *et al*., 2006; Castellarin *et al*., 2007b) y, por otra, por el efecto sobre la deshidratación de las bayas, concentrando azúcares, lo que, a diferencia del caso anterior, se observa en el momento de cosecha (Coombe y Mac Carthy, 2000). En el presente ensayo, los niveles de estrés, así como

el momento en el que fueron aplicados, no alcanzó a determinar diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 7). Lo mismo que para peso de bayas y de pieles (Figura 6), la aplicación de los niveles estresantes en post-envero pudieron ser lo suficientemente tardíos como para no alterar las tasas de descarga de azúcares. Más aún, aparentemente las condiciones estresantes aplicadas antes de envero repercuten más fuertemente sobre la acumulación de azúcares en bayas (Mathews *et al*., 1990).

Análisis fenólicos

En el caso particular de los antocianos en bayas de vid, estos aumentan desde pinta en adelante (Downney *et al*., 2004). Por lo mismo, un estrés hídrico provocado en dicho periodo tendría un impacto sobre su metabolismo. En Tempranillo se observó un aumento en la concentración de antocianos en vides sometidas a déficit hídrico (Esteban *et al*., 2001). Ojeda *et al*., (2002) por su parte, observaron una mayor concentración de antocianos totales en cosecha para el tratamiento de déficit severo luego de envero. El aumento en la concentración de antocianos, producto de restricciones en el riego, se debe al impacto de esta condición sobre la expresión de genes que codifican para enzimas de la ruta de los fenilpropanoides. En efecto, Castellarin *et al*., (2007a) observó un aumento en los antocianos en bayas bajo estrés hídrico durante la maduración de la baya y en cosecha, explicado por una mayor abundancia de transcritos de *VvUFGT*, *VvCHS2*, *VvCHS3*, *VvF3H* y *VvGST*. Evidentemente, esta respuesta se origina en condiciones de cierto umbral mínimo de estrés y, por lo mismo, en el presente estudio, la mayor concentración de antocianos ocurre solo en el tratamiento de mayor restricción de riego y se expresa hacia el final de la temporada (Figura 8A).

En las bayas de vid, los fenoles totales están representados en su mayoría por proantocianidinas y antocianos. Estos compuestos, en general, modifican su concentración producto de estrés hídricos, como en la variedad Tempranillo, que resultó en una mayor concentración en plantas con restricción de riego (Esteban, 2001), así como en Syrah y Cabernet sauvignon en ciertos momentos de la maduración de la baya en tratamientos de menor aporte hídrico (Chalmers, 2007). Eso sí, en el presente estudio, no obstante haber existido mayores concentraciones de fenoles totales en post-envero, esto no se conservó hasta la fecha de cosecha (Fig. 8B). En este sentido, es importante considerar que los distintos compuestos fenólicos están sujetos a un permanente cambio producto del balance entre la síntesis y su degradación, esta última muy importante hacia el final de la maduración de las bayas.

La aplicación de un déficit hídrico ha demostrado incrementar la concentración de proantocianidinas en ciertos momentos de la maduración de la baya en cepas como Syrah y Cabernet sauvignon (Ojeda *et al*., 2002; Kennedy *et al.*, 2002; Ollé *et al*., 2011). Sin embargo, en otros estudios se ha visto un efecto más bien leve (Downey *et al*., 2006; Castellarin *et al*., 2007b). Particularmente en el caso de la variedad Merlot los aumentos en la expresión de enzimas participantes de la ruta de síntesis han sido más bien bajos (Castellarin *et al*., 2007b). Es más, según Roby *et al*., (2004) las proantocianidinas se verían más afectadas por diferencias en la sensibilidad del crecimiento del mesocarpo y exocarpo, producto de un déficit hídrico, que por un efecto directo en su biosíntesis, y teniendo en cuenta que la alometría de las bayas (Figura 6) no se vio afectada por los distintos tratamientos, podría

explicarse el nulo efecto de tratamiento sobre los taninos totales. En el presente estudio, los taninos totales se mantuvieron relativamente constantes hasta pasados los 30 días luego de envero, independiente del nivel de riego (Figura 8C), siguiendo un patrón distinto a lo observado en otros estudios en los que se mantiene un descenso desde pre-envero en adelante (Kennedy *et al.*, 2000; Downey *et al.*, 2003; Obreque *et al*., 2010). Eso sí, en las variedades Syrah y Cabernet Sauvignon, Hanlin y Downey, (2009) también observaron una concentración relativamente constante en taninos totales similares al presente estudio. Si esto se debe a un comportamiento varietal o bien a una condición del sitio de estudio, es un asunto que debe ser determinado. De hecho, la disminución en la concentración de taninos totales se ha asociado a distintos factores. Por una parte, se ha sugerido la posibilidad de que la menor concentración es, simplemente, por una menor extractabilidad de estos compuestos por su interacción con otros polímeros como polisacáridos, ligninas y proteínas, y/o por un efecto de oxidación durante la maduración de la baya (Kennedy *et al*., 2000; Kennedy *et al*., 2001a; Downey *et al*., 2003; Bindon and Kennedy, 2011). Y por supuesto, otra posibilidad es la degradación (Kennedy, 2007). Se debe decir, eso sí, que se ha descrito también un aumento de taninos totales a partir de los 48 días después de pinta en la cepa Carménère (Galaz, 2010).

Es importante reconocer que en el ámbito enológico, más que simplemente el contenido total de taninos, la composición de los mismos, así como otros parámetros químicos, tales como el grado de polimerización, son características más importantes en la determinación de la calidad organoléptica del vino final. En general, de manera similar a lo observado en el presente estudio (Figura 9), la fracción monómerica es la menos presente, proporcionalmente, durante toda la temporada de muestreo, seguida por la oligomérica y finalmente la polimérica en variedades como Tempranillo, Graciano y Cabernet Sauvignon (Monagas *et al*., 2003). Además, similar a lo previamente observado por Obreque-Slier *et al*. (2010) en Carménère, en el presente estudio también se observa que las tres fracciones disminuyen sostenidamente a lo largo de la maduración de las bayas.

El mecanismo por medio del cual evoluciona la polimerización de los taninos condensados, esto es, si se trata de reacciones mediadas por catálisis enzimáticas o simplemente por reacciones espontáneas, es aún desconocido. Sin embargo, es claro que la condición hídrica de las plantas determina diferencias en las mismas, las que pueden resultar de efectos directos o bien indirectos de este factor ambiental. El grado medio de polimerización (mdP) que se refiere al número promedio de unidades monoméricas que componen las cadenas de proantocianidinas, pareciera ser dependiente de la variedad y el ambiente, así como del estado de desarrollo de las bayas (De Freitas *et al*., 1999). De esta manera, mientras que en Pinot Noir se ha reportado un aumento del mDP desde envero a cosecha (Pastor del Río y Kennedy 2001), en Syrah se ha observado un aumento sostenido de este valor, tanto durante el desarrollo como en la maduración de la baya (Kennedy *et al*., 2001a). En las variedades Syrah, Pinot Noir y Carbernet Sauvignon, por su parte, se ha observado también que el mDP aumenta o se mantiene constante durante las primeras fases de desarrollo para luego disminuir hasta cosecha (Downey *et al*., 2003; Cortell y Kennedy, 2006; Koyama y Goto-Yamamoto, 2008). Cabe señalar además que la cuantificación de este parámetro es sensible al método de extracción que se utilice (Kennedy *et al.*, 2001b). En la presente investigación, el mDP se mantuvo constante durante toda la temporada (Figura 10), de manera similar a lo observado por Galaz (2010) y Obreque-Slier *et al*. (2010) en Carménère, con valores

cercanos a las 7 a 9 unidades (Galaz, 2010), y menores a los obtenidos en otras variedades como Syrah y Cabernet Sauvignon (Downey *et al*., 2003; Hanlin R. and Downey O., 2000; Kennedy *et al*., 2001). Carménère, en este estudio, no varió el mDP, similar a lo observado por Kennedy *et al.* (2002) en la variedad Cabernet Sauvignon. Se han observado efectos del déficit hídrico en este parámetro en otros estudios (Ollé *et al.*, 2011), pero solo al final de la temporada.

El nivel de galoilación que posean las proantocianidinas, es otra característica química importante a considerar desde el punto de vista organoléptico de las uvas, ya que un mayor porcentaje de galoilación genera proantocianidinas más amargas y astringentes (Peña, 2006). Los valores de galoilación en este estudio concuerdan con lo reportado en literatura y fluctuaron entre 2% y 8% aproximadamente (Figura 11). Galaz (2010) en la misma cepa reportó porcentajes de entre 2 y 6. En variedades como Tempranillo, Graciano y Cabernet Sauvignon el porcentaje de galoilación de proantocianidinas reportado es de 2,9; 6,5 y 3,8 respectivamente (Monagas *et al*., 2003). En Carménère el valor observado en madurez tecnológica fue de 1,6% a 2% en tres clones diferentes (Fernández *et al*., 2007). Obreque-Slier (2010) obtuvo porcentajes que oscilan entre 7,8% y 12%, mayores a los que se obtuvieron en este ensayo.

Como ya se mencionó, la composición de las proantocianidinas puede tener una implicancia directa en las propiedades sensoriales de los vinos (Hanlin y Downey, 2009), de tal forma que variaciones en los porcentajes de ciertas subunidades monoméricas podría generar diferencias en su percepción sensorial. Estas subunidades corresponden a EGC, EC, C y EC-3-O-G (Cuadro 2), encontradas también en variedades como Cabernet Sauvignon, Pinot Noir y Syrah, donde la subunidad con mayor presencia correspondió a EC, seguida de EGC (Souquet *et al*., 1996; Kennedy *et al*., 2001; Downey *et al*., 2003; Cortell y Kennedy, 2005; Cortell y Kennedy, 2006; Pastor del Río y Kennedy, 2006; Fernández *et al*., 2007; Hanlin y Downey, 2009; Ollé *et al*., 2011). En cuanto a las subunidades terminales, la única encontrada fue C (Cuadro 2), ya descrito en la literatura para variedades como Pinot Noir, Syrah y Cabernet Sauvignon (Kennedy *et al*., 2001; Cortell *et al*., 2005; Cortell y Kennedy, 2006; Pastor del Río y Kennedy, 2006; Fernández *et al*., 2007; Obreque-Slier *et al*., 2010). Sin embargo, se ha encontrado EC y EC-3-O-G como subunidades terminales, aunque en bajas concentraciones (Souquet *et al*., 1996; Downey *et al*., 2003; Hanlin y Downey, 2009). El efecto de un estrés hídrico sobre la composición estructural de las proantocianidinas está aún poco estudiado. Ollé *et al*. (2011) observaron un mayor porcentaje de EC-3-O-G en cosecha en vides de Syrah sometidas a estrés pre envero, seguida por un estrés post envero con respecto al control. En la presente investigación se obtuvo un mayor porcentaje de este compuesto al final de la temporada para el segundo tratamiento más restrictivo (Cuadro 2), por lo que, al parecer, la magnitud en la que se afecten estas subunidades dependería del momento en el que se aplique el estrés y del nivel de estrés aplicado.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se rechaza la hipótesis planteada, pues una mayor restricción hídrica no genera un aumento en la concentración y el grado de polimerización de proantocianidinas en pieles de bayas de *Vitis vinifera* L. cv. Carménère. Paralelamente, no se observó alguna relación entre un déficit hídrico y los diferentes parámetros químicos y físicos analizados en este estudio. No obstante lo anterior, se observaron algunas diferencias puntuales en la concentración de las subunidades de extensión galoiladas, fracciones oligo y poliméricas de los flavan-3-oles entre los tratamientos.

REFERENCIAS

Acevedo, C., S. Ortega and S. Fuentes. 2010, july. Effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water status on water consumption, vegetative growth and grape quality: An irrigation scheduling application to achieve regulated deficit irrigation. Agricultural Water Management, 97(7): 956-964.

Allen, R., L. Pereira, D. Raes and M. Smith. 2006. Crop Evapotranspiration: Guidelines for computing crop water requirements. Estudio FAO Riego y Drenaje, (56): 299p.

Basile B, J. Marsal, M. Mata, X. Vallverdu,J. Bellvert and J. Girona. 2011. Phenological sensitivity of Cabernet Sauvignon to water stress:vine physiology and berry composition. American Journal of Enoly and Viticulture, 62:452–461.

Bindon, K. and Kennedy J. 2011. Ripening-induced changes in grape skin proanthocyanidins modify their interaction with cell walls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(6):2696-707.

Bucchetti, B., M.A .Matthews, L. Falginella, E. Peterlunger and S.D Castellarin. 2011. Effect of water deficit on Merlot grape tannins and anthocyanins across four seasons. Scientia Horticulturae, 128 (2011):297-305.

Castellarin, S., A. Pfeiffer, P. Sivilotti, M. Degan, E. Peterlunger and G. Di Gaspero. 2007a. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. Plant, Cell and Environmetn, 30:1381-1399.

Castellarin, S., M. Matthews, G. Di Gaspero and G. Gambetta. 2007b, may. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*, 227(1): 101-112.

Chalmers, Y. 2007. Influence by sustained deficit irrigation on physiology and phenolic compounds on winegrapes and wine. Doctor of Philosophy. School of Agriculture and Discipline of Wine and Horticulture, University of Adelaide. 172 p.

Champagnol, F. 1998. Critères de qualité de la vendange. In Oenlogie, Fondements Scientifiques et Technologiques. Paris, Francia. Ed: C. Flanzy. Lavosier Technique et Documentation. 653-659.

Cheynier, V., C. Prieur, S. Guyot, J. Rigaud and M. Moutounet, 1997. The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. Wine, 661: 81–93.

Cheynier, V., M. Duenas-Paton, E. Salas, C. Maury, J.M Souquet, P. Sarni-Manchado and H. Fulcrand. 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. American Journal of Enolgy and Viticulture, 57: 298–305.

Chonea, X., C. Van Leeuwen, D. Dubourdieu and J.P. Gaud Illeá. 2001. Stem water potential is a Sensitive Indicator of Grapevine Water Status. Annals of Botany, 87: 477-483.

Conde C.; P. Silva; N. Fontes; A.C.P. Dias; R.M. Tavares; M.J. Sousa; A. Agasse; S. Delrot and H. Gerós, 2007. A. Review: Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. Global Science Books, 1:12-15.

Coombe B. and Mc Carthy M. 2000. Dynamics of grape growth and physiology of ripening. Australian Journal of Grape and Wine Research, 6:131-135.

Cortell, J., M. Halbleib, A. Gallagher, T. Righetti and J. Kennedy. 2005. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 5798-5808.

Cortell, J. and Kennedy, J. 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera L.*) Pinot Noir fruit and extraction in a model system. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 8510-8520.

Deluc, L., D. Quilici, A. Decendit, J. Grimplet, M. Wheatley, K. Schlauch *et al*. 2009, may. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. BMC Genomics, 10: 212.

De Freitas, V., Y. Glories and A. Monique. 1999. Developmental of procyanidins in grapes of red *Vitis vinífera* varieties and their composition in respective wines. American Journal of Enology and Viticulture, 51 (4): 397-403.

Downey, M. O., J.S. Harvey, S.P. Robinson. 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. Australian Journal of Grape and Wine Research. 9: 15-27.

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 of Grape and Wine Research, 1: 55-73.

Downey, M., N. Dokoozlian and M. 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): 257-268.

Esteban, M., M. Villanueva and J. Lissarrague. 2001. Effectof irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (Vitis vinífera L.) grape berries during ripening. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81:409-420.

Fernandez, K., J.A. Kennedy and E. Agosin. 2007. Characterication of *Vitis vinifera* L. cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 3675-3680.

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 ingeniera agrónoma y grado en magister en enología y vitivinicultura. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 79 p.

Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2e partie. Mesure, origine et interpretation. Connaiss Vigne Vin, 18: 253-271.

Hanlin R. and Downey O. 2009. Condensed tannin acumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. American Journal of Enology and Viticulture, 60:1.

Iland, P and Gago, P. 2002. Australian wines: styles and tastes. Patrick Iland Wine Promotion Pty Lta. Adelaide, Australia, 22-51 p.

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

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

Kennedy, J. and Jones, G. P. 2001b. 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.; M. Matthews and A. Waterhouse. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. American Journal of Enology and Viticulture, *53*(4): 268-274.

Kennedy, J.A., C. Saucier and Y. Glories. 2006. Grape and wine phenolics: history and perspective. American Journal of Enolgy and. Viticulture, 57: 239–248.

Kennedy, J. 2007. Grape and Wine Tannins: Production, perfection, perception. [En línea]. *Practical Winery and Vineyard*. Recuperado en: < http://www.researchgate.net/publication/257198597_Grape_and_Wine_Tannins_Production_Perfection_Perception >. Consultado el: 10 de Abril 2015.

Koyama, K. y Goto-Yamamoto, N. 2008. Bunch shading during different developmental stages affects the phenolic biosynthesis in berry skins of Cabernet Sauvignon grapes. Journal of American Society of Horticultural Science,133 (6):743-753.

Lebon E., A. Pellegrino, G. Louarn and J. Lecoeur. 2006. Branch development controls leaf area dynamics in grapevine (*Vitis vinifera*) growing in drying soil. Annals Botany, 98:175-185.

Lovisolo, C., I. Perrone, A. Carra, A. Ferrandino, J. Flexas, H. Medrano and A. Schubert. 2010. Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. Functional Plant Biology, 37: 98–116.

Matthews, M.A.; R. Ishii; M.M. Anderson and O'Mahony, M. 1990. Dependence of wine sensory attributes on vine water status. Journal of the Science of Food and Agriculture, 51:321–335.

Mattivi F., C. Zulian, G. Nicolini adn L. Valenti. 2002. Wine, biodiversity, technology and antioxidants. Annals of the New York Academy of Sciences, 957:37-56.

McCutchan, H. and Schakel, K.A. 1992. Stem-water potential as a sensitive indicator of water stress in prune trees (*Prunus domestica* L. cv. French). Journal of American Horticultural Science, 117: 607-611.

Mc Carthy, M., 1997. The effect of transient water déficit on Berry development of cv. Syrah (Vitis vinífera L.). Australian journal of grape and wine, 3:102-108.

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.

Obreque, E., A. Peña, R Lopez, F. Zamora, J. Ricardo-da Silva, O. Laureano. 2010. Comparative study of the phenolic composition of sedes and skins from Carmenere and Cabernet Sauvignon grape varieties (Vitis vinífera L.) during ripening. Journal of agricultura and food chemistry, 58: 3591–3599.

Obreque-Slier, O., R. López-Solís, L. Castro-Ulloa, C. Romero-Díaz and A. Peña-Neira. 2012. Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera L.*) during ripening. Food Science and Technology, 48:134-141.

OIV (International Organisation of Vine and Wine). 2011. Compendium of international methods of wine and must analysis. Vol I-II, Sect. 3. Ed. OIV, Paris.

Ojeda, H.; C. Andary; E. Kraeva; 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* cv. Shiraz. American Journal of Enology and Viticulture, 53(4): 261-267.

Ollé, D., J.L Guiraud, J.M Souquet, N. Terrier, A. Ageorges, V. Cheynier and C. Verries. 2011. Effect of pre- and post-version water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. Australian Journal of Grape and Wine Research, 17:90-100.

Pastor del Rio, J. and Kennedy, J. 2006. Development of proanthocyanidins in Vitis vinífera L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. American Journal of Enology and Viticulture, 57 (2): 125-132.

Peña-Neira, A. 2006. En la calidad de uvas y vinos: Los taninos y su importancia. Revista Vendimia (Abril): 18-20.

Ribéreau-Gayon, P. and Stonestreet, E. 1966. Le dosage des tannins du vin rouge et determination de leur structure. Analytical Chemistry. 48:188-192.

Ribéreau-Gayon, J. and Stonestreet, E. 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. Bulletin of the Chemical Society, 9:2649-2652.

Reynolds, A., W.D. Lowrey, L. Tomek, J. Hakimi and C. Savigny. 2007. Influence of irrigation on vine performance, fruit composition and wine quality of Chardonnay in a cool, humid climate. American Journal of Enology and Viticulture, 58 (2):217-228.

Roby G., J. Harbeston, D. Adams and M. Matthews. 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. Australian Journal of Grape and Wine Research, 10:100–107.

Salón, J.L, C. Chirivella and J.R. Castel. 2005. Response of cv. Bobal to timing of déficit irrigation in Requena, Spain: Wine relations, yield and wine quality. American Journal of Enology and Viticulture, 56(1): 1-8.

Servicio Agrícola y Ganadero, Chile. 2013. Catastro vitivinícola nacional 2013 [en línea] disponible en: <http://www.sag.cl/noticias/sag-presenta-informe-del-catastro-viticola-nacional-2013>. Consultado: 15 de Mayo de 2015.

Scholander, P., H. Hamel, E. Hemmingsen and E. Bradstreet. 1965, july. Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of Mangrove and some others plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 51: 119-225.

Souquet, J-M., V. Cheynier, F. Brssaud and M. Moutounet. 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. Phytochemistry, 43 (2):509-512.

Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo da Silva, J. and I, Spranger. 1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 46. 1390-1396.

Van Leeuwen, C., O. Tregoat, X. Choné, B. Bois, D. Pernet and J-P. Gaudillère. 2009. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes? Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 43: 121–134.

Venencie, C., M. Uveria and S. Etguiet. 1997. Maturité polyphénolic du raicin mice en place d' une methode d' annalyse de routine. Revue Francaise d' enologie, 167: 36-41.

Vidal, S., L. Francis, S. Guyot, N. Marnet, M. Kwiatkowski, R. Gawel, V Cheynier and E.J. Waters. 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. Journal of Science of Food and Agriculture, 83:564–573.