



FACULTAD DE
AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

**PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO ABSCÍSICO
EN LA SÍNTESIS DE ANTOCIANOS
Y EXPRESIÓN DE GENES EN UVAS**
Vitis vinifera cv. **PINOT NOIR**

por

Mariana URRABURU BORDÓN

T E S I S

T.3697

2011

MONTEVIDEO

URUGUAY

T.3514

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO ABSCÍSICO EN LA SÍNTESIS DE
ANTOCIANOS Y EXPRESIÓN DE GENES EN UVAS**
Vitis vinifera cv. *PINOT NOIR*

por

Mariana URRABURU BORDÓN



**TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo**

MONTEVIDEO
URUGUAY
2011

Tesis aprobada por:

Director: -----
Ing. Agr. Dr. Omar Borsani

Ing. Agr. Dra. Milka Ferrer

Ing. Agr. Oscar Bentancur

Fecha: -----

Autor: -----
Mariana Urraburu Bordón

AGRADECIMIENTOS

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio: Leticia, Danny, Esteban, Yolanda, Santiago, Gastón, Laurita, Sole, Maxi, Matías, Bettina, Rodolfo, por ser mi compañía todo este tiempo y formar parte de esta tesis y de mucho más.

A Pedro por responder con una sonrisa siempre.

A Omar y Jorge por confiar en mi para realizar esta tesis.

A mi familia por su apoyo incondicional. A mi madre además por elegir y colocar las cintas de colores.

A Establecimiento Juanicó por prestarme la fila de plantas y por el interés en el tema.

A Milka por el interés y los artículos.

Al Coco por toda su ayuda en los análisis.

A Cristian por ayudarme a llenar el auto de uvas y por ser tan compañero.

A mi abuela por estar siempre.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 PROCESO DE MADUREZ DE LAS BAYAS Y HORMONAS VINCULADAS.....	4
2.2 ALGUNOS COMPONENTES DEL FRUTO Y SU EVOLUCIÓN EN EL PROCESO DE MADUREZ.....	7
2.2.1 <u>Ácidos orgánicos</u>	7
2.2.2 <u>Aminoácidos</u>	7
2.2.3 <u>Prolina</u>	8
2.2.4 <u>Azúcares</u>	9
2.2.5 <u>Antocianos</u>	10
2.2.5.1 Consideraciones generales.....	10
2.2.5.2 Ruta de biosíntesis de antocianos.....	12
2.3 EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE LA ACUMULACIÓN DE ANTOCIANOS Y OTROS METABOLITOS.....	15
2.3.1 <u>Temperatura</u>	15
2.3.2 <u>Luz</u>	16
2.3.3 <u>Déficit hídrico</u>	16
2.3.3.1 Efecto sobre la acumulación de antocianos.....	16
2.3.3.2 Efecto sobre otros metabolitos.....	17
2.3.3.3 El ABA como respuesta al déficit hídrico.....	18
2.4 PINOT NOIR.....	19
2.4.1 <u>Antocianos y parámetros bioquímicos en Pinot Noir</u>	20
2.4.1.1 Efecto del vigor sobre la acumulación de antocianos, pH, y acidez titulable en Pinot Noir.....	20
2.4.1.2 Efecto del sombreado y temperatura sobre la acumulación de flavonoides en Pinot Noir.....	20
2.4.1.3 Efecto de la temperatura y el ABA sobre la acumulación de antocianos, pH, y acidez titulable en Pinot Noir.....	21
2.5 <u>ÁCIDO ABSCÍSICO</u>	24
2.5.1 <u>Síntesis y evolución en el fruto</u>	24

2.5.2 <u>Aplicaciones de ABA como herramienta tecnológica</u>	25
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	27
3.1 <u>MATERIAL VEGETAL</u>	27
3.2 <u>PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</u>	28
3.2.1 <u>Diseño del experimento a campo</u>	28
3.2.2 <u>Condiciones de aplicación y mantenimiento de las muestras</u>	32
3.3 <u>DISEÑO EXPERIMENTAL</u>	33
3.4 <u>MEDICIONES</u>	33
3.4.1 <u>Métodos de extracción</u>	33
3.4.1.1 <u>pH y sólidos solubles</u>	33
3.4.1.2 <u>Antocianos totales</u>	33
3.4.1.3 <u>Prolina, aminoácidos totales y ácidos orgánicos</u>	34
3.4.1.4 <u>ARN de la piel de la uva</u>	34
3.4.2 <u>Determinaciones analíticas</u>	35
3.4.2.1 <u>Cuantificación de pH y sólidos solubles</u>	35
3.4.2.2 <u>Cuantificación de antocianos totales</u>	35
3.4.2.3 <u>Cuantificación de prolina</u>	35
3.4.2.4 <u>Cuantificación de aminoácidos totales</u>	36
3.4.2.5 <u>Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos</u>	36
3.4.2.6 <u>Obtención de ADNc</u>	37
3.4.2.7 <u>Análisis de expresión génica por PCR semicuantitativa</u>	37
3.4.2.8 <u>Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa</u>	39
3.4.2.9 <u>Medición del nivel de expresión de genes</u>	40
3.5 <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	40
3.5.1 <u>Análisis realizados</u>	40
3.5.2 <u>Modelo estadístico</u>	41
4. <u>RESULTADOS</u>	42
4.1 <u>EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN RACIMOS APLICADOS Y NO APLICADOS CON ABA</u>	42
4.1.1 <u>Antocianos totales</u>	42
4.1.2 <u>pH, °Brix y prolina</u>	42
4.1.3 <u>Aminoácidos totales</u>	43
4.1.4 <u>Relación azúcares-acidez</u>	43
4.1.5 <u>Relación ácido málico-ácido tartárico</u>	44
4.2 <u>EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE ABA, SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LA UVA</u>	44

4.2.1 <u>Antocianos totales</u>	44
4.2.2 <u>pH</u>	46
4.2.3 <u>°Brix, prolina y aminoácidos totales</u>	46
4.2.4 <u>Relación azúcares-acidez</u>	46
4.2.5 <u>Relación ácido málico-ácido tartárico</u>	47
4.3 <u>CLIMA</u>	48
4.4 <u>ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES</u>	49
4.4.1 Estado fenológico de la baya y eficiencia en la extracción de ARN	49
4.4.2 <u>Niveles de expresión</u>	50
5. <u>DISCUSIÓN</u>	53
5.1 <u>EVOLUCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BAYA</u>	53
5.1.1 <u>Azúcares y antocianos totales</u>	53
5.1.2 <u>Parámetros bioquímicos</u>	53
5.1.3 <u>Relación azúcares acidez</u>	54
5.1.4 <u>Relación ácido málico-ácido tartárico</u>	54
5.2 <u>EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO ABSCÍSICO</u>	54
5.2.1 <u>Azúcares y antocianos totales</u>	54
5.2.2 <u>Parámetros bioquímicos</u>	55
5.2.3 <u>Relación azúcares-acidez</u>	56
5.3 <u>ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES</u>	56
5.4 <u>OTROS FACTORES QUE PUDIERON INFLUIR EN LA COMPOSICIÓN DE LAS BAYAS</u>	57
5.4.1 <u>Factores climáticos</u>	57
5.4.2 <u>Recolección de racimos</u>	58
6. <u>CONCLUSIONES</u>	59
7. <u>RESUMEN</u>	60
8. <u>SUMMARY</u>	61
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	62

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Fechas de aplicación y recolección.....	29
2. Fechas de recolección y estado de los racimos recolectados para la medición de expresión de genes.....	31
3. Ecuaciones de las curvas de calibración de los ácidos orgánicos ($y = \text{área}$, en unidades arbitrarias y $x = \text{cantidad}$, mg/mL.....	36
4. Cebadores utilizados, largo del fragmento amplificado, y temperaturas de anealing utilizadas en la reacción de PCR.....	38
5. Cebadores usados para la PCR. <i>UB</i> (Ubiquitina), <i>PAL</i> (Fenilalanina amonio liasa), <i>CHS</i> (Chalcona sintasa), <i>CHI</i> (Chalcona isomerasa), <i>F3H</i> (Flavonona 3 hidroxilasa), <i>DFR</i> (Dihidroflavonol 4 reductasa), <i>DGK2</i> (Diacylglycerol kinase), <i>NCED1</i> (9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa).....	39
6. Concentración de antocianos totales (unidades/g peso seco) según momento de recolección de racimos y aplicación o no de ABA.....	43
7. pH, concentración de azúcares (°Brix) y prolina ($\mu\text{mol/g}$ peso seco) en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir según momento de recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica), en racimos aplicados y no aplicados con ABA. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey al 0.05.....	45
8. Cantidad de ARN extraído por muestra.....	49
 Figura No.	
1. Curva de crecimiento y cambios bioquímico-fisiológicos de una baya de uva durante el proceso de maduración.....	5
2. Ruta de biosíntesis de antocianos. Enzimas abreviadas (se resaltan las estudiadas en este trabajo): PAL , fenilalanina amonio liasa; C4H , Cinamato 4-hidroxilasa; 4CL , 4-cumarato: CoA ligasa; CHS , chalcona sintasa; CHI , chalcona isomerasa; F3H , flavonoide 3 hidroxilasa; DFR , Dihidroflavonol 4-reductasa; LDOX , leucoantocianidina oxidasa; UFGT , UDP Glc-flavonoid 3-O -glucosyl transferase.....	13
3. Serie climática de temperatura, precipitación y ETP, años 1971-2000, para Canelones.....	15

4. Cambios en la concentración de antocianos totales en la piel de bayas del cultivar Pinot Noir. LNT: bajas temperaturas nocturnas, LNT+ABA: bajas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA, HNT: altas temperaturas nocturnas, HNT+ABA: altas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA. El tratamiento con ABA a 250 ppm fue realizado en enero.....	22
5. Sólidos solubles totales (A) y acidez titulable (B) en uvas Pinot Noir. LNT: bajas temperaturas nocturnas, LNT+ABA: bajas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA, HNT: altas temperaturas nocturnas, HNT+ABA: altas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA. El tratamiento con ABA a 250 ppm fue realizado en enero.....	23
6. Cambios en acumulación de azúcares, acumulación de antocianos y concentración de ácido abscísico (ABA) durante el desarrollo de uvas Cabernet Sauvignon en la estación 2003/2004. El contenido de antocianos fue determinado por lectura de absorbancia a 520 nm. Las barras son los errores estándar. Envero corresponde a la semana 8 post-floración.....	24
7. Una planta de <i>Vitis vinifera</i> cv. Pinot Noir, mostrando portainjerto SO4, sistema de conducción en espaldera baja y poda Royat.....	27
8. Planta seleccionada a aplicar en cosecha tecnológica. En su brazo izquierdo se observan cintas blancas marcando los racimos elegidos para aplicar con ABA.....	28
9. Factores estudiados y sus niveles, para la determinación de parámetros bioquímicos en las bayas.....	30
10. Racimos recolectados en enero para la medición de expresión de genes. Izq.: racimo aplicado en cuajado. Centro: racimo no aplicado de planta de enero. Der.: racimo no aplicado de planta de vendimia.....	32
11. Concentración de antocianos totales (mg/L) en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir no aplicadas con ABA, según el momento de recolección de racimos (cuajado, envero y cosecha tecnológica). Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$).....	42
12. Relación azúcares-acidez en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir sin ABA, según momento de recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica).....	43
13. Relación ácido tartárico-ácido málico en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir sin ABA, según momento de recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica).....	44

14. Concentración de antocianos totales (mg/L) en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra rosada: no aplicado) en los tres momentos de aplicación (cuajado, envero y cosecha tecnológica). Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$), dentro de cada momento de aplicación y recolección.....	45
15. pH en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra roja: no aplicado) en los tres momentos de aplicación y recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica). Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$), dentro de cada momento de aplicación y recolección.....	46
16. Relación azúcares-acidez en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra roja: no aplicado) en los tres momentos de aplicación (cuajado, envero y cosecha tecnológica).....	47
17. Relación ácido tartárico-ácido málico en uvas <i>V. vinifera</i> cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra roja: no aplicado) en los tres momentos de aplicación (cuajado, envero y cosecha tecnológica).....	47
18. Temperatura máxima y mínima, y precipitación durante las etapas de cuajado, envero y vendimia (línea violeta: temperatura máxima, línea rosada: temperatura mínima, barras verdes: precipitación). Las flechas indican los momentos de aplicación en cuajado, envero y estado de vendimia. Datos proporcionados por la casilla meteorológica de Establecimiento Juanicó S.A. (20/11/2009-08/02/2010).....	48
19. Geles de agarosa mostrando la calidad del ARN extraído. I: Carril 1: ABA aplicado en envero, recolectado en cosecha tecnológica, carril 2: ABA aplicado en cuajado, recolectado en cosecha tecnológica, II carril 3: sin aplicación de ABA, recolectado en envero.....	49
20. Nivel de expresión de los genes <i>DFR</i> , <i>F3H</i> , <i>CHI</i> , <i>CHS</i> , <i>PAL</i> y <i>NCED1</i> , en muestras donde la recolección de racimos fue en envero (I) y en cosecha tecnológica (II), según tratamientos (AC: aplicado en cuajado, NA: no aplicado, AE: aplicado en envero).....	50

21. Nivel de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianos y ABA en
I: racimos sin aplicación de ABA, según momento de recolección de racimos (Barra violeta: recolectados en envero, barra azul: recolectados en cosecha tecnológica). II: racimos aplicados en cuajado y recolectados en envero, según aplicación o no de ABA (Barra roja: no aplicados, barra celeste: aplicados)..... 51
22. Nivel de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianos y ABA en
I: racimos aplicados o no aplicados en cuajado y recolectados en cosecha tecnológica, según aplicación o no de ABA (Barra roja: no aplicados, barra celeste: aplicados).
II: racimos aplicados o no aplicados en envero y recolectados en cosecha tecnológica, según aplicación o no de ABA (Barra roja: no aplicados, barra celeste aplicados)..... 52

1. INTRODUCCIÓN

La viticultura en Uruguay es un rubro que ha adquirido una importancia considerable; en el año 2010 se contabilizaron 1934 viñedos que ocupan una superficie de 8001 hectáreas. Estos se distribuyen casi exclusivamente en Canelones y Montevideo con el 66 y el 16 % de los viñedos respectivamente. Estos dos departamentos contribuyen con el 85 % del total de la producción del país, y de este total el 93 % corresponde a variedades para vinificar, el 3 % a variedades de mesa, y el 3.5 % a frutillas, híbridos tintos y blancos. El rendimiento de uvas para vino en el citado año, fue de 4.0 Kg/planta (INAVI, 2010).

De los 110.291.887 Kg de uva producidos en el 2010, el 79 % correspondió a uvas tintas y el 20.5 % a blancas (INAVI, 2010). Con respecto al vino elaborado ese año, un 40.4 % corresponde a vino rosado, un 33% a tinto, un 16% a clarete y un 10.7% a blanco.

Según datos de INAVI del año 2010, de las variedades tintas para vino, Tannat ocupa un 22.28% del total de la superficie y un 24.92% de la producción, seguida por Moscatel Hamburgo (para vino). Pinot Noir ocupa un 0.56% de la superficie y representa un 0.27% de la producción.

A la hora de la elección de una variedad se toman en cuenta muchos factores que inciden en la calidad del vino a obtener. Dentro de estos factores el desarrollo de color y el nivel y tasa de acumulación de azúcares son considerados determinantes de la calidad final de las uvas en general y de las tintas en particular.

Durante el desarrollo de la baya ocurren cambios en su tamaño y composición, y los más importantes se dan en la fase de madurez, donde resultan bayas más dulces, blandas y coloreadas (según variedades) que las presentes en etapas anteriores. Asociado a estos cambios también ocurren cambios en la concentración endógena de hormonas vegetales. Sacher (1973) afirma que la madurez es un proceso hacia la senescencia de los frutos, y que conlleva una disminución en el contenido endógeno de auxinas y un aumento de ABA en sus tejidos.

El color de los vinos tintos se debe esencialmente a los pigmentos de la piel de las uvas extraídos durante el proceso de vinificación. Los antocianos son los pigmentos predominantes en uvas tintas y negras. La acumulación cualitativa y cuantitativa de antocianos en la piel está asociada al cultivar, al estado de madurez de las bayas, a factores ambientales como temperatura y

luz, y a prácticas culturales en el viñedo (Mazza et al., 1993). Por ejemplo, las altas temperaturas (35°C) reducen el contenido total de antocianos comparado a temperaturas de 25°C (Mori et al., 2007). Las temperaturas superiores a 37°C impiden la maduración por una inhibición en la acumulación de azúcares, a su vez, la disminución en el contenido de la acidez es superior a temperaturas de 35°C que a 25°C y contenidos bajos en ácido málico son reportados cuando se incrementa la temperatura por una estimulación de la respiración, siendo el factor principal que incide sobre el pH (Bergquist et al. 2001, Cohen 2007). Además, las bajas temperaturas nocturnas durante la maduración aumentan el contenido final de polifenoles en la piel de las uvas (Mori et al., 2005). Por otro lado, la luz tiene el efecto de activar las enzimas correspondientes a la biosíntesis de antocianos (Haselgrove et al. 2000, Spayd et al. 2002, Downey et al. 2004).

Otro factor ambiental que influye en forma importante en la acumulación de antocianos en las uvas tintas es el estrés hídrico, aunque no es claro si interfiere en el metabolismo de la uva, o si simplemente actúa inhibiendo su crecimiento y por lo tanto concentrando los solutos que allí se acumulan (Castellarín et al., 2007). Según Deluc et al. (2009a), el déficit hídrico es uno de los factores ambientales con mayor impacto en el metabolismo de las uvas. Los cambios que ocurren en los componentes de la baya influyen en el color y calidad de los frutos, y por lo tanto del vino que con ellos se elabora. El déficit hídrico antes de envero ocasiona mayores concentraciones de antocianos y fenoles (Matthews y Anderson 1988, Matthews et al. 1990). El resultado del aumento de antocianos fueron diferencias de color tanto en déficit hídrico temprano y tarde en la estación (Matthews y Anderson 1988, Castellarín et al. 2007a, Deluc et al. 2009b).

Detrás de muchos de los cambios inducidos por el déficit hídrico se encuentra el ácido abscísico (ABA), esta hormona es clave en la regulación de la respuesta de las plantas al estrés osmótico en casi todos los tejidos (Seki et al., 2007). Su acumulación induce la expresión de genes y regula la actividad de varias proteínas vinculadas a procesos de fotosíntesis, fotoprotección y crecimiento. La participación del ABA en las respuestas inducidas por déficit hídrico ha llevado a pensar que esta hormona puede tener un rol importante en la acumulación de metabolitos secundarios en las bayas. En este sentido la aplicación de ABA a la piel de las uvas indujo la síntesis de antocianos (Hiratsuka et al., 2001). Este aumento se ha asociado a una respuesta fotoprotectora de las plantas frente al estrés (Merzlyak et al., 2008a, 2008b).

Pinot Noir es una variedad que no contiene pigmentos acilados (Fong et al., 1971). El contenido total de antocianos en vinos del cultivar Pinot Noir (copigmentos, antocianinas monoméricas y poliméricas) es más bajo que en

vinos de Merlot, Cabernet Franc o Cabernet Sauvignon. Esto contribuye a una densidad de color más baja, menor grado de enrojecimiento, y tono de color y brillo más altos (Cliff, 2006). Según Boulton (2001), la falta de color de esta variedad puede estar correlacionada a la incapacidad de formar antocianinas copigmentadas. En este sentido esta variedad aparece como un buen modelo para estudiar el efecto del ABA en la pigmentación de la baya.

En este estudio se investigó el efecto de la aplicación exógena de ABA a racimos de uvas del cultivar Pinot Noir, en tres momentos distintos del desarrollo de la baya sobre la acumulación de antocianos en la piel, la expresión de cinco genes estructurales de la ruta de biosíntesis de antocianos (PAL, CHS, CHI, F3H, DFR) y uno vinculado a la síntesis de ABA (NCED1) y otros parámetros bioquímicos en la pulpa. El objetivo final fue mejorar la coloración de las uvas de esta variedad, de manera de obtener vinos de mayor calidad. Además se avanzó en el estudio del comportamiento y adaptación de esta variedad en las condiciones de nuestro país.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROCESO DE MADUREZ DE LAS BAYAS Y HORMONAS VINCULADAS

El estudio del momento en que se alcanza la madurez comercial de las bayas ha sido de considerable interés científico, pero también industrial, ya que repercute en la comercialización de la fruta en fresco, en el procesamiento de la fruta seca y en la logística en la bodega. El grado y la tasa de madurez influyen en la calidad de los frutos obtenidos y en el estilo de vino elaborado (Davies y Bottcher, 2009).

La curva de crecimiento de la baya es una doble sigmoide separada por una fase lag. En la fase I las bayas aumentan su tamaño predominantemente por división celular, y en ésta se acumulan ácidos orgánicos, taninos e hidroxicinamatos. En la fase II o fase lag cesa la expansión celular y los azúcares se empiezan a acumular. El envero marca el comienzo de la tercera fase, donde ocurre un segundo período de crecimiento sigmoide, con una fuerte expansión de las células del mesocarpo, ablandamiento, acumulación de antocianos, componentes volátiles del aroma y azúcares, y un declive en la acumulación de ácidos orgánicos (Figura 1) (Deluc et al., 2007).

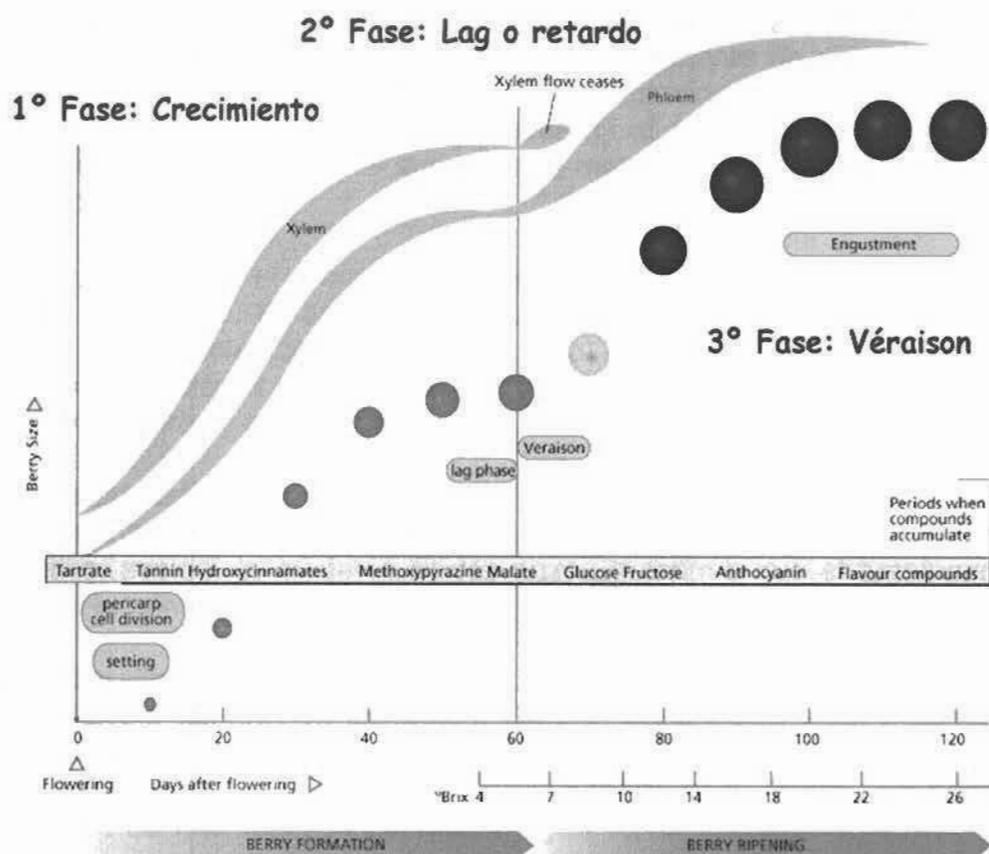


Figura 1. Curva de crecimiento y cambios bioquímico-fisiológicos de una baya de uva durante el proceso de maduración. Fuente: Ilustración de Koutroumanidis (2002).

Las hormonas claves que desencadenan el proceso de madurez de la vid siguen siendo objeto de debate (Davies y Bottcher, 2009). Si bien la baya de la vid es considerada como no climatérica, porque no exhibe pico de respiración en envero ni altos niveles de etileno comparado con frutos climatéricos, estudios recientes mostraron que existe un aumento en la evolución de etileno en envero o un poco antes (Chervin et al., 2004).

Estudios de Pilati et al. (2007) en Pinot noir y de Deluc et al. (2007) en Cabernet Sauvignon mostraron que los niveles de transcriptos y la actividad de las enzimas 1-aminociclopropano 1-carboxílico oxidasa (ACO) y 1-aminociclopropano 1-ácido carboxílico sintasa (ACS) claves en la síntesis de etileno, disminuyen después de envero, pero presentan picos antes de envero que podrían estar vinculados al rol del etileno en el control de la madurez de las bayas. Davies y Bottcher (2009) concluyen que es posible que las respuestas al etileno sean moduladas con cambios en la sensibilidad a la percepción de esta

hormona durante el desarrollo. La aplicación de CEPA (Ácido 2-cloroetil fosfónico), un compuesto producido por etileno, a las bayas de vid aumentó el color en un gran número de cultivares y la acumulación de sólidos solubles (Szyjewicz et al., 1984). Sin embargo El-Kereamy et al. (2003) determinó que los niveles de transcritos de CHS aumentaron mas rápido con la aplicación de etileno que con CEPA.

El rol del ABA en el proceso de madurez de las bayas es mucho más claro que el del etileno. El aumento en su concentración en envero junto al aumento en la acumulación de azúcares y al desarrollo de color (Hale y Coombe 1974, Kataoka et al. 1982, Okamoto et al. 2004), ha vinculado el ABA al proceso de madurez y a su inicio.

Los brasinoesteroides (BRs) son las últimas hormonas que se vinculan al proceso de madurez en las bayas de vid. La aplicación de brasinolida, que es el BR más activo, aceleró la madurez de las bayas, mientras que el brasinazole, inhibidor de la biosíntesis de BRs, la retrasó (Symons et al., 2006).

Las giberelinas (GAs) cumplen un rol importante en el cuajado y en el aumento inicial del tamaño de los frutos. Se han encontrado altos niveles de esta hormona en la pulpa de uvas con semillas en floración y en etapas tempranas del desarrollo (Zhang et al. 2003, Simons et al. 2006). Es posible que este patrón de acumulación de GAs indique su rol en retrasar la madurez de las bayas.

El nivel de auxinas es alto en etapas tempranas del desarrollo de las bayas y decae posteriormente llegando a niveles muy bajos en envero (Inaba et al., 1976). Numerosos estudios muestran que las aplicaciones de auxinas antes de envero retrasan la madurez actuando sobre la acumulación de azúcares y antocianos y reducen la acidez y los niveles de clorofila (Hale y Coombe 1974, Yakushiji et al. 2001, Ban et al. 2003, Jeong et al. 2004). Las citoquininas, al igual que las auxinas también son citadas como hormonas que promueven el crecimiento de la baya y tienden a inhibir su madurez.

2.2 ALGUNOS COMPONENTES DEL FRUTO Y SU EVOLUCIÓN EN EL PROCESO DE MADUREZ

2.2.1 Ácidos orgánicos

La acidez tiene un efecto importante sobre la calidad organoléptica de las uvas y la estabilidad física y biológica del vino. Los ácidos málico y tartárico suman más del 90% de los ácidos presentes en las bayas, y presentan diferentes patrones de acumulación en el ciclo de crecimiento del fruto (Terrier y Romieu, 2001).

El ácido tartárico se acumula rápidamente luego de antesis cuando la división celular ocurre a una tasa significativa. El aumento del contenido de azúcares provoca en muchas variedades la acumulación de agua y aumento del volumen celular, lo que provoca la disminución de la concentración de este ácido por dilución. Es así que durante la madurez su nivel permanece casi constante si es expresado por baya (Terrier y Romieu, 2001).

El contenido de ácido málico se duplica o triplica durante la primera fase de crecimiento del fruto (Steffan et al., 1975), disminuyendo su contenido por baya al comenzar la acumulación de azúcares, al igual que el ácido cítrico.

Según Coombe (1987), la acidez titulable se ve afectada negativamente por las altas temperaturas. Esto se explica porque el malato es el principal sustrato de la respiración durante la madurez, y la tasa de respiración se eleva con las altas temperaturas. Este hecho determina que al alcanzar la madurez, la concentración de tartárico supera la de malato (Terrier y Romieu, 2001).

Por otro lado, condiciones que favorecen el vigor y los altos rendimientos del viñedo generalmente están asociadas con el aumento de las concentraciones de malato a cosecha (Champagnol, 1984), a diferencia del contenido de tartrato, que no parece afectarse de manera marcada por los factores ambientales.

2.2.2 Aminoácidos

Del contenido total de nitrógeno (N) en el jugo de uva, los aminoácidos libres son los componentes principales (50-90%) (Castor 1953, Ough 1969, Kliewer 1968, 1969, 1970, Huang y Ough 1991). Si bien el contenido y composición de aminoácidos en las bayas depende de la variedad y el grado de madurez, casi siempre los predominantes son prolina y arginina (Stines, 2008). Este autor sostiene que las uvas maduras de Cabernet Sauvignon contienen

niveles muy altos de prolina y bajos de arginina, mientras que en las de Pinot Noir los niveles de ambos aminoácidos son moderados.

La acumulación de estos aminoácidos ocurre durante el proceso de madurez de las bayas. El estudio de las variedades Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Gewurztraminer y Muscato Gordo, muestra que la mayor parte de la prolina acumulada ocurre tarde en el desarrollo, alrededor de cuatro semanas luego del envero. Por el contrario, la arginina comienza a aumentar antes de envero, y continúa hasta la madurez, salvo en las variedades donde se llega a concentraciones de prolina muy altas, donde el nivel de arginina llega a un plateau relativamente temprano en el desarrollo (Stines et al., 2000).

2.2.3 Prolina

La acumulación de prolina en tejidos vegetativos en respuesta al estrés abiótico, particularmente al estrés hídrico, es un fenómeno conocido. Su actuación como osmolito y soluto compatible protege a la planta de los efectos adversos del estrés (Hare y Cress, Rhodes et al., citados por Van Heeswijck et al., 2001b), y su participación en rutas metabólicas centrales hace creer que incluso bajos niveles de acumulación, como el caso de la vid (Downton y Loveys, 1981), pueden ser biológicamente significantes (Hare y Cress, 1997).

El alto nivel de prolina libre encontrado en órganos y tejidos de ciertas plantas sin estrés, como en frutas maduras de vid, (Lafon-Lafourcade y Guimberteau 1962, Kliewer 1968, Ough y Stashak 1974), sugiere que este aminoácido puede tener un rol importante en el desarrollo y crecimiento normal de la planta, y que se sintetiza por vías metabólicas o procesos independientes de los que operan en respuesta al estrés (Stines et al., 1999b). Nanjo et al. (1999) concluye que la prolina tiene un papel único en la osmotolerancia así como en la morfogénesis, como un componente importante de las proteínas estructurales de la pared celular de las plantas.

La prolina puede ser sintetizada por la vía del glutamato o la vía de la ornitina (Verma y Zhang, citados por Van Heeswijck et al., 2001b). Los estudios de Kishor et al. (1995) en tabaco, y posteriormente los de Nanjo et al. (1999) en *A. thaliana*, confirman que la enzima P5CS (Δ^1 -pyrrolin-5-carboxylato synthetasa) es clave en la regulación y la velocidad de la ruta de biosíntesis de prolina vía glutamato.

La vía de la ornitina está vinculada al metabolismo de la arginina, y su significancia fisiológica en plantas no está aún clara. La enzima OAT (δ -ornitina amino transferasa), que cataliza la transaminación del grupo δ -amino de la ornitina a α -cetoglutarato, produciendo glutamato y GSA, ha sido estudiada en

hongos y mamíferos (Van Heeswijck et al., 2001a). Según Delauney et al. (1993), los niveles de transcripto de OAT se reducen en respuesta a estrés salino en *Vigna aconitifolia*, pero aumentan cuando las plantas se exponen a niveles excesivos de nitrógeno. Roosens et al. (1998) afirman que en *Arabidopsis thaliana* los niveles de ARNm de OAT aumentan en estrés salino cuando las plántulas tienen 20 días, pero no a las cuatro semanas de edad. Dado esto, es posible que OAT se relacione a la biosíntesis de prolina por estrés osmótico en plantas muy jóvenes, pero su rol principal se vincule al reciclaje de glutamato en presencia de altos niveles de N.

Stines, citado por Van Heeswijck et al. (2001b), demostró que los genes que codifican para las enzimas P5CS y OAT están presentes en el genoma de *V. vinifera*. Este mismo autor, en estudios de expresión de genes demostró que Vvp5cs (ADNc de P5CS) se expresa en las bayas, así como en otros tejidos de la vid. Sin embargo no obtuvo los mismos resultados para el transcripto Vvoat (ADNc de OAT) mediante Northern blot. La técnica de RT-PCR sí le permitió detectar Vvoat (ADNc de OAT) en bayas, flores, hojas y raíces, resultado confirmado luego en el cultivar Chardonnay por la detección de la proteína por Western blot.

El aumento en los niveles de prolina producto del avance en el desarrollo de las bayas no pudo ser atribuido a cambios en los niveles de ARNm Vvp5cs, ya que estos se mantienen constantes durante el desarrollo de las mismas. Estudios de proteína VVP5CS permitieron descartar también mecanismos de regulación post transcripcionales y post traduccionales como explicativos de cambios en los niveles de esta proteína y por lo tanto de prolina acumulada. (Stines et al., 1999b). Estos resultados sugieren que los mecanismos de regulación de acumulación de prolina durante el desarrollo de la planta son distintos a los que operan en respuesta al estrés abiótico.

2.2.4 Azúcares

La acumulación de azúcares en las bayas, junto con la de antocianos, son consideradas esenciales para la producción de fruta fresca y para la elaboración de vinos tintos. En particular, en la vinificación, los azúcares son los que determinarán los niveles de alcohol alcanzados durante el proceso de fermentación.

Los carbohidratos son producidos por fotosíntesis y luego exportados como sacarosa desde las hojas a las bayas vía floema (Swason y Elshishiny citados por Boss y Davies, 2001). Hasta envero, la mayoría del azúcar importado a las bayas es metabolizado, por lo que hay poca acumulación. Luego de envero hay un aumento constante en los niveles de azúcares

acumulados, predominantemente en forma de hexosas, glucosa y fructosa (Boss y Davies, 2001).

Numerosos estudios relacionan el aumento de azúcares y ABA con el comienzo del proceso de madurez en las bayas (Davies et al. 2007, Deluc et al. 2009, Wheeler et al. 2009). La aplicación de sacarosa y ABA a frutos inmaduros produjo cambios en la expresión de genes similares a los que ocurren al comienzo de la madurez, lo que demostró su rol en el control de este proceso (Gambetta et al., 2010).

2.2.5 Antocianos

2.2.5.1 Consideraciones generales

Los flavonoides constituyen una familia relativamente diversa de moléculas aromáticas que derivan de la fenilalanina y de la malonil-coenzima A. Estos componentes incluyen seis subgrupos que fueron encontrados en la mayoría de las plantas superiores: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonoles, antocianinas, y taninos condensados (o proantocianidinas) (Winkel-Shirley, 2001).

Los antocianos son extraídos principalmente de la piel de las uvas, y son los principales responsables del color del vino tinto. Además contribuyen al sabor y a las características químicas del vino por su interacción con otras moléculas, como fenoles incoloros, polisacáridos, metales y antocianinas (Mazza y Brouillard, 1987, 1990). Los antocianos inciden en el color de vinos jóvenes en un 50-70% (Boulton, 2001).

Además de la cantidad y tipo de antocianos también existen otros factores que inciden en la coloración del vino, como la presencia de pigmentos poliméricos, el pH del vino, la concentración de SO₂, el alcohol, los iones metálicos, la copigmentación, etc. (Versari et al. 2008, Dalla y Laureano 1994).

La copigmentación es una interacción molecular entre antocianinas y compuestos como flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos y antocianinas, entre otros (Lewis, 1995). Esto aumenta la intensidad de color y produce un cambio en la longitud de onda de absorción máxima, hacia valores mayores (efecto batocrómico) (Mazza y Brouillard, 1990). La proporción de la contribución de la copigmentación al color de los vinos jóvenes se estima en un 30-50%, mientras que en vinos de crianza contribuye con un 35-63% de su color (Boulton, 2001).

Además de asociaciones intermoleculares, también existen las intramoleculares, como la acilación o la glicosilación. En la acilación los residuos de azúcar que forman parte de las antocianidinas están acilados con ácidos; que en el caso de *Vitis vinifera* son el p-cumárico, cafeico y acético. Estas asociaciones le confieren estabilidad a la molécula de antocianina (Sarni-Manchado et al., 1996). Han et al. (2008) mostró que el color de varias antocianinas estuvo influenciado por la acilación, y proporcionó una base para dilucidar los efectos de las interacciones intramoleculares en el color de los vinos.

La acumulación de antocianos, como se puede ver en la Figura 1, comienza en enero, en el punto de partida del proceso de madurez de las bayas, y alcanza su valor más alto en general cuando la relación azúcares/acidez en el mosto es máxima (Togores, 2003). Mientras que tradicionalmente se utilizó este índice para determinar el momento de madurez tecnológica, en el presente es de suma importancia considerar también la madurez fenológica de las bayas.

Según Gonzalez Neves et al. (2006), en un estudio de tres años (2001-2003) en vides cultivadas en el sur de Uruguay, el promedio de contenido total de antocianos en la piel de las bayas, al estado de cosecha, fue de 2674,5 mg/L para Tannat, 1538,9 mg/L para Cabernet Sauvignon y 1151,5 mg/L para Merlot. Mazza et al. (1999) señalan que para Pinot Noir, el contenido total de antocianos fue de 753-803 mg/Kg, pero este valor es para las condiciones ambientales de la costa occidental de Canadá.

Además del contenido, la composición de antocianinas es un factor importante para la determinación de la calidad del vino, ya que cada antocianina tiene diferentes características en cuanto a color y estabilidad. Los tipos de antocianinas que acumula *V. vinifera* son 3- monoglucósidos, 3- acetilglucósidos, 3- p- cumaroilglucósidos, derivados de la delfidina, petunidina, cianidina, peonidina y malvidina (Mazza y Miniati, 1993). Han et al. (2008) determinó que la cianidina-3-O-glucósido es la que más influye en el color del vino, mientras que la malvidina-3-O-glucósido es la que influye menos.

Si bien la abundancia relativa de la acumulación de antocianinas está determinada por la variedad, las condiciones ambientales bajo las cuales se cultiva la vid influyen fuertemente sobre las mismas (Keller et al., 2004, 2005). La sequía, las altas temperaturas y la luz son los factores principales que afectan la biosíntesis de antocianos en vid (Spayd et al. 2002, Castellarín et al. 2007a).

2.2.5.2 Ruta de biosíntesis de antocianos

La ruta de biosíntesis de antocianos en las plantas requiere de dos tipos de genes. Los genes estructurales, que codifican para enzimas que participan directamente en la formación y almacenamiento de antocianos y otros flavonoides (Figura 2), y los reguladores, que regulan la expresión de los genes estructurales, y controlan la acumulación espacial y temporal de los pigmentos. (Holton y Cornish 1995, Winkel-Shirley 2001).

Esta vía es naturalmente muy ramificada; los primeros pasos de ella resultan en productos que son precursores para muchos tipos de componentes relacionados (Boss y Davies, 2001).

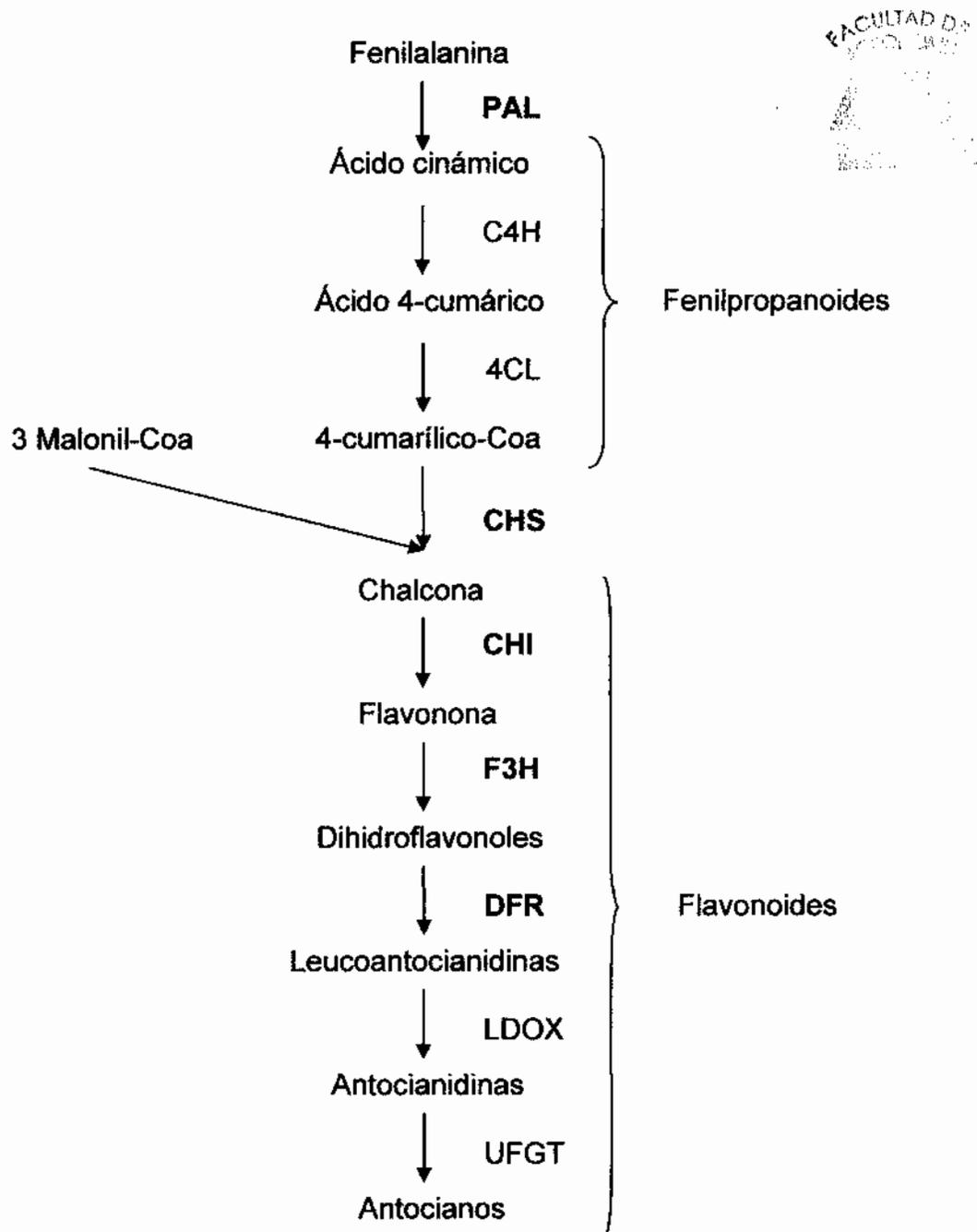


Figura 2. Ruta de biosíntesis de antocianos. Enzimas abreviadas (se resaltan las estudiadas en este trabajo): **PAL**, fenilalanina amonio liasa; **C4H**, Cinamato 4-hidroxilasa; **4CL**, 4-cumarato:CoA ligasa; **CHS**, chalcona sintasa; **CHI**, chalcona isomerasa; **F3H**, flavonoide 3 hidroxilasa; **DFR**, Dihidroflavonol 4-reductasa; **LDOX**, leucoantocianidina oxidasa; **UFGT**, UDP Glc-flavonoid 3-O -glucosyl transferasa. Fuente: elaborado en base a Jeong et al. (2004).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) es la primera enzima de la ruta, y cataliza la producción de ácido cinámico a partir de fenilalanina. Posteriormente actúan dos enzimas cuyos genes no han sido aislados en la vid (cinamato 4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumaratoCoA ligasa (4CL)), y la enzima chalcona sintasa (CHS) produce el primer flavonoide de la vía por condensación de p-cumárico-CoA con tres moléculas de malonil CoA (Kreuzaler y Hahlbrock, 1972). Las chalconas son convertidas a flavononas por la acción de la enzima chalcona isomerasa (CHI) (Moustafa y Wong, 1967). Flavonona 3-hidroxilasa (F3H) hidroxila flavononas para formar dihidroflavonoles (Forkmann et al., 1980). Luego enzimas determinan las especies de antocianinas producidas, y catalizan la hidroxilación del anillo B.

La enzima dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) cataliza el primer paso en la conversión de dihidroflavonoles en antocianinas (Stafford y Lester, 1982). Los próximos pasos en la producción de antocianinas no están bien caracterizados, aunque se sabe que involucran una hidroxilasa y una deshidratasa (Heller y Forkmann, citados por Boss y Davies, 2001). Las antocianidinas formadas se estabilizan mediante la adición de una glucosa en la posición 3 del anillo de carbono, reacción catalizada por UDP-glucosa: flavonol 3-O-glucosyltransferasa (UFGT) (Larson y Coe, 1977). Finalmente ocurre una conjugación glutatión por la enzima glutatión S-transferasa (GST) y mediante una bomba de glutatión se realiza el transporte de las antocianidinas a la vacuola de las células. Este sistema de transporte es similar al que utilizan las plantas para reconocer, transportar, y metabolizar herbicidas y xenobióticos, y parece ser la forma en que la misma se protege de las antocianinas, tóxicas para sus células (Marrs, 1996).

Existen dos fases marcadas en la expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianos. Antes de envero todos los genes se expresan salvo el UFGT, seguido de una reducción en la expresión en la etapa lag. Después de envero todos los genes se inducen de forma coordinada, lo que sugiere la acción de genes reguladores. A partir de este momento se da la acumulación de antocianos en la piel de las uvas (Boss et al., 1996). Sin embargo, Ban et al. (2003) proponen que todos los genes, salvo el UFGT, se expresan continuamente durante el desarrollo de las bayas.

2.3 FACTORES AMBIENTALES Y LA ACUMULACIÓN DE ANTOCIANOS Y OTROS METABOLITOS

2.3.1 Temperatura

Según Coombe (1987), Mullins et al. (1992), la acumulación de antocianos en la piel de las bayas está generalmente influenciada por la temperatura durante el período de maduración.

En Uruguay, los períodos de altas temperaturas son comunes en verano, por lo que debe ser considerada al estudiar el metabolismo de las bayas. El sur de Canelones corresponde a la región climática vitícola IH3IF2IS1 (Templado, Noches templadas y Sequía moderada), definidas según el método CCM (Tonietto y Carbonneau, 2004) y modificado para Uruguay por Ferrer (2007) (Figura 3).

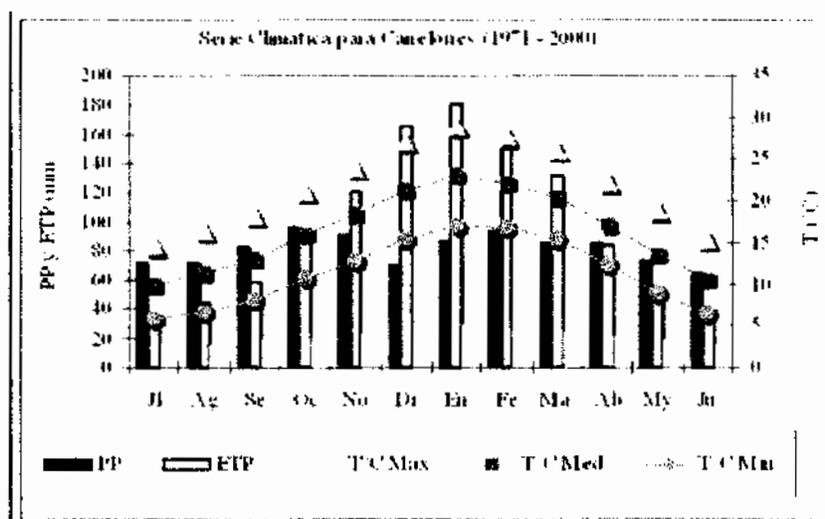


Figura 3. Serie climática de temperatura, precipitación y ETP, años 1971-2000, para Canelones. Fuente: Ferrer et al. (2011).

La temperatura óptima de síntesis de antocianos en las bayas se encuentra entre los 15 y 27°C, produciéndose la degradación de estos compuestos a temperaturas mayores a 30°C (Mori et al., 2007). Tomana et al. (1979) sostienen que las noches cálidas redujeron el contenido de antocianos en uvas de mesa 'Kyoho' (*Vitis labruscana* x *Vitis vinifera*), y posteriormente Mori et al. (2005) concluyen lo mismo para uvas Pinot Noir. Por otra parte, Haselgrove et al. (2000), Spayd et al. (2002), Downey et al. (2004) proponen

que en regiones cálidas la acumulación de antocianos se ve inhibida en la piel de las bayas tintas. Un estudio reciente ha demostrado que la expresión de los genes CHS, DFR y UFGT de la síntesis de antocianos están correlacionados negativamente con las altas temperaturas, y que existe una pérdida de antocianos en la piel debido a estas (Mori et al., 2007).

2.3.2 Luz

Según Spayd et al. (2002) la exposición a la luz solar aumentó la concentración total de antocianinas monoméricas en las bayas. Sus resultados confirman que los racimos expuestos tuvieron concentraciones de flavonoides diez veces mayores a los sombreados. Jeong et al. (2004) reportaron que el sombreado suprimió y retardó la expresión de CHI, CHS, DFR, F3H, LDOX, UFGT, así como la acumulación del mRNA VvmybA1, un supuesto gen regulador de la ruta de biosíntesis de antocianos en uvas. Keller y Hrazdina (1998) estudiaron el efecto de la luz y el nivel de nitrógeno sobre el contenido de antocianos y compuestos fenólicos durante el desarrollo de la vid. Estos autores concluyeron que las bajas intensidades de luz en envero restringen la acumulación de fenoles, y este efecto fue más severo en presencia de altos niveles de nitrógeno. El contenido de malvidina aumentó a altos niveles de nitrógeno y fue predominante al imponer también condiciones de baja intensidad de luz.

2.3.3 Déficit hídrico

2.3.3.1 Efecto sobre la acumulación de antocianos

De los factores ambientales que afectan la composición de antocianos de los frutos durante su proceso de madurez, el déficit hídrico es el más importante. Si bien *Vitis vinifera* L. tiene una tolerancia relativamente alta a la sequía, hay tres momentos en su desarrollo que pueden afectar considerablemente el tamaño de la baya y su composición; ellos son floración, envero y cosecha (Roby et al. 2004, Keller et al. 2005, Ojeda 2005).

Ojeda et al. (2002), sostienen que el efecto del déficit hídrico sobre la biosíntesis de compuestos fenólicos depende de la magnitud del déficit y del momento en el cual ocurre. Déficits medios entre antesis y envero, y severos entre envero y cosecha produjeron mayor cantidad de flavonoides que el control sin déficit y que un déficit severo entre antesis y envero. Con respecto al contenido de antocianos, éste aumentó sólo cuando el déficit hídrico fue severo y tardío. Sin embargo, según Matthews et al. (1988, 1990), el déficit hídrico antes de envero aumentó las concentraciones de antocianos y fenoles. Según Merzlyak et al. (2008a, 2008b) el aumento de la concentración de antocianos es

una respuesta común en plantas estresadas y probablemente funcione como fotoprotector. En variedades tintas esto sirve para oscurecer el color, que es percibido como un indicador de calidad por el consumidor. Winkel-Shirley (2002) sostiene que se están logrando avances para entender como las plantas controlan el tipo y cantidad de flavonoides que son producidos en respuesta a señales diferentes.

Castellarín et al. (2007a) demostraron que el déficit hídrico cambia la abundancia de transcritos de genes relacionados a la biosíntesis de antocianos en la piel de las bayas, acelerando este proceso. Borsani et al. (2010), en condiciones de déficit hídrico cercano a envero, concluyeron que la inducción de la expresión de los genes CHS, F3H, DFR y UFGT de síntesis de antocianos fue mayor y se dio más tempranamente. Estos autores encontraron que cuando la restricción hídrica era en cosecha hubo una mayor expresión de genes, con la excepción de UFGT, pero sin alcanzar los resultados obtenidos en envero. Los distintos momentos de imposición del déficit hídrico no produjeron diferencias en el contenido total de antocianos, pero si en el perfil de antocianos individuales.

Además de la acción directa sobre la biosíntesis de compuestos fenólicos, el déficit hídrico actúa aumentando la relación piel/pulpa con respecto a las bayas con adecuado suministro de agua (Ojeda et al. 2002, Roby et al. 2004), incrementando de forma indirecta la cantidad de taninos y antocianos en la piel. En estudios realizados por Matthews et al. (1988), si bien el déficit hídrico después de envero disminuyó en menor medida el peso de la baya, también aumentó sustancialmente el contenido de antocianos.

2.3.3.2 Efecto sobre otros metabolitos

Según Cramer et al. (1997) el metabolismo energético fue fuertemente activado por estrés, así como la acumulación de ABA y etileno. Comparado con el estrés salino, el estrés hídrico produjo mayores concentraciones de glucosa, malato y prolina, y una mayor y más rápida inhibición de elongación de brotes. Vincent et al. (2007) señalan que la inhibición de la elongación de brotes estuvo relacionada a un decrecimiento en la cantidad de proteínas involucradas en fotosíntesis y síntesis proteica. Las proteínas sobre expresadas en la variedad Cabernet Sauvignon estuvieron involucradas en el metabolismo proteico, mientras que en las proteínas sobre expresadas en Chardonnay no se pudo identificar su función. Bowen et al. (2011) sostienen que el déficit hídrico redujo la conductancia estomática y el intercambio gaseoso, pero que también ocurrió esto en el tratamiento control en la fase *lag*, aumentando estos niveles luego de envero. Según Matthews et al. (1998) el déficit hídrico antes de envero produce una fuerte disminución de la concentración de malato. Okamoto et al. (2004)

comprobaron que en uvas de la variedad Chardonnay aumenta el contenido de aminoácidos al imponer estrés hídrico después de envero, sin embargo esto no sucede con la prolina.

En un estudio de Deluc et al. (2009a) sobre los efectos del déficit hídrico en el metabolismo de los cultivares Cabernet Sauvignon y Chardonnay, se concluye que la sequía tiene impactos sobre el aroma y calidad de las uvas y posteriormente del vino. Estas respuestas dependen del cultivar y de su color. En Cabernet Sauvignon, el déficit hídrico produjo un aumento de casi el doble en la concentración de ABA, y aumentó el contenido de prolina, azúcares, y acumulación de antocianos, comparado al control irrigado. En Chardonnay el déficit hídrico produjo una disminución de la concentración de ABA en envero y poco tiempo después, y no hubo efecto sobre la concentración de azúcares, prolina y antocianos (irrelevante para este cultivar por su imposibilidad de producir antocianinas). Se activaron parte de las rutas metabólicas de fenilpropanoides, energía, carotenoides e isopropanoides que contribuyeron al aumento en las concentraciones de anteraxantinas y flavonoides. También aumentaron en esta variedad los transcriptos de genes vinculados al metabolismo de los ácidos grasos que afectan los aromas de las uvas y del vino. En ambas variedades el déficit hídrico afectó la ruta metabólica de síntesis de ABA. Hubo una alta correlación entre la concentración de ABA y la abundancia del transcripto *NCED1* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenasa).

2.3.3.3 El ABA como respuesta al déficit hídrico

Originalmente se creyó que el ABA estaba involucrado en la abscisión de los frutos y la dormancia de las plantas leñosas, pero su rol en estos procesos aún no está claro. Sin embargo sí se sabe que es necesario para el desarrollo de las semillas, la adaptación a distintos estreses abióticos, y la señalización celular dependiente de azúcares. Estos procesos están en gran parte mediados por cambios en la síntesis de novo de ABA (Schwartz et al., 2003).

Según Seki et al. (2007) el ABA es una hormona central en la regulación de la respuesta de la planta al estrés osmótico, y varias enzimas de su ruta de biosíntesis y catabolismo han sido identificadas en presencia de estrés hídrico. El ABA opera a nivel de toda la planta, regulando el crecimiento de hojas y raíz (Munns y Cramer, 1996), así como la transpiración y la pérdida de agua a través del cierre de estomas. Estos autores señalan que los niveles de ABA aumentan en la savia del tejido xilemático en suelos con sequía o salinidad, y se acumula en el floema, controlando el crecimiento de hojas y raíces por mecanismos aún no conocidos. Yang et al. (2006), Seki et al. (2007) reportan que el ABA también actúa a nivel molecular mediante la regulación de la

transcripción de genes, síntesis proteica, señalizador de rutas metabólicas, productor de protectores contra la deshidratación y foto-inhibición.

En hojas y xilema donde aumenta la concentración de ABA en respuesta a este tipo de estrés (Okamoto et al. 2004, Pou et al. 2008). Antolin et al. (2003) sostienen que el ABA es transportado desde las hojas a las bayas antes de envero. La concentración de ABA en la savia del xilema está altamente correlacionada con su concentración en las bayas, sobre todo en las etapas tardías de desarrollo del fruto (envero y cosecha). Un ensayo realizado por Kataoka et al. (1982) con defoliación al comienzo de la madurez de las bayas, se inhibió completamente la síntesis de antocianos en la piel de las bayas, y disminuyó el contenido de sólidos solubles y acidez titulable en la pulpa con respecto al control. Los niveles de ABA endógeno en la piel y pulpa no aumentaron durante la madurez. La acumulación de antocianos fue recuperada al aplicar ABA exógeno, lo que permitió concluir que la acumulación de ABA en la piel resulta un factor determinante en la síntesis de antocianos. Sin embargo, Okamoto et al. (2004) demostraron que si bien el estrés puede aumentar los niveles de ABA en toda la planta, el ABA puede ser producido dentro del fruto como respuesta a la alteración del estado hídrico, y no importado del resto de la planta.

2.4 PINOT NOIR

Pinot Noir es una variedad de origen francés, su nombre proviene de *Pinot* (Pino, del francés *Pinus*, por sus racimos compactos y cónicos) y *noir* (negro, pues es una variedad tinta). Es de ciclo vegetativo corto y junto al Chardonnay son las uvas que se usan para la producción de Champagne (Arango, s.f.).

Pinot Noir es una de las variedades más selectas a nivel mundial para la elaboración de vinos varietales, algunos de los más exclusivos y caros del mundo. Sin embargo, no se adapta bien a cualquier región, y requiere climas fríos para la buena maduración de sus bayas. Su vinificación en tinto da como resultado vinos de color poco intenso y mediana concentración tánica (LaMar, s.f.).

La variedad de vid es uno de los factores más importantes que afectan la composición de la uva, ya que la síntesis y acumulación de varios componentes de la baya están determinados genéticamente. La piel de las bayas de Pinot Noir solo acumulan cinco antocianinas: 3- monoglucósidos de delfidina, petunidina, cianidina, peonidina y malvidina (Fong et al., 1971). Estas últimas dos son las antocianinas más metiladas (Mazza y Miniati, 1993), lo que les

confiere mayor estabilidad térmica (Shackman y Smith, 1996), y son las más abundantes en esta variedad.

Boulton (2001) reporta que la falta de color de esta variedad puede estar correlacionada a la incapacidad de formar antocianinas copigmentadas ya que Pinot Noir solo contiene antocianinas no aciladas (Fong et al., 1971).

El perfil de antocianos tan simple de Pinot Noir, sumado al hecho del problema en la toma de color de esta variedad año tras año en el establecimiento donde se realizó este trabajo¹, hizo que Pinot Noir resultara un buen modelo para la investigación de los efectos del ABA sobre la acumulación y expresión de genes de estos pigmentos.

2.4.1 Antocianos y parámetros bioquímicos en Pinot Noir

Los factores ambientales nombrados anteriormente, que inciden sobre la concentración de antocianos y parámetros bioquímicos en las bayas, serán referidos en esta sección para Pinot Noir de acuerdo a estudios específicos encontrados para esta variedad.

2.4.1.1 Efecto del vigor sobre la acumulación de antocianos, pH, y acidez titulable en Pinot Noir

Cortell et al. (2007) estudiaron el efecto del vigor de las plantas de la variedad Pinot Noir sobre la concentración de antocianos y la composición de la fruta. Concluyeron que, al igual que lo encontrado en otras variedades, las plantas crecidas con mayor vigor dan menores valores de °Brix, mayores de acidez titulable (mg/L), y una tendencia a valores más bajos de concentración de antocianos. A su vez, en zonas de bajo vigor, y en las de mayor exposición a la luz y mayor temperatura, encontraron mayores contenidos de malvidin-3-O-glucoside y menores de peonidin-3-O-glucoside.

2.4.1.2 Efecto del sombreado y temperatura sobre la acumulación de flavonoides en Pinot Noir

Cortell et al. (2006) estudiaron el efecto del sombreado sobre la acumulación de flavonoides en bayas de la variedad Pinot Noir. Según estos autores, el sombreado de racimos produjo decrementos sustanciales en el contenido de flavonoles y proantocianidinas en la piel, y mínimas diferencias en acumulación de antocianos. Con respecto a las antocianidinas, el contenido de

¹ Comunicación personal (Blumetto G., 2009)

de delphinidina, cianidina, petunidina, y malvidina fueron proporcionalmente menores, y hubo un gran aumento de peonidina.

Pastor del Río y Kennedy (2006) afirmaron que un aumento de calor entre cuajado y envero en esta variedad se asoció con un aumento en el contenido de proantocianidinas en las uvas y el vino.

2.4.1.3 Efecto de la temperatura y el ABA sobre la acumulación de antocianos, pH, y acidez titulable en Pinot Noir

Mori et al. (2005) estudiaron el efecto de la temperatura y el ácido abscísico sobre la concentración de antocianos totales en la piel de uvas de la variedad Pinot Noir (Figura 4), sobre la acidez titulable y sólidos solubles en la pulpa (Figura 5), y sobre la composición de antocianinas de las mismas. Estos autores encontraron que la concentración de antocianos totales aumenta luego de envero, dándose su máximo 24 días luego de la aplicación, para luego mantenerse constante o decrecer mínimamente (LNT y HNT respectivamente). La concentración de antocianos totales alcanzados fue más baja a HNT. La aplicación de ABA hizo que la concentración de antocianos totales aumentara hasta los 36 días luego del tratamiento, tanto a LNT como a HNT. Por lo tanto, aumentó la acumulación de antocianos con la aplicación de ABA a altas temperaturas nocturnas.

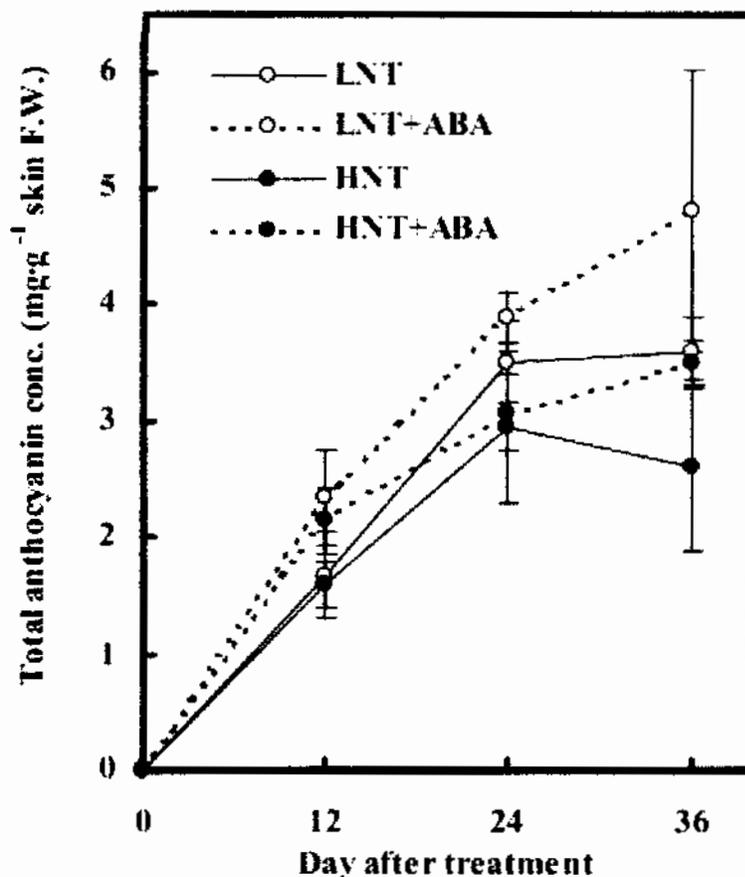


Figura 4. Cambios en la concentración de antocianos totales en la piel de bayas del cultivar Pinot Noir. LNT: bajas temperaturas nocturnas, LNT+ABA: bajas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA, HNT: altas temperaturas nocturnas, HNT+ABA: altas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA. El tratamiento con ABA a 250 ppm fue realizado en enero. Fuente: Mori et al. (2005).

De acuerdo a lo comunicado por Coombe (1987), a LNT el contenido de sólidos solubles es mayor que a HNT, lo que puede estar asociado a una mayor tasa de translocación de azúcares a los frutos. El ABA no tuvo efecto sobre el contenido de sólidos solubles a ninguna temperatura nocturna, coincidiendo con lo reportado por Kataoka et al. (1982).

La acidez titulable de las bayas es más baja a HNT que a LNT, lo que concuerda con la observación de Coombe (1987) sobre la correlación negativa de la acidez titulable con la temperatura debido al aumento en la tasa respiratoria y a la utilización del malato como sustrato en dicho proceso. El ABA no tuvo efecto en la acidez titulable a ninguna temperatura nocturna, coincidiendo con lo reportado por Kataoka et al. (1982).

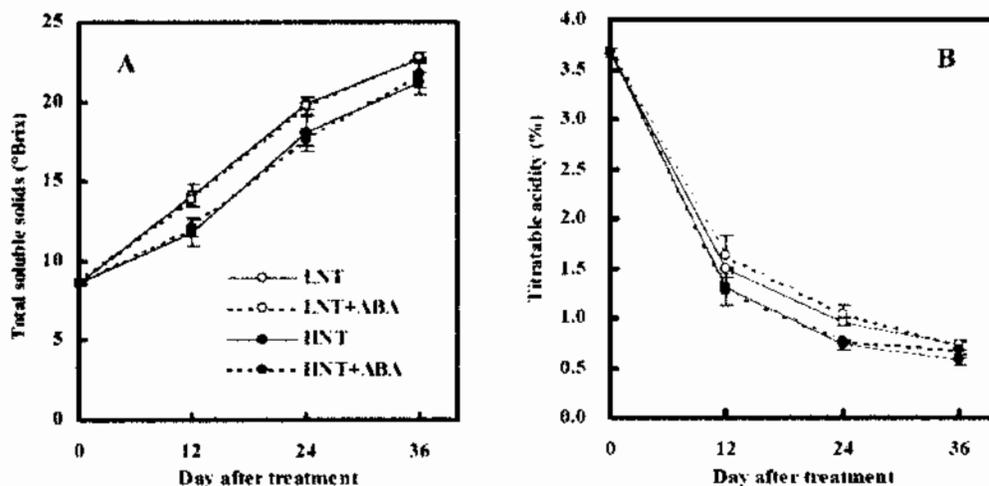


Figura 5. Sólidos solubles totales (A) y acidez titulable (B) en uvas Pinot Noir. LNT: bajas temperaturas nocturnas, LNT+ABA: bajas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA, HNT: altas temperaturas nocturnas, HNT+ABA: altas temperaturas nocturnas con tratamiento de ABA. El tratamiento con ABA a 250 ppm fue realizado en enero. Fuente: Mori et al. (2005).

Con respecto al efecto de la temperatura nocturna y el ABA sobre la composición de antocianinas, no se observaron diferencias significativas en malvidina y peonidina. En las restantes tres la HNT causó una marcada disminución con respecto a LNT. La aplicación de ABA aumentó la concentración de las cinco antocianinas, pero la acumulación de delfidina, petunidina y cianidina a HNT+ABA no alcanzó la de LNT (Mori et al., 2005).

2.5 ÁCIDO ABCISÍCO

2.5.1 Síntesis y evolución en el fruto

El ABA está involucrado en el control de la madurez de las bayas. Inaba et al. (1974) encontraron que el contenido de ABA aumenta durante el proceso de senescencia, y que las plantas inducen su senescencia bajo tratamientos de ABA.

En estudios realizados por Taylor y Smith (1967) se plantea una ruta indirecta para la síntesis de ABA a partir de la escisión de carotenoides. En esta ruta metabólica, las enzimas NCEDs (9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa) catalizan el paso limitante (Schwartz et al., 2003), y la abundancia de transcritos en *A. thaliana* aumenta en presencia de déficit hídrico (Endo et al., 2008).

Wheeler et al. (2009), encontraron que los niveles de ABA son altos en frutos jóvenes y luego decrecen para aumentar marcadamente después de envero, donde aumenta también el color de la piel y la acumulación de azúcares (Figura 6). Después de este pico, el nivel de ABA decrece llegando a valores bajos al estado de cosecha, lo que indica que no son requeridos altos niveles de ABA para mantener el estado de madurez.

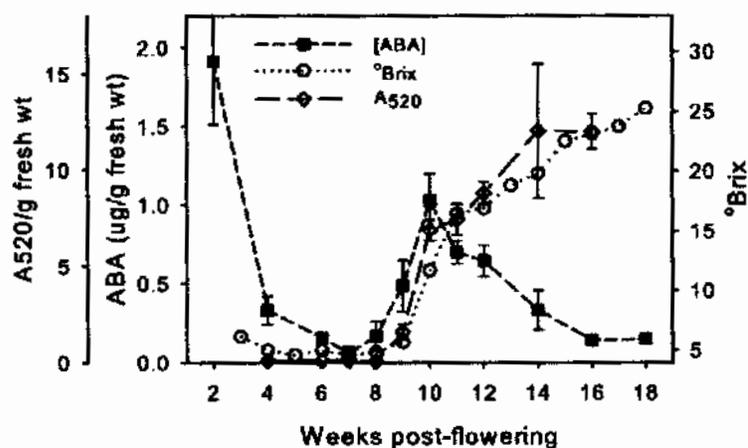


Figura 6. Cambios en acumulación de azúcares, acumulación de antocianos y concentración de ácido abscísico (ABA) durante el desarrollo de uvas Cabernet Sauvignon en la estación 2003/2004. El contenido de antocianos fue determinado por lectura de absorbancia a 520 nm. Las barras son los errores estándar. Envero corresponde a la semana 8 post-floración. Fuente: Wheeler et al. (2009).

Este patrón de acumulación de ABA se mantuvo constante durante los tres años del ensayo, lo que indica que las variaciones climáticas no influyen de forma significativa, y que este proceso estaría controlado genéticamente.

2.5.2 Aplicaciones de ABA como herramienta tecnológica

Si bien no hay evidencia de interacción directa entre vías hormonales en el proceso de desarrollo de las bayas, hay reportes que indican que la aplicación de una hormona puede alterar la acumulación de otra, lo que complica la interpretación de los resultados obtenidos en este tipo de experimentos (Davies y Bottcher, 2009).

Inaba et al. (1974) encontraron que el ABA acelera el proceso de madurez del fruto cuando se realizan aplicaciones de esta hormona dentro de las dos semanas antes de envero. Cantín et al. (2007), encontraron que en la variedad de mesa 'Crimson Seedless', la aplicación de ABA a 150 ppm permitió cosechar la fruta diez días antes que el control sin aplicar, y en la aplicación a 300 ppm se logró calidad comercial treinta días antes. También sostienen que los tratamientos de aplicación de ABA dieron mejor apariencia de bayas y raquis que a los que se le aplicó Ethephon, concluyendo que el ABA es una alternativa efectiva al Ethephon para aumentar color y mantener la calidad de las uvas de esta variedad luego de la cosecha.

Según Castellarín et al. (2007a), tanto el ABA como azúcares podrían actuar como señalizadores para acelerar el desarrollo de antocianos; el agregado de ABA y ramnosa a la piel de las uvas indujo la biosíntesis de antocianos de manera sinérgica (Hiratsuka et al., 2001). Hale y Coombe, citado por Wheeler et al. (2009), During et al. (1978), Matsushima et al. (1989), encontraron que la aplicación de ABA puede aumentar tanto la acumulación de antocianos como de azúcares en frutos. Sin embargo el efecto del incremento de color es más significativo (Pirie y Mullins 1976, Kataoka et al. 1982, Yakushiji et al. 2001, Mori et al. 2005, Cantín et al. 2007, Peppi et al. 2007, Peppi et al. 2008a). Peppi et al. (2008b) concluyen que la piel de las bayas tratadas con ABA tuvo menor luminosidad y tono en la primer semana luego de la aplicación, y mantuvo un color más rojizo y oscuro durante todo el experimento.

Peppi et al. (2006, 2007) sostienen que el momento de la aplicación y la concentración de ABA para aumentar color depende de la variedad. Es así que Peppi et al. (2008a) encontraron que para 'Crimson Seedless' el pico máximo de acumulación de antocianos se da al tratar con ABA en envero, pero que las aplicaciones luego de envero también aumentan la acumulación de antocianos.

Sandhu (2010), concluye que la aplicación exógena de ABA durante y después de envero aumentó significativamente las antocianinas individuales en bayas del cultivar "Noble", aumentando también su capacidad antioxidante y su contenido de fenoles. El mismo autor sostiene que esos cambios son generalizados para las variedades muscadinas, pero varían de acuerdo al cultivar. Kataoka et al. (1982) afirma que la aplicación de ABA a 1000 ppm al comienzo del proceso de madurez aumenta la acumulación de antocianos en la piel.

En las aplicaciones de ABA tempranas, la concentración de esta hormona tiende a hacerse asintóticos al acercarse al estado de cosecha, donde ya no hay diferencias entre tratar y no tratar con ABA. Estas diferencias se pueden mantener si también se realizan aplicaciones más tarde en el desarrollo (Wheeler et al., 2009).

Ban et al. (2003), concluye que el ABA aumenta el contenido de antocianos en la piel de las bayas, y la expresión de los genes *PAL*, *CHS*, *CHI*, *DFR* y *UFGT* de la ruta de biosíntesis de antocianos. Según Peppi et al. (2008a) el nivel de ARNm *UFGT* de 'Crimson Seedless' aumentó dentro de la primer semana de realizado el tratamiento con ABA, para volver a niveles normales luego de las tres semanas. Más del 80% de la variación del contenido de antocianos está explicada por una relación lineal con la integral de la acumulación de ARNm (Castellarín et al., 2007b).

Wheeler et al. (2009) concluyeron que aplicaciones de ABA tres, dos y una semana antes de envero, produjeron un aumento significativo en los niveles de ABA, una semana antes de envero, comparados al control sin tratar. Luego de dos semanas de tratar los racimos con ABA, los niveles de transcritos de *NCED1* y *NCED2* aumentaron en la piel y pulpa de las bayas. Estos tejidos tuvieron mayores niveles de ABA, lo que sugiere que la aplicación exógena pudo actuar como una retroalimentación positiva que elevó los niveles de estos transcritos y aumentó el proceso de biosíntesis. Aún así, los patrones de expresión de estos genes no se correlacionaron con cambios en los niveles de ABA durante el desarrollo de las bayas, concluyendo que es incierta la fuente de donde provino el ABA que se acumuló en las bayas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Se trabajó con plantas de *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, de 12 años de edad, ubicadas en el cuadro N° 33 del viñedo de Establecimiento Juanicó (ruta 5 Km 38, Canelones, Uruguay, 34°35'S-56°15'W). Las cepas están injertadas sobre el portainjerto SO4, y el sistema de conducción es espaldera baja con poda Royat (Figura 7).



Figura 7. Una planta de *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, mostrando portainjerto SO4, sistema de conducción en espaldera baja y poda Royat.

El cuadro es de 1,27 ha, y el marco de plantación de 2,5 x 1,25 m, totalizando 4064 plantas. Dichas plantas no cuentan con sistema de riego.

3.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Diseño del experimento a campo

Se eligió una fila de plantas descartando las filas del borde del cuadro y las que tenían plantas muy diferentes en tamaño; en esta fila se asignaron al azar seis plantas por tratamiento, es decir, seis plantas a aplicar ABA en cuajado, seis plantas a aplicar ABA en envero, y seis plantas a aplicar ABA en vendimia. Se colocaron cintas de colores en el pie de cada planta para identificar cada tratamiento. Se tuvo el cuidado de no elegir dos plantas continuas por posibilidades de deriva del producto a aplicar. De esta forma, las plantas elegidas quedaron separadas por dos o tres plantas no correspondientes al experimento. Posteriormente se eligió aleatoriamente un brazo de cada planta para los tratamientos de aplicación de ABA, y el otro brazo para la obtención de los racimos sin aplicar. Tanto los racimos a aplicar como los no aplicados fueron los primeros de cada uno de los cuatro mejores pámpanos, y se marcaron también con cintas para su identificación (Figura 8).



Figura 8. Planta seleccionada a aplicar en cosecha. En su brazo izquierdo se observan cintas blancas marcando los racimos elegidos para aplicar con ABA.

Las muestras fueron los racimos enteros, debido al pequeño tamaño de los mismos que permitió considerar baja la variabilidad dentro de ellos. Se retiraron de la planta con un corte del pedicelo a 2-3 cm del extremo superior de la infrutescencia. En el caso de recolectar dos racimos aplicados de la misma planta (o dos racimos no aplicados de la misma planta), debido al pequeño tamaño de los mismos, se trataron como una única muestra al mezclar sus bayas para la posterior realización de las determinaciones analíticas.

Los estados fenológicos de cuajado y envero se asignaron de acuerdo a lo propuesto por Eichhorn y Lorenz (1977), donde el estado de cuajado correspondió al 27 y el de envero al 35 en dicha escala. El estado de cosecha tecnológica fue el definido por Establecimiento Juanicó considerando las relaciones entre azúcares, acidez total y pH de acuerdo a la O.I.V. (2007).

La recolección de los racimos aplicados en cuajado, envero y vendimia, y de los no aplicados, se hizo pocos días luego de la aplicación (2-4 días, fechas en Cuadro 1), para lo cual se cortó uno o dos racimos aplicados y uno o dos racimos no aplicados de cada una de las seis plantas correspondientes a cada momento de aplicación. En las plantas aplicadas en cuajado y envero, el resto de los racimos aplicados con ABA y no aplicados se recolectaron también en cosecha tecnológica, para comparar los resultados con la recolección 2-4 días después de la aplicación, y evaluar si la respuesta al ABA fue inmediata o no (Figura 3).

Cuadro 1. Fechas de aplicación y recolección.

Momento de aplicación/recolección		Fechas de aplicación/recolección
CUAJADO	Aplicación	20 de noviembre de 2009
	Recolección	23 de noviembre de 2009 8 de febrero de 2010
ENVERO	Aplicación	14 de enero de 2010
	Recolección	18 de enero de 2010 8 de febrero de 2010
COSECHA	Aplicación	5 de febrero de 2010
	Recolección	8 de febrero de 2010

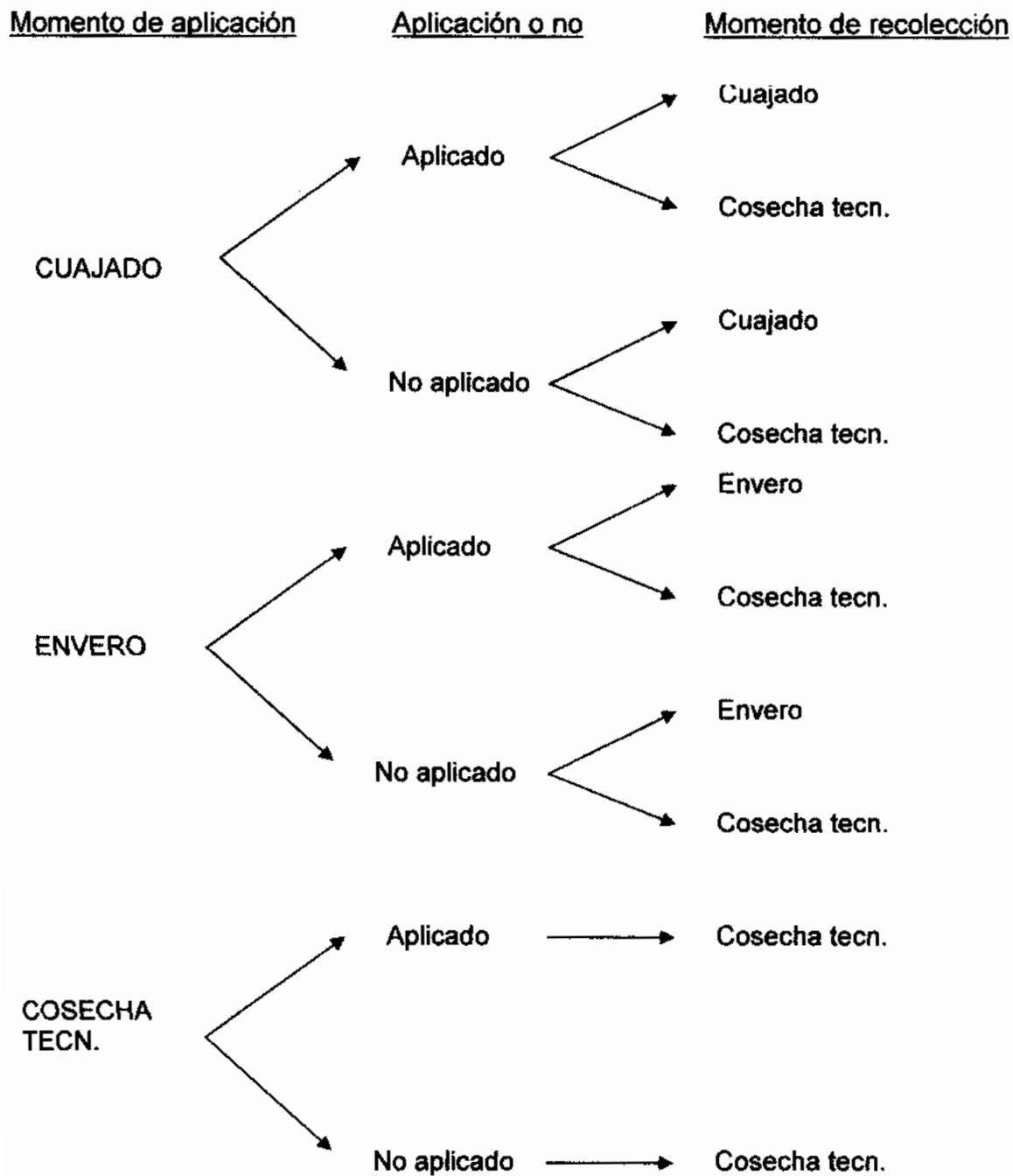


Figura 9. Factores estudiados y sus niveles, para la determinación de parámetros bioquímicos en las bayas.

Para las determinaciones de expresión de genes la recolección de racimos fue sistemáticamente cada 15 días a partir de la recolección de cuajado (fechas en Cuadro 2). En cada fecha se procedió a cortar cuatro racimos, de los cuales tres correspondieron al brazo aplicado (racimos aplicados o por aplicar, según la fecha de recolección) de una planta de cada momento de aplicación, y un racimo testigo fue retirado del brazo no aplicado de una planta del experimento elegida al azar (Figura 10).

Cuadro 2. Fechas de recolección y estado de los racimos recolectados para la medición de expresión de genes

Fechas de recolección	Planta	Estado del racimo recolectado
3 de diciembre de 2009	Cuajado	Aplicado
	Envero	No aplicado
	Cosecha	No aplicado
	Testigo (cuajado)	No aplicado
17 de diciembre de 2009	Cuajado	Aplicado
	Envero	No aplicado
	Cosecha	No aplicado
	Testigo (envero)	No aplicado
30 de diciembre de 2009	Cuajado	Aplicado
	Envero	No aplicado
	Cosecha	No aplicado
	Testigo (cosecha)	No aplicado
14 de enero de 2010	Cuajado	Aplicado
	Envero	No aplicado
	Cosecha	No aplicado
	Testigo (cuajado)	No aplicado
28 de enero de 2010	Cuajado	Aplicado
	Envero	Aplicado
	Cosecha	No aplicado
	Testigo (envero)	No aplicado

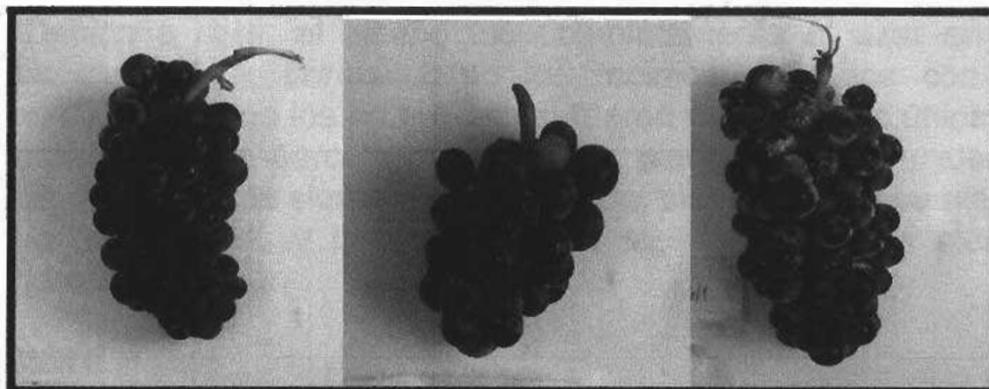


Figura 10. Racimos recolectados en envero para la medición de expresión de genes. Izq.: racimo aplicado en cuajado. Centro: racimo no aplicado de planta de envero. Der.: racimo no aplicado de planta de vendimia.

3.2.2 Condiciones de aplicación y mantenimiento de las muestras

La solución a aplicar se preparó con ABA comercial suministrado por la empresa Valent Bioscience USA a una concentración de 200 ppm, con agregado de detergente Tween 20 al 0.1% para favorecer su adherencia y penetración a los racimos. Para obtener una aplicación dirigida al racimo se utilizó un recipiente de aspersion, y se procuró el mojado total del racimo aplicando la solución hasta el chorreado del mismo. En el caso de ocurrencia de lluvias importantes durante las 24 horas siguientes a la aplicación, ésta fue repetida por posibilidad de lavado del producto.

Luego de cada cosecha se colocaron los racimos en un freezer a -20°C para su conservación hasta el momento de realizar las determinaciones de metabolitos secundarios. Si bien el congelamiento de los racimos puede tener incidencia en la medida de algunos metabolitos como, azúcares y ácidos orgánicos la imposibilidad de realizar las determinaciones en cada momento de cosecha determinó que se siguiera este protocolo. Para las determinaciones de expresión de genes los racimos se conservaron a -80°C para evitar la degradación del ARNm.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento constó de 18 plantas ubicadas en la misma fila de plantación y de la misma edad, portainjerto, clon, sistema de conducción, y tipo de poda. Debido a esto, el diseño fue completamente al azar en parcelas subdivididas incompleta, porque tanto los racimos aplicados con ABA en cosecha tecnológica como los no aplicados, fueron recolectados únicamente en cosecha tecnológica. La parcela mayor fue la planta, donde se aleatorizó el momento de aplicación, la siguiente fue la media planta, donde se aleatorizó la aplicación o no de ABA, y la menor fue el racimo, donde se aleatorizó el momento de cosecha.

3.4 MEDICIONES

Para poder determinar los efectos del ABA sobre la acumulación de antocianos y composición interna de las bayas se hicieron dos tipos de mediciones: parámetros bioquímicos y expresión génica. Para evaluar si los efectos se lograron expresar a nivel del fruto se midieron los siguientes parámetros bioquímicos: pH, sólidos solubles, antocianos totales, aminoácidos totales, ácidos orgánicos y prolina. La determinación de posibles efectos a nivel molecular se hizo midiendo la expresión de cinco genes de la ruta de biosíntesis de antocianos (PAL, CHS, CHI, F3H, DFR) y uno de la ruta de biosíntesis del ABA (NCED1). Se utilizó la ubiquitina (UB) como control de expresión interna y DGK2 como control de integridad.

3.4.1 Métodos de extracción

Todos los parámetros fueron medidos inmediatamente luego del macerado de las bayas.

3.4.1.1 pH y sólidos solubles

Se trituró el total de las bayas del racimo (tratado o no tratado). Luego se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C, en una centrífuga SIGMA.

3.4.1.2 Antocianos totales

Para la extracción de antocianos se tomó 2 gramos del sedimento resultante de la centrifugación del macerado de bayas (3.4.1.1) pesados en una balanza OHAUS, y se le agregó 4 mL de metanol ácido. Luego se dejó toda la noche a 4°C y se centrifugó a 5000 x g por 5 min a una temperatura de 10°C.

3.4.1.3 Prolina, aminoácidos totales y ácidos orgánicos

Una alícuota de 0.2 ml de la fase superior acuosa obtenida en (3.4.1.1) se utilizó para la determinación de aminoácidos, ácidos orgánicos y prolina.

3.4.1.4 Extracción de ARN de la piel de las uvas

La extracción de ARN de la piel de uva se realizó en primera instancia mediante el protocolo de Davies y Robinson (1996) sin dar resultados favorables, por lo que se procedió a utilizar una modificación del protocolo de Chang et al. (1993), que se describe a continuación.

Se trabajó siempre con materiales libres de ARNasa. El primer día se pesaron 2 g de polvo de piel de uva en un Falcon de 50 mL previamente enfriado en N₂ líquido. Se agregaron 10 mL de tampón de extracción previamente calentado a 65°C, y 200 µL de β-mercaptoetanol. Se mezcló por inversión 5 min y se agregó 10 mL de CIA. Nuevamente se mezcló por inversión 5 min, y se centrifugó 15 min. a 9000 x g a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se agregaron 10 mL de CIA. Luego de agitar 5 min se centrifugó 15 min. a 9000 x g temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo en hielo y se repitieron los pasos con CIA hasta no ver interfase. Se añadieron 0,25 vol de LiCl 10M y se dejó precipitar o/n a -20°C.

El segundo día se centrifugó 30 min a 9000 g. Posteriormente se añadieron 500 µL de tampón SSTE previamente calentado a 65°C y se resuspendió con micropipeta. Se añadió 500 µL de CIA y se mezcló volteando. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. Recuperando el sobrenadante y pasándolo a otro eppendorf, se agregaron nuevamente 500 µL de CIA y se mezcló. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante en otro eppendorf para luego agregar 2 vol de etanol absoluto frío a -20°C. Se dejó precipitar 3 h mínimo a -20°C y se centrifugó 25 min a 13000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol 95% (frío a -20°C). Se centrifugó 10 min. a 13000 rpm a 4°C por segunda vez, y se retiró el sobrenadante. Se centrifugó otra vez 2 min a 13000 rpm a 4°C. Se resuspendió el pellet en 50 µL de agua estéril tratada con DEPC, se cuantificó en espectrofotómetro, y la calidad del RNA se visualizó en gel de agarosa al 2%, con cargas de 20 µL en los pocillos.

3.4.2 Determinaciones analíticas

3.4.2.1 Cuantificación de pH y sólidos solubles

Para la determinación de pH y sólidos solubles en mosto se siguieron los protocolos de O.I.V (2007). Los sólidos solubles fueron determinados por refractometría utilizando un refractómetro FORLI sin control de temperatura, y el pH con un pHmetro MeterLab.

3.4.2.2 Cuantificación de antocianos totales

Se procedió a tomar 100 μ L de sobrenadante obtenido en (3.4.1.2) y se le agregó 900 μ L de metanol ácido. Se leyó la absorbancia de la mezcla en espectrofotómetro SHIMADZU a 520 nm para determinar el contenido total de antocianos.

La concentración de antocianos monoméricos se calculó de la siguiente forma (Giusti y Wrolstad, 2001):

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/litro)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\Sigma \times 1)$$

donde

A: absorbancia

MW: peso molecular (para muestras de composición desconocida, se usa el de la cianidina-3-glucósido MW=449.2)

DF: Factor de dilución

Σ = 26,900 (para muestras de composición desconocida se usa el de la cianidina-3-glucósido)

3.4.2.3 Cuantificación de prolina

La prolina se cuantificó según Troll y Lindsley (1955). Se tomó 0.1 mL de la fase acuosa que contenía la prolina (3.4.1.1) y se le agregó 1 mL de ácido acético y 1 mL de ninhidrina ácida consistente en H₃PO₄ 6 M, ácido acético 12,6 M y ninhidrina 0,14 M. Se usaron tubos con tapón de rosca que se calentaron en baño de agua a 90°C durante 1 h y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. De cada tubo se tomó 450 μ L y se le adicionó 1,5 mL de tolueno, se agitó vigorosamente durante 5 min. y se dejó decantar hasta la formación de dos fases (aprox. 12 h). Para cuantificar prolina se tomaron muestras de 1 mL de la fase superior y se leyó la absorbancia a 515 nm en espectrofotómetro SHIMADZU. Como estándar se usó L-prolina.

3.4.2.4 Cuantificación de aminoácidos totales

Se tomaron 0,1 mL de la fase acuosa obtenida en (3.4.1.1), se agregaron 0,5 mL de solución A (8,4 g de ácido cítrico, 3,2 g de NaOH y agua hasta 50 mL) y 0,5 mL de solución B (0,48 g de ninhidrina, 0,0165 g de ácido ascórbico y cellosolve 50 mL). Posteriormente se hirvió durante 25 min y se dejó enfriar. Se añadió 3 mL de etanol 60%, se mezcló bien, y se leyó absorbancia a 570 nm.

3.4.2.5 Identificación y cuantificación de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos de las diferentes muestras obtenidas en (3.4.1.1) se identificaron y cuantificaron por HPLC SHIMADZU. Las muestras fueron filtradas con filtros Millipore y se inyectaron en un HPLC provisto de un *loop* de 20.0 μ L. La elución y separación de los ácidos orgánicos se realizó empleando una columna CP18 como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó H_2O MilliQ, pH 2,3 ajustado con H_3PO_4 .

Los ácidos orgánicos separados por la columna fueron detectados por absorbancia a 210 nm con un detector de arreglo de fotodiodo. Los picos de los diferentes ácidos orgánicos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de cada ácido orgánico inyectado solo, y posteriormente en mezclas con otros ácidos orgánicos. Las concentraciones de los ácidos orgánicos de las muestras se determinaron previa realización de curvas de calibración de ácidos orgánicos de concentraciones conocidas (entre 0,25 y 5,0 mg/mL, inyectados por duplicado). Así se determinó para cada ácido orgánico una curva de calibración cuyas variables y parámetros se presentan en la cuadro 3.

Cuadro 3. Ecuaciones de las curvas de calibración de los ácidos orgánicos (y = área, en unidades arbitrarias y x = cantidad, mg/mL).

Acido orgánico	ecuación	r^2
Málico	$y = 1047050 x - 57721$	0.990
Tartárico	$y = 1143321 x + 85501$	0.901
Cítrico	$y = 1809595 x + 84508$	0.990

Se utilizó la suma de estos tres ácidos como una aproximación a la acidez total para el análisis de la relación azúcares/acidez.

3.4.2.6 Obtención de ADNc

El ARN total extraído (descripción en 3.4.1.5) fue purificado con 1 μ L de DNAasa y 1 μ L de buffer 10X DNAasa cada 10 μ L de ARN. Posteriormente fue calentado a 37°C por 30 min y a 60°C por 10 min.

El contenido de ARN/ μ L fue variable según la muestra. El ADNc de todas las muestras fue obtenido por transcripción reversa de 0,5 μ L del ARN total extraído, usando el protocolo descrito por el fabricante SuperScript III First-Strand Syntesis System for RT-PCR (Invitrogen). El ADNc se conservó a -80°C hasta su uso. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Corbett.

3.4.2.7 Análisis de expresión génica por PCR semicuantitativa

La amplificación por PCR semicuantitativa fue llevada a cabo con oligonucleótidos específicos de los ocho genes de interés, proporcionados por SBS Genetech Co., Ltd., usando entre 2 y 4 μ L de ADNc, buffer minus Mg⁺⁺ 10X, dNTP 12,5 mM, MgCl₂ 25 mM, cebadores 10 μ M y Taq 5U/ μ L. Se siguieron las recomendaciones dadas por el fabricante, Invitrogen. El programa en el termociclador Corbett consistió en 40 ciclos a 15 s a 95°C, 30 s a temperatura de annealing (Cuadro 6) y 30 s (1 min para DGK2) a 65 °C.

Cuadro 4. Cebadores utilizados, largo del fragmento amplificado, y temperaturas de anealling utilizadas en la reacción de PCR.

Cebador	Longitud del fragmento (pb)	Temperatura anealling (°C)
UB	18 18	50
PAL	20 22	58
CHS	21 20	58
CHI	20 24	55
F3H	21 20	58
DFR	20 21	58
DGK2*	20 20	57
NCED1	23 27	62

*1 minuto de extensión

En el Cuadro 5 se muestra la categoría, denominación, genes y secuencia de oligonucleótidos correspondientes.

Cuadro 5. Cebadores usados para la PCR. UB (Ubiquitina), PAL (Fenilalanina amonio liasa), CHS (Chalcona sintasa), CHI (Chalcona isomerasa), F3H (Flavonona 3 hidroxilasa), DFR (Dihidroflavonol 4 reductasa), DGK2 (Diacylglycerol kinase), NCED1 (nueve-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa).

Categoría	Denominación	Gen	Secuencia del oligonucléotido
Control de integridad	DGK2_F	DGK2	F 5'-ACTTCATTCCTCACCCCAA
	DGK2_R	DGK2	R 5'-GGGAGCGGGATTAGAGAAAG
House keeping	UB_F	UB	F 5'-GAGTATCAAAACAAAAGC
	UB_R	UB	R 5'-AGTAGATGACTGCATTGG
Biosíntesis de Antocianos	PAL_F	PAL	F 5'-TTTGTGAGGGAAGAACTGGG
	PAL_R	PAL	R 5'-AAGTGTAGGGAAGGGGTGTCT
	CHS_F	CHS	F 5'-GGGCCTCACCTTTCATTTACT
	CHS_R	CHS	R 5'-GCCGAGTTGCTCTCAGTTTC
	CHI_F	CHI	F 5'-TGAAGGAGAGATGGGAAGAA
	CHI_R	CHI	R 5'-GCACCAAGAACACTACAAATAAAA
	F3H_F	F3H	F 5'-GTGGAAGGAGCATTGTGTC
	F3H_R	F3H	R 5'-CCACCATCACCGACTTCTCT
	DFR_F	DFR	F 5'-GCGAGAGCGTAGAAATGTCC
	DFR_R	DFR	R 5'-CTCAAAGGGAACGAACTCTC
Metabolismo del ABA	NCED1_F	NCE	F 5'-GCAGAGTAAAAACACATGAAGCTAGTG
	NCED1_R	D1	R 5'-GCAGAGTAAAAACACATGAAGCTAGTG
		NCE	
		D1	

Fuente: Sparvoli et al. (1994)

3.4.2.8 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La determinación de la integridad del RNA se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa 2 % en condiciones desnaturizantes (Sambrook et al., 1989). Las muestras de RNA (3 µg) se desnaturizaron calentándolas a 55° C durante 5 min en 16 µL de una solución de tampón MOPS 200 mM pH 7, formamida 60 %, formaldehído 20 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0.1 % y bromuro de etidio 0.2 %. Como tampón de corrida se usó MOPS 200 mM pH 7, acetato de sodio 40 mM, EDTA 10 mM. La electroforesis se corrió a 70 mA durante 2 h.

La visualización del cDNA y de fragmentos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 o al 2 % respectivamente (Sambrook et al., 1989). A 10 μ L de muestra se agregaron 2 μ L de tampón de carga consistente en glicerol 50 %, azul de bromofenol 0.1 % y xilencianol 0.1 %.

Como tampón de corrida se usó Tris-HCl 90 mM, acetato 0.1142% y EDTA 3 mM. La electroforesis se corrió a 100 mA durante 1 h. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989).

Los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador UV provisto de un sistema de captura de imagen Gel Logic 100 Imaging System (Kodak).

3.4.2.9 Medición del nivel de expresión de genes

La determinación del nivel de expresión se hizo mediante análisis de imagen (software ImageJ 1.39) que midió la intensidad de las bandas obtenidas en la fotografía del gel de PCR.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1 Análisis realizados

Dado que todas las variables de interés son continuas y con distribución que se espera a priori que sea normal (pH, sólidos solubles, aminoácidos totales, antocianos totales, ácidos orgánicos y prolina), el efecto de los factores de interés (momento de aplicación, aplicación o no de ABA, y momento de recolección), fue estudiado ajustando modelos lineales generales (Anava).

Las medias de los efectos significativos fueron comparadas usando contrastes ortogonales y no ortogonales. En los casos en que por el análisis de residuales se detectó heterogeneidad de varianzas, las mismas fueron modeladas y se usó el método de mínimos cuadrados generalizados. Se utilizó el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS version 9.2 (SAS Institute, 2007).

3.5.2 Modelo estadístico

El efecto de los tres momentos de aplicación (cuajado, envero y cosecha), la aplicación o no de ABA, y el momento de cosecha (cajado y envero vs. cosecha tecnológica), sobre parámetros bioquímicos en la uva, fue analizado a través del siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijkl} = \mu + M_i + \delta_{ij} + A_k + (MA)_{ik} + \partial_{ijk} + C_l(MA)_{ik} + \varepsilon_{ijkl} ,$$

donde:

Y_{ijkl} : variable de respuesta (parámetros bioquímicos: antocianos totales, pH, °Brix, prolina y aminoácidos totales)

μ : media general

M_i : efecto del i -ésimo momento de aplicación (i : 1, 2, 3)

δ_{ij} : error entre plantas

A_k : efecto del k -ésimo nivel de aplicación (k : 1, 2)

$(MA)_{ik}$: efecto de la interacción momento de aplicación x nivel de aplicación

∂_{ijk} : error entre brazos de plantas

$C_l(MA)_{ik}$: efecto del momento de cosecha (l : 1, 2) anidado a momento de aplicación x nivel de aplicación

ε_{ijkl} : error entre racimos

4. RESULTADOS

4.1 EVOLUCIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN RACIMOS NO APLICADOS CON ABA

4.1.1 Antocianos totales

En racimos donde no se aplicó ABA, el momento de recolección fue significativo sobre el contenido de antocianos totales, siendo mayor en bayas maduras que en inmaduras. En cosecha tecnológica se alcanzó una concentración de antocianos significativamente mayor a la obtenida en cuajado, y en envero no hubo diferencias significativas con ninguno de los otros dos momentos de recolección (Figura 11).

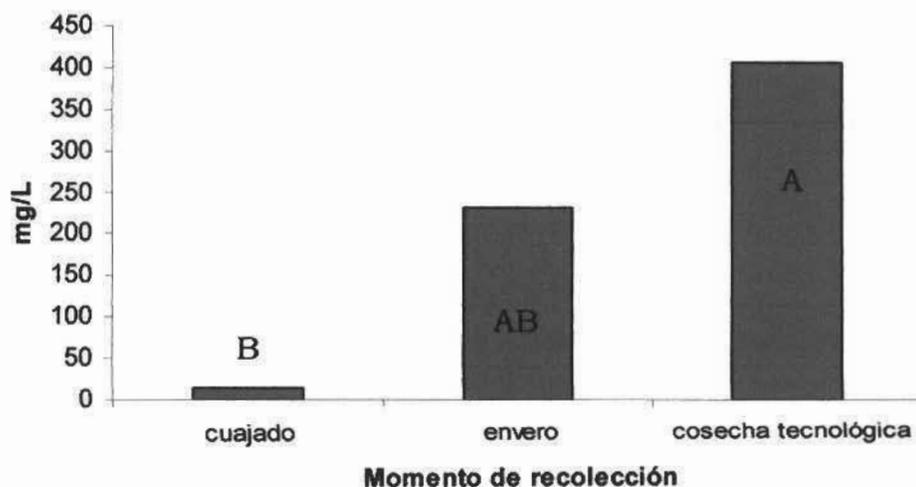


Figura 11. Concentración de antocianos totales (mg/L) en uvas *V. vinifera* cv. Pinot Noir no aplicadas con ABA, según el momento de recolección de racimos (cuajado, envero y cosecha tecnológica). Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$).

4.1.2 pH, °Brix y prolina

Se registró un aumento significativo de pH y azúcares desde cuajado a envero y desde envero a cosecha tecnológica, cuando se analizaron racimos donde no se aplicó ABA. La concentración de prolina aumentó significativamente desde cuajado y envero, que no presentaron diferencias, hasta vendimia (Cuadro 6).

Cuadro 6. pH, azúcares (°Brix) y prolina ($\mu\text{mol/g}$ peso seco) en uvas *V. vinifera* cv. Pinot Noir según momento de recolección (cuajado, envero y vendimia), en racimos no aplicados con ABA. Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$).

Variable	Momento de recolección	No aplicados
pH	Cuajado	3.0 C
	Envero	3.2 B
	Cosecha tecnológica	3.9 A
°Brix	Cuajado	2.4 C
	Envero	13.4 B
	Cosecha tecnológica	18.2 A
Prolina	Cuajado	2.6 B
	Envero	14.3 B
	Cosecha tecnológica	35.4 A

4.1.3 Aminoácidos totales

La concentración de aminoácidos totales se mantuvo estable desde cuajado a cosecha ($p\text{-valor}=0.1996$).

4.1.4 Relación azúcares-acidez

La relación azúcares-acidez es cada vez mayor, lo que indica que el contenido de azúcares va creciendo y el de ácidos disminuyendo en el proceso de madurez de las bayas (Figura 12).

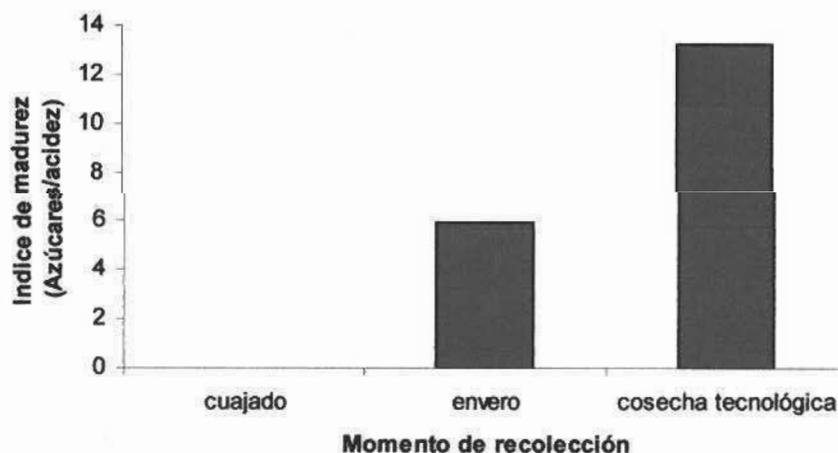


Figura 12. Relación azúcares-acidez en uvas *V. vinifera* cv. Pinot Noir sin ABA, según momento de recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica).

4.1.5 Relación ácido málico-ácido tartárico

En las etapas iniciales de crecimiento de los frutos la concentración de ambos ácidos es alta, pero mayor la de tartárico. De cuajado a envero aumenta la relación hasta igualarse sus concentraciones en el estado de envero. Sin embargo, al alcanzar la madurez, las bayas poseen mayor concentración de ácido tartárico que de málico, y la relación disminuye (Figura 13).

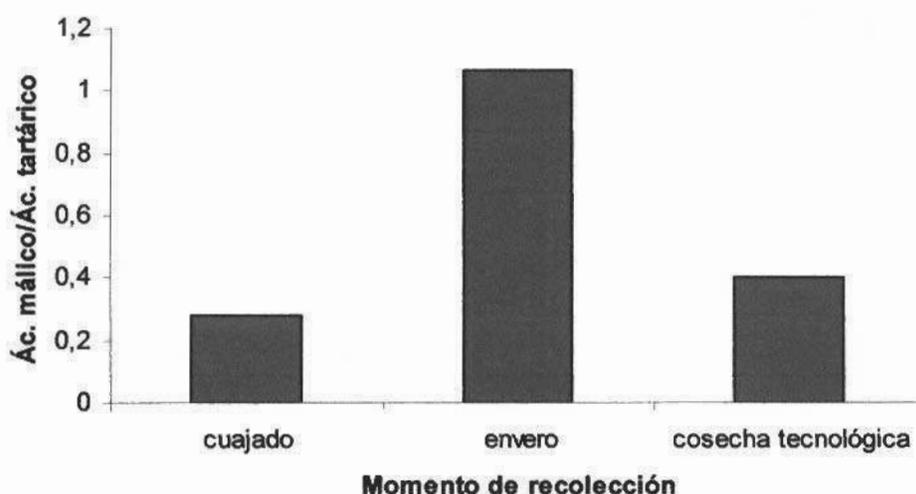


Figura 13. Relación ácido málico-ácido tartárico en uvas *V. vinifera* cv. Pinot Noir sin ABA, según momento de recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica).

4.2 EFECTO DE LA APLICACIÓN DE ABA, SOBRE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LA UVA

En todas las variables afectadas por el ABA, los cambios en las concentraciones se produjeron días después de la aplicación y no se mantuvieron hasta la cosecha tecnológica de racimos.

4.2.1 Antocianos totales

No hubo diferencias significativas en la concentración de antocianos totales, al comparar los racimos aplicados con ABA y los no aplicados, en cuajado, envero y cosecha tecnológica (Figura 14).

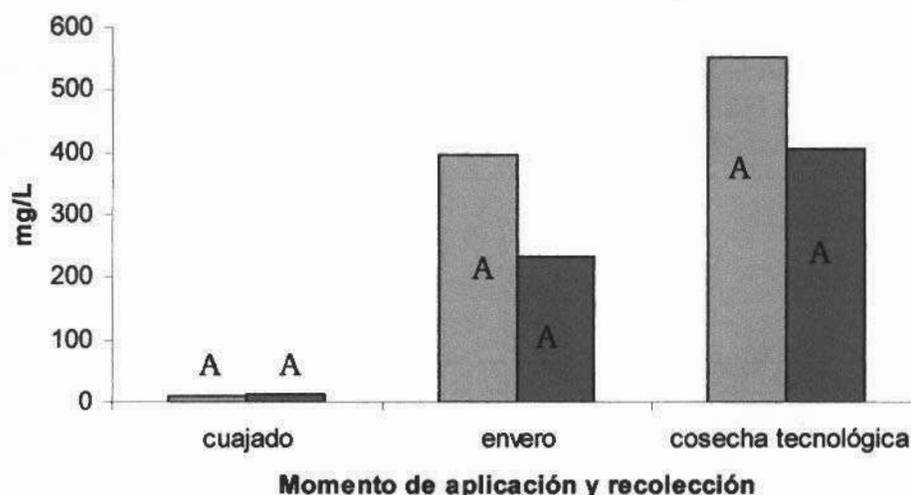


Figura 14. Concentración de antocianos totales (mg/L) en uvas *V. vinifera* cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra roja: no aplicado) en los tres momentos de aplicación y recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica). Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$), dentro de cada momento de aplicación y recolección.

Con la aplicación de ABA en envero y recolección de racimos días después, se alcanzó la concentración máxima, ya que no difirió de la obtenida en racimos aplicados y no aplicados en cosecha tecnológica. Sin embargo, la aplicación de ABA en cosecha tecnológica produjo concentraciones de antocianos significativamente mayores a racimos no aplicados y cosechados en envero (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración de antocianos totales (mg/L) en racimos aplicados con ABA y no aplicados, recolectados en envero, y en racimos aplicados y no aplicados recolectados en cosecha tecnológica. Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$).

Momento de recolección	Aplicación o no de ABA y momento de aplicación	Antocianos totales (mg/L)
Envero	No aplicado	232.3 BC
Envero	Aplicado en envero	395.2 AB
Cosecha tecnológica	Aplicado en cos. tecn.	553.4 AB
Cosecha tecnológica	No aplicado	405.8 A

4.2.2 pH

No hubo diferencias significativas de pH entre aplicar y no aplicar ABA, en cuajado y cosecha tecnológica. En cambio en envero, el pH en la pulpa de uvas aplicadas con ABA fue mayor que el de las no aplicadas con ABA (Figura 15).

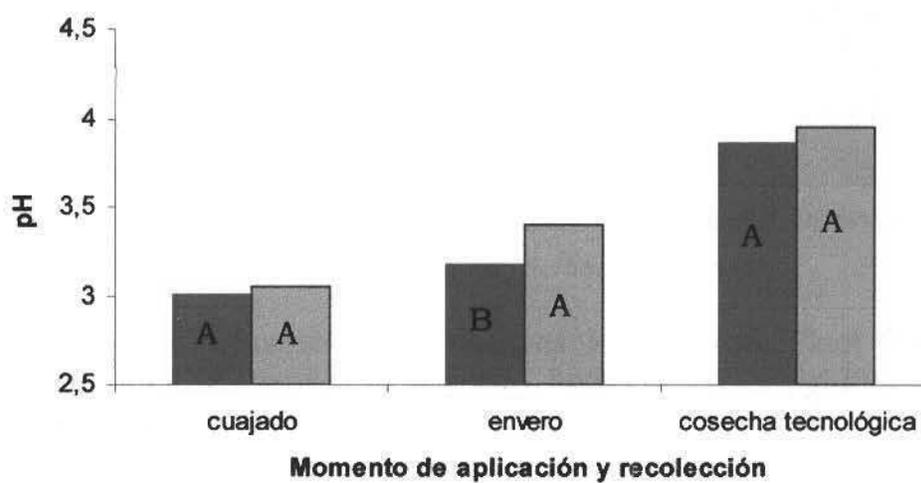


Figura 15. pH en uvas *V. vinifera* cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra roja: no aplicado) en los tres momentos de aplicación y recolección (cuajado, envero y cosecha tecnológica). Letras diferentes indican diferencias significativas según contrastes ($p < 0.05$), dentro de cada momento de aplicación y recolección.

4.2.3 °Brix, prolina y aminoácidos totales

No hubo diferencias significativas entre aplicar y no aplicar ABA en las concentraciones de sólidos solubles (p -valor=0.3780), prolina (p -valor=0.2250) y aminoácidos totales (p -valor=0.2295), en ninguno de los tres momentos de aplicación analizados.

4.2.4 Relación azúcares-acidez

Cuando se aplicó ABA, no se observó una tendencia a aumentar la relación azúcares-acidez con respecto a racimos sin aplicación. Por lo tanto no aumentó la velocidad de maduración de las bayas (Figura 16).

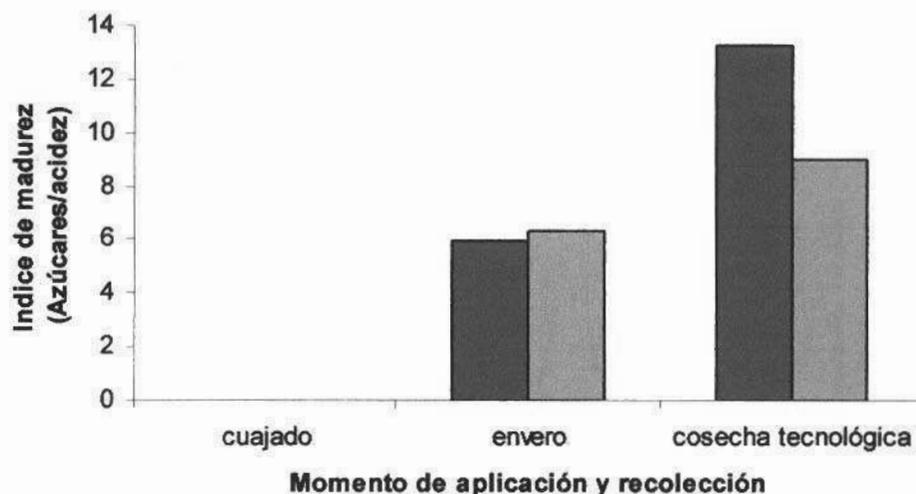


Figura 16. Relación azúcares-acidez en uvas *V.vinifera* cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra roja: no aplicado) en los tres momentos de aplicación (cuajado, envero y cosecha tecnológica).

4.2.5 Relación ácido málico-ácido tartárico

El ABA aumenta la relación málico-tartárico cuando es aplicado en envero. Al aplicarlo en cuajado y en cosecha tecnológica no parece tener efecto sobre la relación entre estos ácidos (Figura 17).

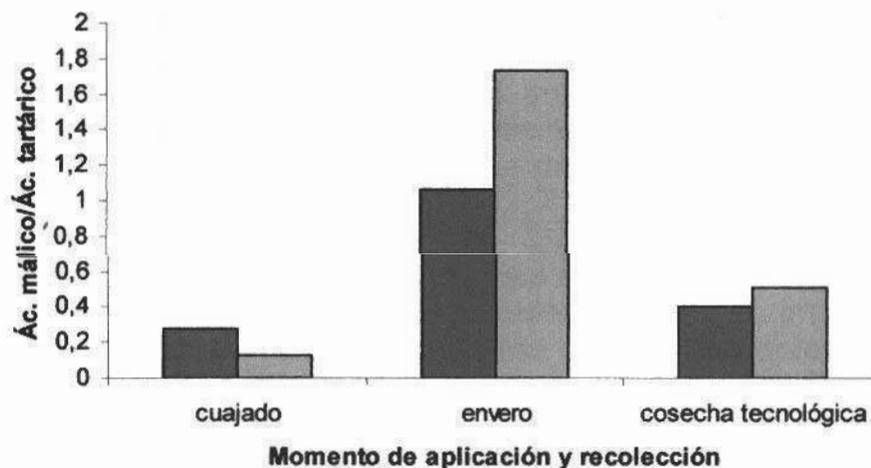


Figura 17. Relación ácido málico-ácido tartárico en uvas *V.vinifera* cv. Pinot Noir según aplicación o no de ABA (barra azul: aplicado, barra roja: no aplicado) en los tres momentos de aplicación (cuajado, envero y cosecha tecnológica).

4.3 CLIMA

Las condiciones de precipitación y temperatura durante el período de crecimiento de la baya se muestran en la figura 18.

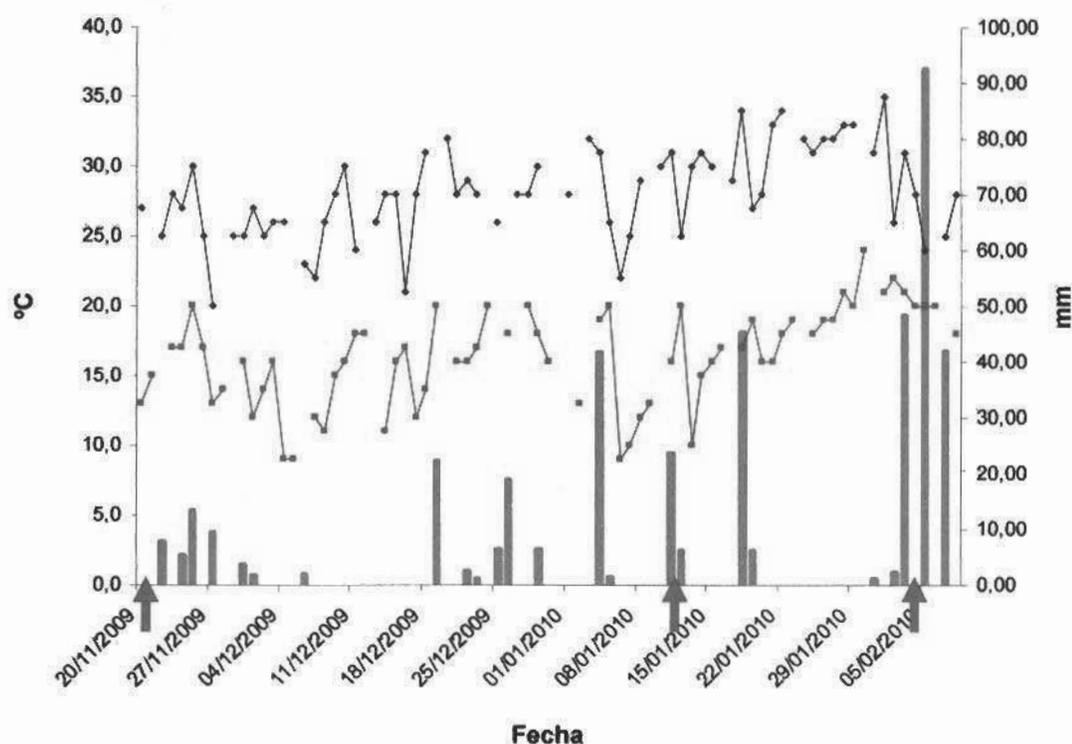


Figura 18. Temperatura máxima y mínima, y precipitación durante las etapas de cuajado, envero y cosecha tecnológica (línea violeta: temperatura máxima, línea rosada: temperatura mínima, barras verdes: precipitación). Las flechas indican los momentos de aplicación en cuajado, envero y cosecha tecnológica. Datos proporcionados por la casilla meteorológica de Establecimiento Juanicó S.A. (20/11/2009-08/02/2010).

Comparando con la serie histórica para el departamento de Canelones, se observa que en la zafra estudiada la precipitación total fue aproximadamente el doble, las temperaturas máximas y mínimas un poco superiores en la última semana de enero y en la primera de febrero.

4.4 ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES

4.4.1 Estado fenológico de la baya y eficiencia en la extracción de ARN

La eficiencia en la extracción de ARN fue mayor en las muestras en estado fenológico más avanzado (Cuadro 8). En los racimos en cuajado no fue posible extraer ARN por ninguno de los métodos probados.

Cuadro 8. Cantidad de ARN extraído por muestra

Muestra	ARN ($\mu\text{g/g}$ tejido)
Aplicada en cuajado. Recolección en envero	24
No aplicada. Recolección en envero	22
No aplicada. Recolección en envero	9
No aplicada. Recolección en envero	10
Aplicada en cuajado. Cosecha tecnológica	44
Aplicada en envero. Cosecha tecnológica	71
No aplicada. Cosecha tecnológica	5
No aplicada. Cosecha tecnológica	12

La calidad del ARN extraído también varió según la muestra (Figura 19).

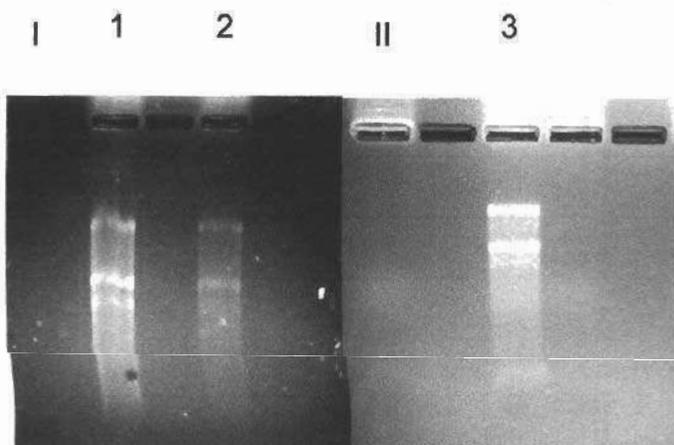


Figura 19. Geles de agarosa mostrando la calidad del ARN extraído. I: Carril 1: ABA aplicado en envero, cosecha tecnológica, carril 2: ABA aplicado en cuajado, cosecha tecnológica, II carril 3: sin aplicación de ABA, recolección en envero.

4.4.2 Niveles de expresión

El nivel de expresión de los seis genes estudiados varió según la aplicación o no de ABA, el momento de aplicación, y el momento de recolección, lo que se puede ver en las distintas intensidades de bandas obtenidas en corridas de electroforesis (Figura 20 I y II).

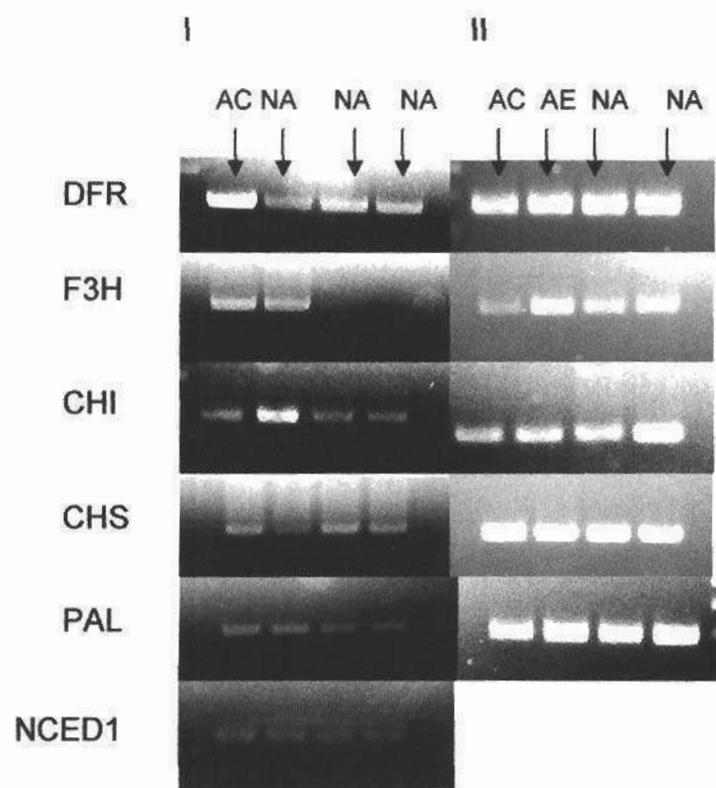


Figura 20. Nivel de expresión de los genes DFR, F3H, CHI, CHS, PAL y NCED1, en muestras donde la recolección fue en envero (I) y en cosecha tecnológica (II), según tratamientos (AC: aplicado en cuajado, NA: no aplicado, AE: aplicado en envero).

En muestras no aplicadas, hubo una tendencia de los genes a aumentar su expresión desde envero a cosecha tecnológica. En relación a NCED1, éste se expresó en envero pero no en cosecha tecnológica (Figura 21 I). En muestras aplicadas en cuajado y recolectadas en envero, también se observa en general una tendencia al aumento en la expresión en respuesta a la aplicación de ABA (Figura 21 II).

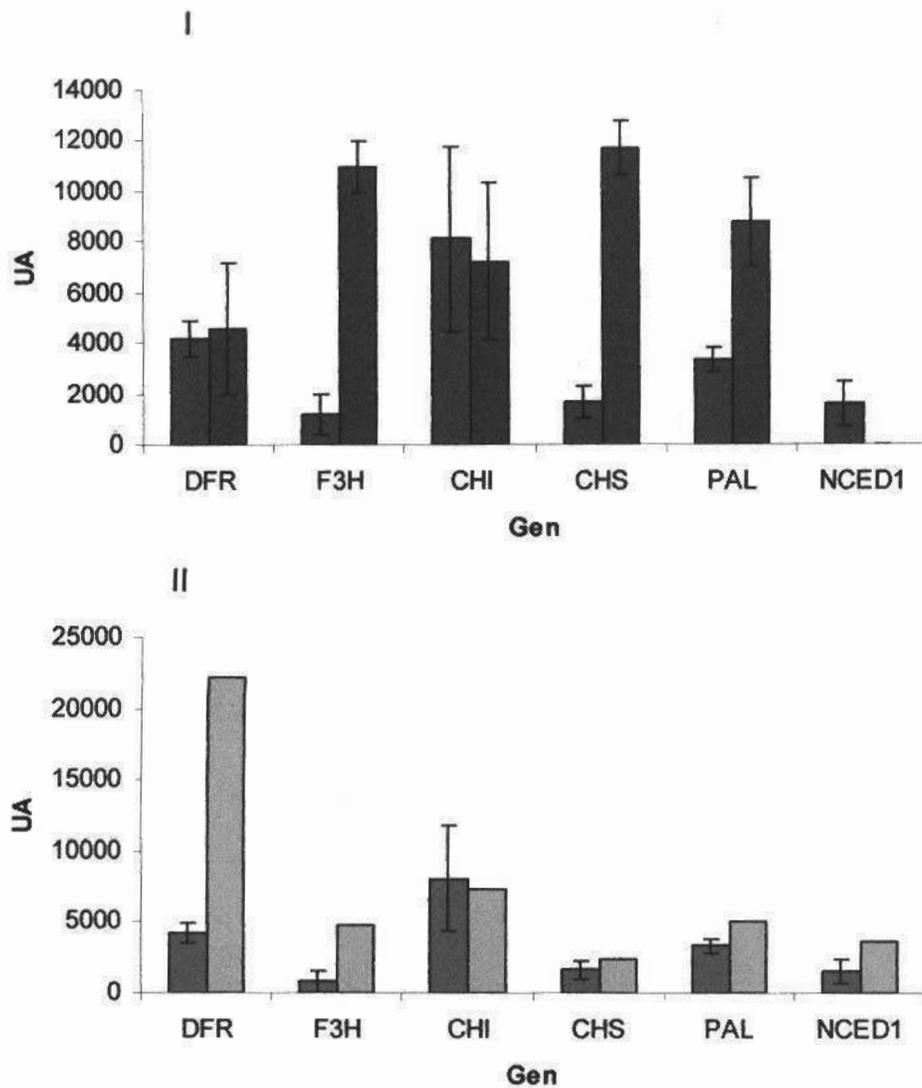


Figura 21. Nivel de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianos y ABA en I: racimos sin aplicación de ABA, según momento de recolección (Barra violeta: recolectados en enero, barra azul: cosecha tecnológica). II: racimos aplicados en cuajado y recolectados en enero, según aplicación o no de ABA (Barra roja: no aplicados, barra celeste: aplicados).

En racimos en cosecha tecnológica aplicados en cuajado, no se observó una tendencia general en el comportamiento de los genes con la aplicación de ABA. NCED1 no se expresó en los racimos en cosecha tecnológica (Figura 22 I). En racimos en cosecha tecnológica aplicados en enero tampoco hubo una tendencia definida en la expresión de los genes (Figura 22 II).

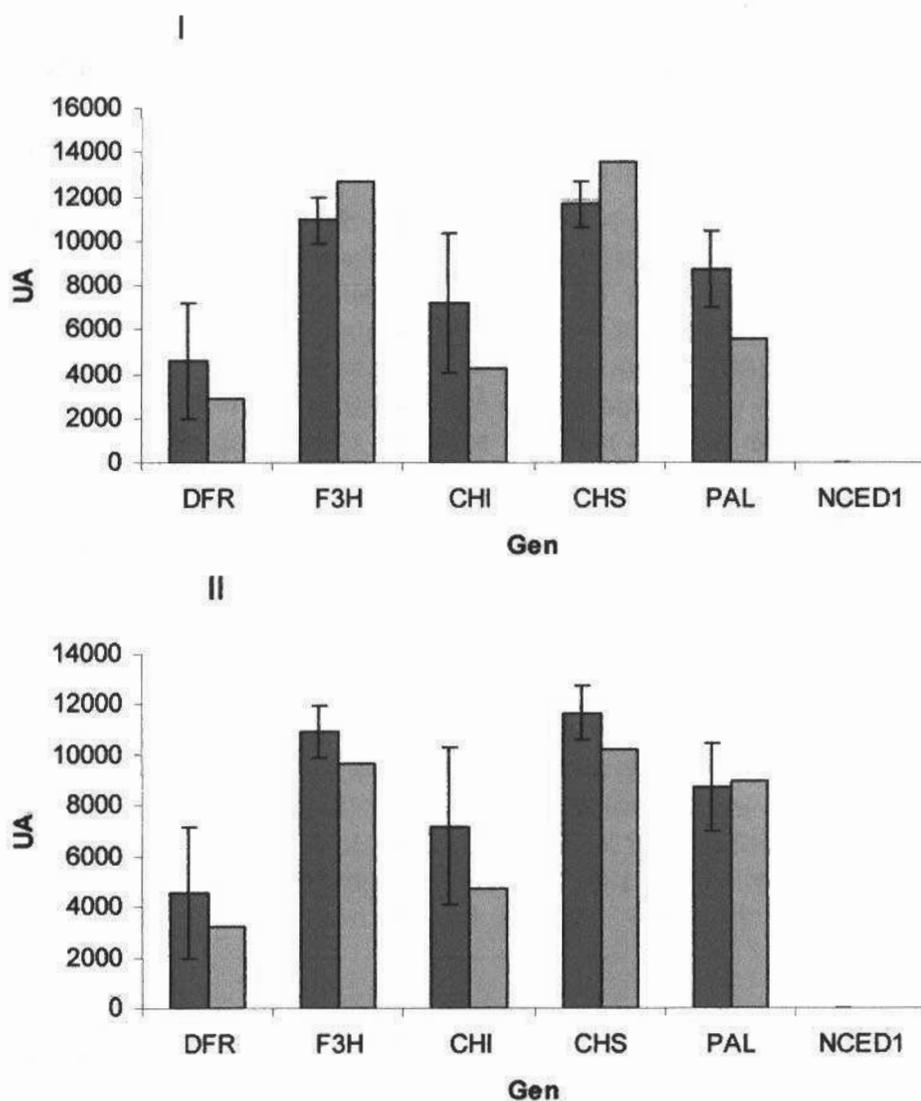


Figura 22. Nivel de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianos y ABA en I: racimos aplicados o no aplicados en cuajado recolectados en cosecha tecnológica, según aplicación o no de ABA (Barra roja: no aplicados, barra celeste: aplicados). II: racimos aplicados o no aplicados en envero recolectados en cosecha tecnológica, según aplicación o no de ABA (Barra roja: no aplicados, barra celeste: aplicados).

5. DISCUSIÓN

| 5.1 EVOLUCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BAYA

5.1.1 Azúcares y antocianos totales

La evolución de azúcares mostró aumentos significativos desde cuajado a envero y desde envero a cosecha tecnológica. Según Wheeler et al. (2009), la acumulación de azúcares comienza a partir de envero y continúa hasta la cosecha. Con respecto a los antocianos, estos aumentaron hacia el estado de cosecha, coincidiendo con los resultados de Togores (2003), que sostiene que a partir de envero ocurre la acumulación de antocianos, y continúa en etapas posteriores. Después de envero, el valor de °Brix es una estimación confiable del nivel de azúcares, ya que la mayoría de los sólidos solubles a partir de este momento se deben a la presencia de glucosa y fructosa. Junto con el aumento en el nivel de azúcares también se dio un aumento del color, que coincide con el pasaje del fruto desde la etapa lag a la segunda fase de crecimiento rápido.

5.1.2 Parámetros bioquímicos

El aumento de pH en el desarrollo de las bayas ocurre por tres razones: dilución, salificación (la formación de sales a partir del ácido tartárico es el factor principal en el aumento de pH) y actividad respiratoria (el ácido málico es el principal sustrato) (Catalina et al., 1982). Nuestros resultados indican que el pH aumentó significativamente desde cuajado a envero y desde envero a cosecha tecnológica, y superó el valor de pH mínimo requerido para la cosecha (pH=3,3).

La concentración de aminoácidos totales no evolucionó de acuerdo a lo encontrado por Stines et al. (2000) de un aumento de la concentración a medida que avanza el estado de desarrollo de las bayas, ya que no encontramos diferencias significativas entre los tres momentos estudiados. Según Flanzky y Poux, Feuillat, citados por Feuillat (2003), los contenidos en aminoácidos de un mosto o vino pueden variar fuertemente en función de las condiciones climáticas del año.

El contenido de prolina aumentó con el desarrollo de las bayas, presentando valores significativamente mayores en cosecha tecnológica con respecto a envero y cuajado, acorde con lo encontrado por Stines et al. (1999b). Millery et al. (1986) confirmaron este resultado para los tres cepages de Champagne (Chardonnay, Pinot Noir y Pinot Meunier), observando una súbita subida en la concentración de prolina entre 8 y 15 días antes de la vendimia.

5.1.3 Relación azúcares-acidez

La relación azúcares-acidez es cada vez mayor, lo que se explica por un aumento en la concentración de azúcares y una disminución en la concentración de ácidos, a medida que transcurre el desarrollo de las bayas. Esto coincide con lo reportado por Deluc et al. (2007), donde en la fase I las bayas acumulaban ácidos orgánicos entre otros, en la fase II o fase lag se empezaban a acumular los azúcares, y en la tercera fase, aumentaba el contenido de azúcares y había un declive en la acumulación de ácidos orgánicos (Deluc et al., 2007).

5.1.4 Relación ácido málico-ácido tartárico

En las etapas iniciales de crecimiento de los frutos la concentración de ambos ácidos es alta, pero mayor la de tartárico porque su acumulación ocurre a altas tasas luego de anthesis (Terrier y Romieu, 2001). De cuajado a envero aumenta la relación, ya que el malato es acumulado hasta envero, y el tartárico no. Sus concentraciones son aproximadamente iguales en el estado de envero. Sin embargo, al alcanzar la madurez, las bayas poseen mayor concentración de ácido tartárico que de málico, ya que este último es el principal sustrato de la respiración (Terrier y Romieu, 2001), y la relación disminuye.

5.2 EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE ÁCIDO ABSCÍSICO

5.2.1 Azúcares y antocianos totales

Wheeler et al. (2009) afirman que al acercarse el estado de cosecha, en las aplicaciones de ABA tempranas, ya no hay diferencias en el contenido de esta hormona entre tratar con ABA y no. Acorde con esto, los resultados de esta tesis muestran que la aplicación de ABA en cuajado no tuvo efecto sobre la concentración de antocianos. Tampoco se encontró efecto significativo de la aplicación de ABA en envero y en cosecha tecnológica sobre la concentración de antocianos. Según Coombe y Hale (1973), para que la aplicación de ABA exógeno sea efectiva en acelerar el proceso de madurez, ésta debe hacerse una semana antes de envero, una vez que el ABA endógeno ha alcanzado su concentración más baja. En esta tesis la aplicación se realizó en el estado de envero, donde la concentración de ABA quizás ya haya aumentado, lo que puede explicar su falta de efectividad.

Los racimos aplicados y recolectados en envero presentaron una concentración de antocianos totales estadísticamente igual a la máxima obtenida para racimos no aplicados. Este mismo comportamiento fue encontrado por Koyama et al. (2010), donde la máxima concentración de

antocianos fue luego de 14 días de envero para los aplicados con ABA, permaneciendo relativamente estable durante el proceso de madurez, y en cosecha tecnológica para los no aplicados. Sin embargo el valor máximo no fue diferente en los racimos aplicados que en los control, resultado encontrado también por Jeong et al. (2004).

Con respecto a la concentración de azúcares, no se encontraron diferencias significativas entre aplicar ABA y no aplicar, en ninguno de los momentos de aplicación, lo que coincide con los resultados encontrados por Mori et al. (2005), respecto a la nulidad de efecto del ABA sobre la concentración de los azúcares en Pinot Noir. Sin embargo, en otras variedades ocurre un aumento de azúcares producto de la aplicación, en este sentido Koyama et al. (2010) afirman que en Cabernet Sauvignon, el tratamiento con ABA aumenta la abundancia de transcritos que codifican para una invertasa que rompe la sacarosa en glucosa y fructosa, y para sacarosa sintasa, que degrada la sacarosa en UDP glucosa y fructosa.

5.2.2 Parámetros bioquímicos

El pH aumentó a los pocos días de aplicar ABA en envero, con respecto a los racimos donde no se aplicó ABA. Sin embargo, este aumento no se mantuvo hasta vendimia. Si bien Koyama et al. (2010) no encontraron diferencias de pH como resultado de la aplicación de ABA, para ningún momento de muestreo, Inaba et al. (1974) afirman que el ABA acelera el proceso de madurez del fruto, y que las plantas inducen su senescencia bajo tratamientos de esta hormona.

La concentración de aminoácidos totales no se vio afectada por la aplicación de ABA. Okamoto et al. (2004) sostienen que en uvas de la variedad Chardonnay aumenta el contenido de aminoácidos al imponer estrés hídrico después de envero, sin embargo Deluc et al. (2009a) mostraron que los impactos del déficit hídrico sobre el metabolismo de las uvas depende del cultivar y de su color. El contenido de prolina no aumentó de acuerdo a lo esperado, sino que no se vio afectado por la aplicación de ABA. Okamoto et al. (2004) encontró estos mismos resultados al imponer déficit hídrico en Chardonnay.

5.2.3 Relación azúcares-acidez

Cuando se aplicó ABA en esta tesis, no se observó una tendencia a aumentar la relación azúcares-acidez con respecto a racimos sin aplicación, debido a que no se modificaron ninguno de los dos componentes con el ABA. Según Coombe y Hale (1973), Pirie y Mullins (1976), Wheeler et al. (2009), la aplicación de ABA exógeno en envero aumentó la acumulación de sólidos solubles y disminuyó la de ácidos orgánicos. Según Amrani Joutei et al. (2006) la aplicación de etileno, mediante un aumento en la síntesis de ABA, aumentó el contenido de azúcares y disminuyó el de ácidos, causando un incremento de la relación azúcares/acidez.

5.3 ANÁLISIS EXPLORATORIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES

Ban et al. (2003) reportan que durante el desarrollo del fruto, todos los genes estructurales de síntesis de antocianos se expresan de forma continua, salvo UFGT. Según Boss et al. (1996), en envero todos los genes se inducen de forma coordinada y a partir de este momento se da la acumulación de antocianos en la piel de las uvas. Los resultados de este estudio muestran que de envero a cosecha tecnológica, que fueron los momentos en que se pudo extraer ARN y cuantificar la expresión de genes, hubo una tendencia general de los genes a aumentar su expresión. Según Koyama et al. (2010), los genes PAL, CHS, F3H, y el factor de transcripción VvMYBA1Y2, que regula la ruta de biosíntesis de antocianos, fueron sobre-expresados luego de 14 días de envero. Además afirman que la expresión relativa de estos genes fue consistente con la inducción de antocianos, concluyendo que el proceso de biosíntesis está regulado predominantemente al nivel de la transcripción. En esta tesis se encontró un aumento en la concentración de antocianos en la piel de las uvas desde envero a cosecha tecnológica.

Ban et al. (2003) concluye que el ABA aumenta la concentración de antocianos en la piel de las bayas, y la expresión de los genes PAL, CHS, CHI, DFR y UFGT. Los resultados obtenidos muestran que en racimos en el estado de envero, aplicados en cuajado, hubo una tendencia a aumentar la expresión de los genes con respecto a los racimos no aplicados con ABA. Sin embargo este efecto del ABA no se mantuvo hasta cosecha tecnológica. Parece entonces que el efecto del ABA aplicado en cuajado sobre la expresión de genes se fuera perdiendo a medida que va transcurriendo el proceso de madurez. Acorde con estos resultados Ban et al. (2003) encontró que el efecto del tratamiento con ABA desapareció luego de 21 días de una aplicación realizada 42 días luego de floración. Koyama et al. (2010), encontraron que el rol del ABA en la modificación de la expresión de transcritos va siendo cada vez menos importante a medida que avanza el estado de madurez de las

bayas. Esto también sucedió en racimos en cosecha tecnológica aplicados en envero, donde el ABA no parece haber tenido efecto sobre la expresión de genes.

Según Zhang et al. (2009) NCED1 incrementa su expresión al comienzo del proceso de madurez de las bayas, cuando el contenido de ABA en los frutos aumenta. Los resultados en racimos no aplicados muestran que esta enzima se expresó en envero pero no en cosecha tecnológica, lo que significa que al comenzar el proceso de madurez en las bayas, éstas poseen el potencial de sintetizar ABA in situ, pero este potencial se pierde más adelante. Wheeler et al. (2009) afirman que la expresión de los genes NCED es variable dentro y entre estaciones, con la única característica consistente de tener muy bajos niveles de expresión en las cuatro semanas previo a cosecha. Encontraron niveles de expresión considerablemente mayores para NCED1 con respecto a NCED2, mientras que en este trabajo los niveles de expresión de NCED2 no fueron detectables con la metodología usada.

Según Wheeler et al. (2009), luego de una aplicación de ABA tres semanas antes de envero, los niveles de transcritos de NCED1 y NCED2 aumentaron en la piel y pulpa de las bayas, luego de dos semanas de la aplicación. Kataoka et al. (2010) también reportó la inducción de esta enzima producto del ABA exógeno. De acuerdo con estas afirmaciones, los resultados en este trabajo muestran que en envero el nivel de expresión de NCED1 parece aumentar con la aplicación de ABA en cuajado.

5.4 OTROS FACTORES QUE PUDIERON INFLUIR EN LA COMPOSICIÓN DE LAS BAYAS

5.4.1 Factores climáticos

En el período de envero, la temperatura de la zona superó en varias oportunidades los 27°C, límite superior de temperatura óptima para la síntesis de antocianos según Mori et al. (2007), lo que pudo haber afectado su contenido. De todos modos nunca se sobrepasaron los 35°C, temperatura a la cual ocurre degradación de antocianos. El límite inferior según estos autores es de 15°C. En el período de cuajado principalmente la temperatura mínima alcanzó valores menores a este umbral, pero no fue lo común y no se alejó considerablemente de él. Además en este estado aún no comenzó la síntesis de estos compuestos.

El cultivo normal de la vid exige precipitaciones medias anuales de 600 mm (Andrades y González, 1995). En la zona del ensayo, desde cuajado a cosecha, la precipitación total fue de 411,20 mm., por lo que la disponibilidad

hídrica fue muy buena, con períodos sin lluvias menores a 15 días. Fregoni (1977) sostiene que años lluviosos provocan menores composiciones polifenólicas en las uvas.

5.4.2 Etefón

El etefón, sustancia utilizada como raleador de racimos y bayas, determina un aumento en la concentración de etileno natural de las plantas, acelera la abscisión y actúa sobre los procesos de maduración y síntesis de antocianos y taninos (Szyjewicz et al., 1984). En un trabajo de González-Neves et al. (2002) los vinos obtenidos con la aplicación de etefón en cuajado tuvieron mayores contenidos de alcohol, y cuando la aplicación fue en enero se alcanzaron mayores contenidos de polifenoles totales, antocianos, e intensidades colorantes, sin disminuir la producción.

Aplicaciones de etefón aumentaron el pH y redujeron la acidez titulable en mostos, aumentaron el contenido total de polifenoles 20 días luego de la aplicación, y aumentaron el contenido de antocianos en la piel de las bayas de forma inmediata a la aplicación (Gallegos et al., 2006).

Cantín et al. (2007) encontraron que el ABA representa una alternativa efectiva al etefón para lograr aumentar el color en bayas de la variedad de mesa Crimson Seedless, manteniendo mejor la calidad de las uvas luego de la cosecha.

6. CONCLUSIONES

La evolución de azúcares, pH, prolina, antocianos, y las relaciones azúcares-acidez y ácido málico -ácido tartárico al estado de vendimia fueron las esperadas en condiciones del cultivo no alteradas.

El pH se vio afectado por el ABA, aumentando su valor, al ser aplicado en envero. Aún así, no podemos concluir que el ABA haya alterado la madurez interna de los frutos, ya que no se modificaron los niveles de sólidos solubles, aminoácidos, prolina, ni la relación azúcares-acidez, con la aplicación.

La aplicación de ABA no modificó los niveles de antocianos encontrados en cuajado, envero y cosecha tecnológica, por lo que no se logró un aumento de color en las bayas que pueda reflejarse posteriormente en el color del vino.

El nivel máximo de antocianos alcanzado en cosecha tecnológica en racimos no aplicados con ABA fue el mismo que el obtenido al aplicar ABA en envero y recolectar los racimos días después.

Mediante un análisis exploratorio se cuantificaron los niveles de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianos en distintos momentos del desarrollo de las bayas y en distintos momentos de aplicación de ABA.

Se detectó la presencia del gen NCED1 en envero, clave en la síntesis de ABA endógeno en los frutos.

7. RESUMEN

Pinot Noir es una de las variedades de *Vitis vinifera* que produce uno de los vinos más prestigiosos y valorizados a nivel mundial, a pesar de que su vinificación en tinto da como resultado vinos de color poco intenso y mediana concentración tánica. Sumado a esto, en nuestro país existen pocos estudios sobre su comportamiento y adaptación. En este contexto esta tesis se planteó el objetivo de estudiar el efecto del ácido abscísico (ABA) sobre la composición interna y externa de los frutos y realizar un análisis exploratorio de la expresión de genes de las enzimas de la ruta de biosíntesis de antocianos, y un gen de la ruta de biosíntesis del ABA. Las variables medidas fueron sólidos solubles, pH, aminoácidos totales, prolina, ácidos orgánicos y antocianos totales, y los genes estudiados correspondieron a las enzimas PAL, CHS, CHI, F3H, DFR y NCED1. A su vez se estudió la evolución natural de los componentes del fruto para la caracterización de la variedad en nuestro país. En los frutos no aplicados, los componentes internos evaluados evolucionaron de acuerdo a lo esperado. La concentración de antocianos fue mayor en cada etapa de desarrollo del fruto medida. El ABA tuvo efecto inmediato sobre el pH, aumentando su valor al aplicarse en enero. A pesar de esto, no se considera que el ABA haya modificado significativamente el proceso de madurez interna de los frutos. Con respecto a la concentración de antocianos, la aplicación de ABA no tuvo efecto respecto a la no aplicación, por lo que el ABA no logró aumentar el color de los frutos. El tratamiento con ABA en enero logró alcanzar los niveles máximos obtenidos en cosecha tecnológica para racimos no aplicados. Se cuantificaron los niveles de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de antocianos en distintos momentos del desarrollo de las bayas y en distintos momentos de aplicación de ABA. La enzima NCED1, clave en la ruta de biosíntesis del ABA, se expresó en enero y no en cosecha tecnológica.

Palabras clave: Pinot Noir; Antocianos; Ruta de biosíntesis de antocianos; Ácido abscísico; Proceso de madurez de los frutos de vid; Déficit hídrico en los frutos de vid.

8. SUMMARY

Pinot Noir is one of the varieties of *Vitis vinifera* to produce one of the most prestigious wines and valued worldwide, despite its red wine in wine results in very intense color and medium tannin concentration. Added to this, in our country there are few studies on their behavior and adaptation. In this context this thesis's aim of studying the effect of abscisic acid (ABA) on the internal composition and external fruit and conduct an exploratory analysis of gene expression of enzymes of the biosynthetic pathway of anthocyanins and a gene in the ABA biosynthetic pathway. The variables measured were soluble solids, pH, total amino acids, proline, organic acids and total anthocyanins, and the genes studied corresponded to the enzymes PAL, CHS, CHI, F3H, DFR and NCED1. In turn, we studied the natural evolution of the components of the fruit for the characterization of the variety in our country. In the fruits applied internally assessed components evolved as expected. The concentration of anthocyanins was higher in each stage of fruit development measure. The ABA had an immediate effect on pH, increasing its value when applied to ripening. Despite this, it is considered that the ABA has significantly not modified the process of internal ripeness of the fruit. With respect to the concentration of anthocyanins, the application of ABA had no effect with respect to the non-implementation, but treatment with ABA at veraison achieved peak levels achieved in technology to harvest bunches are not applied. Quantified the expression levels of genes in the anthocyanin biosynthetic pathway in different stages of development of the berries at different times of application of ABA. The enzyme NCED1 key in the ABA biosynthetic pathway, was expressed in ripening harvest, not technology.

Keywords: Pinot Noir; Anthocyanins; Anthocyanin biosynthesis pathway; Abscisic acid; Maturation of the fruits of vine; Water deficit in the fruits of vine.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. AGEORGES, A.; FERNANDEZ, L.; VIALET, S.; MERDINOGLU, D.; TERRIER, N.; ROMIEU, C. 2006. Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Science*. 170: 372-383.
2. AMRANI JOUTEI, K.; BOUYA, D.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. 2006. Influence de l'éthyléné sur les maturités phénolique et cellulaire des raisins au cours de la vinification. *Cahiers Agricultures*. 15: 371-374.
3. ANDRADES, M.; GONZÁLEZ, M. 1995. Influencia climática en la maduración de la uva; estudio de cultivares de La Rioja y de Madrid. *ZUBÍA Monográfico*. 7: 79-102.
4. ANTOLIN, M.; BAIGORRI, H.; LUIS, I.; AGUIRREZABAL, F.; GENY, L.; BROQUEDIS, M.; SANCHEZ-DIAZ, M. 2003. ABA during reproductive development in non-irrigated grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo). *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 9: 169-176.
5. ARANGO, J. R. 2010. Pinot Noir ¿La mujer perfecta?. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado en agosto 2011. Disponible en <http://www.cocinasemana.com/vinos-y-licores/articulo/pinot-noir-la-mujer-perfecta/22426>.
6. BAN, T.; ISHIMARU, M.; KOBAYASHI, S.; SHIOZAKI, S.; GOTO-YAMAMOTO, N.; HORIUCHI, S. 2003. Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in 'Kyoho' grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 74: 586-589.
7. BERGQVIST, J.; DOKOOZLIAN, N.; EBISUDA, N. 2001. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52: 1-6.
8. BORSANI, O.; GONZALEZ-NEVES, G.; FERRER, M.; MONZA, J. 2010. Anthocyanins accumulation and expression of genes-related in berries of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Tannat. *Journal of Applied Horticulture*. 12: 3-9.

9. BOSS, P. K.; DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*. 111: 1059-1066.
10. _____; _____. 2001. Molecular biology of sugar and anthocyanin accumulation in grape berries. Anthocyanins. In: Roubelakis-Angelakis, K. A. ed. *Molecular biology and biotechnology of the grapevine*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. pp. 2-17.
11. BOULTON, R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine; a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52: 67-87.
12. BOWEN, P.; BOGDANOFF, C.; USHER, K.; ESTERGAARD, B.; WATSON, M. 2011. Effects of irrigation and crop load on leaf gas exchange and fruit composition in red winegrapes grown on a loamy sand. *American Journal of Enology and Viticulture*. 62: 9-22.
13. CANTÍN, C. M.; FIDELIBUS, M. W.; CRISOSTO, C. H. 2007. Application of abscisic acid (ABA) at veraison advanced red color development and maintained postharvest quality of 'Crimson Seedless' grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 46: 237-241.
14. CASTELLARIN, S. D.; PFEIFFER, A.; SIVILOTTI, P.; DEGAN, M.; PETERLUNGER, E.; GASPERO, G. 2007a. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environment*. 30: 1381-1399.
15. _____; MATTHEWS, M. A.; DI GASPERO, G.; GAMBETTA, G. A. 2007b. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta*. 227: 101-111.
16. CASTOR, J. G. B. 1953. The free amino acids of musts and wines. I. Microbiological estimation of fourteen amino acids in california grape musts. *Journal of Food Science*. 18: 139-145.
17. CHAMPAGNOL, F. 1984. *Elements de physiologie de la vigne et de la viticulture générale*. Montpellier, Dehan. 352 p.

18. CHERVIN, C.; EL-KEREAMY, A.; ROUSTAN, J. P.; LATCHE, A.; LAMON, J.; BOUZAYEN, M. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*. 167 (6): 1301-1305.
19. CLIFF, M. A.; KING, M. C.; SCHLOSSER, J.; 2006. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*. 40 (1): 92-100.
20. COHEN, S. 2007. Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. Thesis of Masters of Science in Food Science and Technology. Oregon, USA, Oregon State University. 107 p.
21. COOMBE, B., HALE, C. 1973. The hormone content of ripening grape berries and the effect of growth substance treatment. *Plant Physiology*. 51: 629-634.
22. _____. 1987. Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Horticulturae*. no. 206: 23-35.
23. CORTELL, J. M.; KENNEDY, J. A. 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.
24. _____.; HALBLEIB, M.; GALLAGHER, A. V.; RIGHETTI, T. L.; KENNEDY, J. A. 2007. Influence of Vine Vigor on Grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) Anthocyanins. 1. Anthocyanin Concentration and Composition in Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 6575–6584.
25. CRAMER, G. R.; ERGÜL, A.; GRIMPLET, J.; TILLET, R. L.; TATTERSALL, E. A. R.; BOHLMAN, M. C.; VINCENT, D.; SONDEREGGER, J.; EVANS, J.; OSBORNE, C. 2007. Water and salinity stress in grapevines; early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Functional and Integrative Genomics*. 7: 111-134.
26. DALLA, C.; LAUREANO, O. 1994. Effect of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on color composition of a young Portuguese red table wine. *Journal of Science and Food Agriculture*. 65: 477-485.

35. DÜRING, H.; ALLEWELDT, G.; KOCH, R. 1978. Studies on hormonal control of ripening in berries and grape vines. *Acta Horticulturae*. no. 80: 397–405.
36. EICHORN, K. W.; LORENZ, D. H. 1977. Phänologische entwicklungsstadien der rebe. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)*. 29: 119-120.
37. ENDO, A.; SAWADA, Y.; TAKAHASHI, H.; OKAMOTO, M.; IKEGAMI, K.; KOIWAI, H.; SEO, M.; TOYOMASU, T.; MITSUHASHI, W.; SHINOZAKI, K.; NAKAZONO, M.; KAMIYA, Y.; KOSHIBA, T.; NAMBARA, E. 2008. Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiology*. 147: 1984-1993.
38. FERRER, M.; GONZÁLEZ NEVES, G. 2002. Resultados enológicos y productivos de la aplicación de diversas alternativas de raleo de racimos y distintas intensidades de poda invernal en *Vitis vinifera* L. cv. Tannat. *Agrociencia*. 6: 53-62.
39. _____. 2007. Etude du climat des régions viticoles de l'Uruguay. des variations climatiques et de l'interaction apportée par le microclimat et l'écophysiologie des systèmes de conduite Espalier et Lyre sur Merlot. Thèse Doctorat. Montpellier, France. Université de Montpellier. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. 360 p.
40. _____.; GONZALEZ NEVES, G.; ECHEVERRÍA, G.; CAMUSSI, G.; AVONDET, R.; FOURMENT, M.; FAVRE, G.; SALVARREY, J. 2011. Efecto del estrés climático sobre la respuesta de la planta y la composición de la uva de Tannat (*Vitis vinifera* L.) en viñedos del Uruguay. *Revista Enología*. 7: 1-12.
41. FEUILLAT, M., 2003. Los compuestos nitrogenados. Los aminoácidos del mosto de uva y del vino. In: Flanzky, C. ed. *Enología; fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid. Madrid Vicente Ediciones. p. 98.
42. FONG, R. A.; KEPNER, R. E.; DINSMOOR, A. 1971. Acetic-acid-acylated anthocyanin pigments in the grape skins of a number of varieties of *Vitis Vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 22 (3): 150-155.

43. FORKMANN, G.; HELLER, W.; GRISEBACH, H. 1980. Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*, flavanone 3- and flavonoid 3'-hydroxylases. *Z. Naturforsch.* 35: 691-695.
44. FREGONI, M. 1977. Effects of the soil and water on the harvest. In: *International Symposium on Quality of the Vintage* (1o., 1977, Stellenbosch). Proceedings. Stellenbosch, South Africa, Oenology and Viticulture Research Institute. pp. 151-168.
45. GALLEGOS, J. I.; GONZALEZ, R.; GONZALEZ, M. R.; MARTIN P. 2006. Changes in composition and colour development of 'Tempranillo' grapes during ripening induced by ethephon treatments at veraison. *Acta Horticulturae*. no. 727: 505-512.
46. GAMBETTA, G. A.; MATTHEWS, M. A.; SHAGHASI T. H.; MCELDRONE, A. J.; CASTELLARIN, S. D. 2010. Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta*. 232: 219-234.
47. GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV- visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. F1.2, 1:13.
48. GONZÁLEZ-NEVES, G.; GIL, G.; BARREIRO, L.; FERRER, M.; FRANCO, J. 2006. COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LAS UVAS DE LAS PRINCIPALES VARIEDADES TINTAS DE *Vitis vinifera* CULTIVADAS EN URUGUAY. *Agrociencia*. 10: 1-14.
49. GRIMPLET, J.; WHEATLEY, M. D.; BEN JOUIRA, H.; DELUC, L. G.; CRAMER, G. R.; CUSHMAN, J. C. 2009. Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics*. 9: 2503-2528.
50. HAN, F.; ZHANG, W.; PAN, Q.; ZHENG, C.; CHEN, H.; DUAN C. 2008. Principal component regression analysis of the relation between CIELAB color and monomeric anthocyanins in young Cabernet Sauvignon wines. *Molecules*. 13: 2859-2870.
51. HARE, P. D.; CRESS, W. A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*. 21: 79-102.

52. HASELGROVE, L.; BOTTING, D.; VAN HEESWIJCK, R.; HOJ, P. B.; DRY, P. R.; FORD, C.; ILAND, P. 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.
53. HIRATSUKA, S.; ONODERA, H.; KAWAI, Y.; KUBO, T.; ITOH, H.; WADA, R. 2001. ABA and sugar effects on anthocyanin formation in grape berry cultured in vitro. Scientia Horticulturae. 90: 121-130.
54. HOLTON, T. A.; CORNISH, E. C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell. 7: 1071-1083.
55. HUANG, Z.; OUGH, C. S. 1991. Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. American Journal of Enology and Viticulture. 42: 261-267.
56. INABA, A.; ISHIDA, M.; SOBAJIMA, Y. 1974. Regulation of ripening in grapes by hormone treatments. Science Rep. Kyoto Prefectural University Agriculture. 26:25-31.
57. _____; _____; _____. 1976. Changes in endogenous hormones concentrations during berry development in relation to ripening of Delaware grapes. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 45: 245-252.
58. JAAKOLA, L.; MÄÄTTÄ, K.; PIRTTILÄ, A. M.; TÖRRÖNEN, R.; KÄRENLAMPI, S.; HOHTOLA, A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. Plant Physiology. 130: 729-739.
59. JEONG, S. T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. Plant Science. 167. 247-252.
60. KATAOKA, I.; SUGIURA, A.; UTSUNOMIYA, N.; TOMANA, T. 1982. Effect of abscisic acid and defoliation on anthocyanin accumulation in Kyoho grapes (*Vitis vinifera* L. x *V. labruscana* Baily). Vitis. 21: 325-32.

61. _____.; KUBO, Y.; SUGIURA, A.; TOMANA, T. 1984. Effects of temperature, cluster shading and some growth regulators on L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in black grapes. *Memoirs of the College of Agriculture*. 124: 35-44.
62. KELLER, M.; HRAZDINA, G. 1998. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49: 341-349.
63. _____.; MILLS, L. J.; WAMPLE, R. L.; SPAYD, S. E. 2004. Crop load management in "Concord" grapes using different pruning techniques. *American Journal of Enology and Viticulture*. 55: 35-49.
64. _____.; _____.; _____.; _____. 2005. Cluster thinning effects on three deficit-irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*. 56: 91-103.
65. KISHOR, P. B. K.; HONG, Z.; MIAO, G.; CAA HU, H.; VERMA, D. P. S. 1995. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*. 108: 1387-1394.
66. KLIEWER, W. M. 1968. Changes in the concentration of free amino acids in grape berries during maturation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 19 (3): 166-174.
67. _____. 1969. Free amino acids and other nitrogenous substances of table grape varieties. *Journal of Food Science*. 34: 274-278.
68. _____. 1970. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *Journal of Food Science*. 35: 17-21.
69. KOUTROUMANIDIS, J. 2002. Winetitles. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado en marzo 2011. Disponible en <http://www.practicalwinery.com/images/JulyAugust02/julaug02p15.gif>
70. KOYAMA, K.; SADAMATSU, K.; GOTO-YAMAMOTO, N. 2010. Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional and Integrative Genomics*. 10: 367-381.

71. KREUZALER, F.; HAHLBROCK, K. 1972. Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants; formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *FEBS Letters*. 28: 69-72.
72. LAFON-LAFOURCADE, S.; GUIMBERTEAU, G. 1962. Evolution des aminoacides au cours de la maturation des raisons. *Vitis*. 3: 130-135.
73. LAMAR, J. 2009. Pinot Noir. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado en junio 2011. Disponible en http://www.winepros.org/wine101/grape_profiles/pinot.htm
74. LARSON, R. L.; COE, E. H. 1977. Gene-dependent flavonoid glucosyltransferase in maize. *Biochemical Genetics*. 15: 153-156.
75. LEWIS, C. E.; WALKER, J. R. L.; LANCASTER, J. E. 1995. Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*. 54: 315-319.
76. MARRS, K. A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47: 127-158.
77. MATSUSHIMA, J.; HIRATSUKA, S.; TANIGUCHI, N.; WADA, R.; SUZAKI, N. 1989. Anthocyanin accumulation and sugar content in the skin of grape cultivar 'Olympia' treated with ABA. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 58: 551-555.
78. MATTHEWS, M. A.; ANDERSON, M. M. 1988. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39: 313-320.
79. _____; ISHII, R.; ANDERSON, M. M.; O' MAHONY, M. 1990. Dependence of wine sensory attributes on vine water status. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 51: 321-335.
80. MAZZA, G.; BROUILLARD, R. 1987. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*. 25: 207-225.
81. _____; _____. 1990. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*. 29: 1097-1102.

82. _____.; MINIATI, E. 1993. Anthocyanins in *Vitis vinifera*. In: Flanzy, C. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Madrid, España. AMV ediciones. pp. 150-153.
83. _____.; FUKUMOTO, L.; DELAQUIS, P.; GIRARD, B.; EWERT, B. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47: 4009-4017.
84. MERLIN, J. C.; STATOUA, A.; BROUILLARD, R. 1985. Investigation of the in vivo organization of anthocyanins using resonance raman microspectrometry. *Phytochemistry*. 24: 1575-1581.
85. MERZLYAK, M. N.; MELO, T. B.; NAQVI, K. R. 2008a. Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit; signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *Journal of Experimental Botany*. 59: 349-359.
86. _____.; CHIVKUNOVA, O. B.; SOLOVCHENKO, A. E.; NAQVI, K. R. 2008b. Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves. *Journal of Experimental Botany*. 59: 3903-3911.
87. MILLERY, A.; DUTEURTRE, B.; BONDAILLE, J. P.; MAUJEAN, A. 1986. Differentiation des trios cepages champenois a partir de l'a-nalyse des acides amines libres des mouts des recoltes 1983 et 1984. *Revue Francaise Oenologie*. 103: 32-50.
88. MORI, K.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KITAYAMA, M.; KOBAYASHI, S.; SUGAYA, S.; GEMMA, H.; HASHIZUME, K. 2005. Effects of abscisic acid treatment and night temperatures on anthocyanin composition in Pinot Noir grapes. *Vitis*. 44: 161-165.
89. _____.; _____.; _____.; HASIZUME, K. 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*. 58: 1935-1945.
90. _____.; _____.. 2007. Effect of high temperature on anthocyanin composition and transcription of flavonoid hydroxylase genes in Pinot Noir grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 82: 199-206.

91. MOUSTAFA, E.; WONG, E. 1967. Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry*. 6: 625-632.
92. MULLINS, M. G.; BOUQUET, A.; WILLIAMS, L. E. 1992. Developmental physiology; flowering and fruiting. In: Cambridge University Press. ed. *Biology of the grapevine*. New York, USA, Cambridge University Press. pp. 112-146.
93. MUNNS, R.; CRAMER, G. R. 1996. Is coordination of leaf and root growth mediated by abscisic acid? *Opinion. Plant and Soil*. 185: 33-49.
94. NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 18: 185-193.
95. OJEDA, H.; ANDARY, C.; KRAEVA, E.; CARBONNEAU, A.; DELOIRE, A. 2002. Influence of pre- and post- véraison 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: 261-267.
96. OJEDA, H.; CARRILLO, N.; DEIS, L.; TISSEYRE, B.; HEYWANG, M.; CARBONNEAU, A. 2005. Precision viticulture and water status II: quantitative and qualitative performance of different within field zones, defined from water potencial zapping. *Comptes Rendues GESCO*. 2: 741-748.
97. OKAMOTO, G.; KUWAMURA, T.; HIRANO, K. 2004. Effects of water deficit stress on leaf and berry ABA and berry ripening in Chardonnay grapevines (*Vitis vinifera*). *Vitis*. 43: 15-17.
98. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO. 2007. *Récueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. Office International de la Vigne et du Vin. Paris, France.
99. OUGH, C. S. 1969. Ammonia content of California grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*. 20: 213-220.

100. _____; STASHAK, R. M. 1974. Further studies on proline concentration in grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 25: 7-12.
101. PASTOR DEL RÍO, J. L.; KENNEDY, J. A. 2006. Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57: 125-132.
102. PEPPI, M. C.; FIDELIBUS, M. W.; DOKOOZLIAN, N. 2006. Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation and color of 'Flame Seedless' grapes. *HortScience*. 41: 1449-1445.
103. _____; _____; _____. 2007. Application timing and concentration of abscisic acid affect the quality of 'Redglobe' grapes. *Journal of Horticulture and Science Biotechnology*. 82: 304-310.
104. _____; WALKER, M. A.; FIDELIBUS, M. W. 2008a. Application of abscisic acid rapidly upregulated UFGT gene expression and improved color of grape berries. *Vitis*. 47: 11-14.
105. _____; FIDELIBUS, M. W.; DOKOOZLIAN, N. K. 2008b. Timing and concentration of abscisic acid applications affect the quality of 'Crimson Seedless' grapes. *International Journal of Fruit Science*. 7: 71-83.
106. PILATI, S.; PERAZZOLLI, M.; MALOSSINI, A.; CESTARO, A.; DEMATTE, L.; FONTANA, P.; DAL RI, A.; VIOLA, R.; VELASCO, R.; MOSER, C. 2007. Genome-wide transcriptional análisis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison. *BMC Genomics*. 8: 1471-2164.
107. PIRIE, A.; MULLINS, M. G. 1976. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid. *Plant Physiology*. 58: 468-472.
108. POU, A.; FLEXAS, J.; ALSINA, M. DEL M.; BOTA, J.; CARAMBULA, C.; DE HERRALDE, F.; GALMÉS, J.; LOVISOLO, C.; JIMÉNEZ, M.; RIBAS-CARBÓ, M.; RUSJAN, D.; SECCHI, F.; TOMÀS, M.; ZSÓFI, Z.; MEDRANO, H. 2008. Adjustments of water use efficiency by stomatal regulation during drought and recovery in the drought-

adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* × *V. rupestris*).
Physiologia Plantarum. 134: 313–323.

109. RASBAND, W. 1997. ImageJ 1.39. (en línea). Bethesda, Maryland, USA, National Institute of Mental Health. Consultado en febrero 2011. Disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
110. ROBY, G.; HARBERTSON, J. F.; ADAMS, D. A.; MATTHEWS, M. A. 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.
111. ROOSENS, N. H. C. J.; THU, T. T.; ISKANDAR, H. M.; MICHEL, J. 1998. Isolation of the Ornithine- δ -Aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 117: 263-271.
112. SACHER, J. A. 1973. Senescence and postharvest physiology. *Annual Review of Plant Physiology*. 24: 197-224.
113. SARNI-MANCHADO, P.; FULCRAND, H.; SOUQUET, J.-M.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. 1996. Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *Journal of Food Science*. 61: 938–941.
114. SAS/STAT. 2007, The SAS System 9.2. Cary, Estados Unidos, SAS Institute. s.p.
115. SCHWARTZ, S. H.; QIN, X.; ZEEVAART, J. A. D. 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology*. 131: 1591-1601.
116. SEKI, M.; UMEZAWA, T.; URANO, K.; SHINOZAKI, K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 296-302.
117. SPARVOLI, F.; MARTIN, C.; SCIENZA, A.; GAVAZZI, G.; TONELLI, C. 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*V. vinifera*). *Plant Molecular Biology*. 24: 743–755.
118. SPAYD, S.E.; TARARA, J. M.; MEE, D. L.; FERGUSON, J. C. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of

Vitis vinifera cv. Merlot berries. American Journal of Enology and Viticulture. 53: 171-182.

119. STAFFORD, H. A.; LESTER, H. H. 1982. Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4,-diol'. Plant Physiology. 70: 695-698.
120. STEFFAN, H.; RAPP, A.; ULLEMEYER, H.; KUPFER, G. 1975. Über den reifeabhängigen Säure-Zucker-Stoffwechsel bei beeren von *V. vinifera*-Sorten, untersucht mit ¹⁴C-Verbindungen. Vitis. 14: 181-189.
121. _____; NAYLOR, D. J.; HOJ, P. B.; VAN HEESWIJCK, R. 1999. Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. Plant Physiology. 120: 923-931.
122. _____; GRUBB, J. H.; GOCKOWIAK, P.A.; HENSCHKE, P.B.; HØJ, VAN HEESWIJCK, R. 2000. Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards; Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. Australian Journal of Grape and Wine Research. 6: 150-158.
123. SZYJEWICZ, E.; ROSNER, N.; KLIEWER, W.M. 1984. Etephon ((2-Chloroethyl) phosphonic acid, Ethrel, CEPA) in viticulture- a review. American Journal of Enology and Viticulture. 35: 117-123.
124. TAYLOR, H. F.; SMITH, T. A. 1967. Production of plant growth inhibitors from xanthophylls; a possible source of dormin. Nature. 215: 1513-4.
125. TERRIER, N.; ROMIEU, C. 2001. Grape berry acidity. In: Roubelakis-Angelakis, K. A. ed. Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer. pp. 35-37.
126. TOGORES, J. H. 2003. Morfología, maduración y composición del racimo. In: Mundi-Prensa. ed. Tratado de enología. Madrid, España, Mundi-Prensa. v. 1, 162 p.
127. TOMANA, T.; UTSUNOMIYA, N.; KATAOKA, Y. 1979: The effect of environmental temperatures on fruit ripening on the tree. II. The effect of temperatures around whole vines and clusters on the coloration of 'Kyoho' Grapes. Journal of the Japanese Society of Horticultural Science. 48: 261-266.

128. TONIETTO, J.; CARBONNEAU, A. 2004. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. *Agricultural and Forest Meteorology*. 124: 81-97.
129. URUGUAY. INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA. 2010. Resumen de datos nacionales. Variedades tintas. Variedades con mayor producción. Variedades tintas de vino. (en línea). Montevideo, Instituto Nacional de Vitivinicultura. Consultado en marzo 2011. Disponible en http://www.inavi.com.uy/sitio/home/home/index.php?menu=sub1b_1&menu2=sub2b_2&menu3=sub3b_14&t=secciones&secc=450&sub=462&sub1=462&sub2=757.
130. VAN HEESWIJCK, R.; STINES, A. P.; GRUBB, J.; SKRUMSAGER MOLLER, I.; HOJ, P. B. 2001a. Pathways of proline biosynthesis. Genes encoding P5CS and OAT are expressed in grape berry tissue. In: Roubelakis-Angelakis, K. A. ed. *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer. pp. 94-97.
131. _____; _____; _____; _____. 2001b. Proline accumulation in plants In: Roubelakis-Angelakis, K. A. ed. *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer. pp. 91-92.
132. VERSARI, A.; BOULTON, R. B.; PARPINELLO, G. P. 2008. A comparison of analytical methods for measuring the color components of red wines. *Food Chemistry*. 106: 397-402.
133. VINCENT, D.; ERGÜL, A.; BOHLMAN, M. C.; TATTERSALL, E. A. R.; TILLET, R. L.; WHEATLEY, M. D.; WOOLSEY, R.; QUILICI, D. R.; JOETS, J.; SCHLAUCH, K.; SCHOOLEY, D. A.; CUSHMAN, J. C.; CRAMER G. R. 2007. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *Journal of Experimental Botany*. 58: 1873-1892.
134. WHEELER, S.; LOVEYS, B.; FORD, C.; DAVIES, C. 2009. The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. Berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 15: 195-204.

135. GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV- visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*. F1.2, 1:13
136. WINKEL-SHIRLEY, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. 126: 485-493.
137. YAKUSHIJI, H.; MORINAGA, K.; KOBAYASHI, S. 2001. Promotion of berry ripening by 2, 3, 5 - Triiodobenzoic acid in 'Kyoho'grapes. *Journal of the Japanese Society of Horticulture and Science*. 70: 185-190.
138. YANG, Y.; SULPICE, R.; HIMMELBACH, A.; MEINHARD, M.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. 2006. Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 6061-6066.
139. ZHANG, M.; LENG, P.; ZHANG, G.; LI, X. 2009. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *Journal of Plant Physiology*. 166: 1241-1252.