

RESPUESTA DE *VITIS VINIFERA* L. CV. MALBEC A UV-B Y ABA

Tesis para cumplir con los requerimientos al Grado de Doctor
en Ciencias Biológicas con orientación en Fisiología

Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad
Nacional de Cuyo

MSc. Federico Berli

Director: Dr. Rubén Bottini
Codirector: Dr. Hernán Boccalandro

Mendoza

2011

Este trabajo se presenta para cumplir con los requerimientos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con orientación en Fisiología, Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cuyo. El mismo fue realizado en la Cátedra de Química Orgánica y Biológica, y en el Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Director: Dr. Rubén Bottini

Codirector: Dr. Hernán Boccalandro

Jurado de tesis:

Dr. Rodolfo Sánchez

Dr. Luis Marone

Dra. Ana Scopel

AGRADECIMIENTOS

Deseo extender mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Rubén Bottini por su guía, estímulo y apoyo permanente, y a mi codirector el Dr. Hernán Boccalandro.

A mis compañeros del Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), principalmente por su amistad.

A los investigadores Bruno Cavagnaro, Patricia Piccoli, María Fernanda Silva y Ricardo Bressan-Smith, por haber compartido su experiencia y conocimiento.

A la empresa Bodegas Esmeralda SA (Catena Zapata) y a los integrantes de su Departamento de Investigación y Desarrollo (Alejandro Vigil, Alejandro Sejanovich, Roberto Bolorinos, Felipe Stahlschmidt, Fernando Buscema y Federico Rodriguez), por su participación y cofinanciación de los experimentos.

A todos los que colaboraron (Daniela Moreno, Leonardo Bolcato, Ana Cohen, Mariela Pontín, Leandro Hespanhol-Viana, Caren Maricel Lucero, Mercedes Fucili, Rodrigo Alonso y Martín Fanzone).

A mis amigos y muy especialmente a mi familia.

RESUMEN

Malbec es la variedad de uva tinta más importante en la vitivinicultura argentina, especialmente en Mendoza, donde se produce más del 80% del total nacional. Las zonas ubicadas a mayor altitud están experimentando un aumento en la superficie cultivada, ya que en ellas se producen uvas con altos contenidos de compuestos fenólicos, responsables de muchas de las características deseadas en los vinos tintos, por su valor organoléptico y capacidad antioxidante.

La cantidad de radiación ultravioleta-B (UV-B; 280-315 nm) que llega a la superficie terrestre es mayor a medida que aumenta la altitud. En Mendoza los viñedos más altos, alrededor de los 1.500 m sobre el nivel del mar (snm), reciben niveles de UV-B que pueden hacer aumentar los contenidos de fenoles en las hojas y bayas, aunque también podrían ser dañinos para el normal crecimiento y desarrollo de los diferentes tejidos. El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que media las respuestas de las plantas a diferentes factores estresantes (salinidad, temperatura y deficiencia hídrica), y posiblemente también a UV-B, mitigando sus efectos negativos.

No hay datos sobre los niveles de UV-B que se perciben en los viñedos de altura en la provincia de Mendoza en los distintos momentos de crecimiento y desarrollo de las plantas. Hay pocas referencias sobre los efectos de UV-B en la fisiología y bioquímica de la vid utilizando metodologías experimentales correctas, sin que modifiquen los balances naturales entre UV-B y los otros tipos de radiación solar. La restricción hídrica es una práctica habitual en los viñedos para aumentar la concentración de compuestos fenólicos, en base al supuesto que incrementa los niveles de ABA en el flujo xilemático. Las situaciones de alto ABA y UV-B son presumiblemente frecuentes en los viñedos de altura, y no hay trabajos que aborden la interacción entre ABA y UV-B en la fisiología y bioquímica de las plantas.

A partir de estos antecedentes, planteé como objetivos caracterizar la radiación UV-B que reciben los viñedos ubicados a mayor altitud en Mendoza, estudiando los efectos de UV-B, las aplicaciones de ABA y de su interacción, sobre aspectos fisiológicos y bioquímicos que afectan el crecimiento de las bayas (rendimiento cuantitativo) y la calidad enológica de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec.

Utilicé dos sistemas experimentales: plantas de vid cv. Malbec de un año de edad en macetas y plantas de más de 10 años de edad en uno de los viñedos a mayor altitud. Los experimentos se realizaron con dos tratamientos de UV-B combinados con dos de ABA. En uno se excluyó la radiación UV-B solar (-UV-B) cubriendo las plantas con un poliéster que absorbe la mayoría de la UV-B sin afectar los otros tipos de radiación, y en el otro se permitió que la UV-B (+UV-B) llegara a las plantas utilizando un polietileno transparente a la mayoría de las radiaciones solares. Las plantas de los tratamientos -UV-B y +UV-B fueron asperjadas semanalmente con ABA (+ABA) o con H₂O (-ABA).

Determiné que las intensidades máximas de UV-B se producen entre las 13:00 y 13:45 hs,

cuando los rayos solares son más perpendiculares a la superficie terrestre y la distancia del sol es menor; y que los niveles aumentan en verano, siendo diciembre y enero los meses en los que se producen los máximos, cuando el eje de la Tierra está inclinado completamente hacia el sol.

El tratamiento +UV-B no produjo daño sobre los pigmentos fotosintéticos (clorofilas *a*, *b* y carotenoides) e incluso aumentó el contenido de carotenoides, compuestos que tienen la capacidad de disipar el exceso de energía en el sistema fotosintético. +UV-B también incrementó el contenido de ABA y el de pigmentos fotoprotectores, compuestos fenólicos que absorben este tipo de radiación, se acumulan en la epidermis de las hojas y tienen capacidad antioxidante. Los compuestos fenólicos de las hojas incrementaron tanto por +UV-B como por +ABA y fueron principalmente flavonoles (quercetina y kaempferol) y ácidos hidroxicinámicos (ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico), siendo la quercetina el compuesto más abundante. La enzima antioxidante catalasa (CAT) aumentó su actividad por +ABA; y al igual que las enzimas ascorbato peroxidasa (APX) y peroxidasa (POX) tuvieron la máxima actividad en el tratamiento combinado +UV-B/+ABA. Los esteroides son compuestos que le proporcionan estabilidad estructural a las membranas celulares y el β -sitosterol, esteroide más abundante, aumentó por +ABA, independientemente de los tratamientos UV-B. Los cambios en el contenido de pigmentos fotoprotectores, la actividad de las enzimas antioxidantes y los esteroides de membrana se correlacionaron con una disminución en el daño producido por +UV-B a la membrana celular, aunque el contenido de MDA, indicador de la peroxidación de los lípidos aumentó en +UV-B. En base a estos resultados propongo un modelo de defensa de los tejidos a la UV-B.

Los niveles de ABA en los hollejos de las bayas aumentaron marcadamente desde el inicio del envero, momento en el que las bayas empiezan a colorear y acumular azúcar; hasta 20 días después, para disminuir hacia la cosecha, indicando un posible papel de la fitohormona en el control de la maduración. +UV-B produjo una reducción del tamaño de las bayas y del contenido absoluto de azúcar, aunque no hubo efecto en valores de concentración (dependiente del tamaño de la baya) a cosecha. Sin embargo, en el inicio del envero tanto +UV-B como +ABA indujeron un aumento de los contenidos de azúcar en las bayas. El contenido de compuestos fenólicos en los hollejos fue incrementado por +UV-B y +ABA, produciéndose, al igual que con el contenido de azúcar, un anticipo en el inicio de su acumulación. La mayoría de los compuestos fenólicos en los hollejos fueron aumentados por +UV-B, con un incremento adicional cuando se combinó con +ABA, modificando los perfiles de antocianos y de fenoles de bajo peso molecular, aumentando la proporción de aquellos con mayor capacidad antioxidante. +ABA no produjo el mismo efecto que +UV-B respecto a la acumulación de compuestos fenólicos, sugiriendo que la señalización de UV-B no está solamente mediada por ABA y que otros factores posiblemente están involucrados. Estos

resultados se correspondieron con los que se obtuvieron al analizar diferentes temporadas de cultivo.

ABSTRACT

Malbec is the most important red grapevine variety in the Argentinean wine industry and Mendoza produces over 80% of the total. The areas located at higher altitudes are experiencing increases in vineyards, mainly because of the production of grapes rich in phenolic compounds, responsible for many of the desired characteristics in red wines, for its organoleptic and antioxidant value.

The levels of ultraviolet-B (UV-B; 280-315 nm) radiation reaching the Earth's surface are greater as altitude increases. In Mendoza the highest vineyards located at ca. 1,500 m above sea level are exposed to UV-B levels that can increase the content of phenols in the leaves and berries, although these levels may also be harmful to normal growth and development of the different tissues. Abscisic acid (ABA) is a phytohormone that mediates plant responses to different stresses (salinity, extreme temperature and water deficit), and possibly also to UV-B, mitigating its negative effects.

There are no data on solar UV-B levels perceived by the high altitude vineyards in Mendoza during the growth and development of plants. Moreover, there are few references on the effects of UV-B on the physiology and biochemistry of the vine using correct experimental methodologies that do not change the natural balance between UV-B and other types of solar radiation. Water restriction is a common viticultural practice used to increase the concentration of phenolic compounds based on the assumption that augments levels of ABA in the xylem stream. Thus, the situations of high ABA and UV-B are presumably frequent in elevated vineyards, but there are not experiments that have addressed the interaction between ABA and UV-B on the physiology and biochemistry of plants.

Based on the above, the objective was to characterize the UV-B radiation received by plants in one of the highest-altitude vineyards in Mendoza, studying the effects of UV-B, the application of ABA, and their interaction, on physiological and biochemical aspects affecting grapes growth (yield) and enological quality of *Vitis vinifera* L. cv. Malbec.

Two experimental systems were used: Malbec one year old plants grown in pots, and plants of more than 10 years of age in one of the highest altitude vineyards. The experiments were performed with two UV-B treatments combined with two ABA treatments. Solar UV-B was excluded (-UV-B) by covering the plants with a polyester film which absorbs most UV-B without affecting other types of radiation, while in the other treatment solar UV-B was allowed (+UV-B) by using a polyethylene transparent to most solar radiation. The -UV-B and +UV-B plants were sprayed weekly with ABA (+ABA) or H₂O (-ABA).

The peak UV-B intensities occur between 01:00 and 01:45 PM, when the sun's rays are perpendicular to the ground and the distance from the sun is lower, while the levels increase in summer, with December and January as the months in which the maximum occurs, when the Earth's axis is fully tilted towards the sun.

The +UV-B treatment did not damage the photosynthetic pigments (chlorophylls *a*, *b* and

carotenoids) and even increased the content of carotenoids, compounds that can dissipate excess of energy in the photosynthetic system. +UV-B also increased ABA content and photoprotective pigments, phenolic compounds that absorb this type of radiation and accumulate in the leaf epidermis having antioxidant capacity. The phenolic compounds of leaves increased both under +UV-B and +ABA, and were mainly flavonols (quercetin and kaempferol) and hydroxycinnamic acids (caffeic, ferulic and *p*-coumaric acids), quercetin being the most abundant compound. The antioxidant enzyme catalase (CAT) increased its activity under +ABA; and as well as ascorbate peroxidase (APX) and peroxidase (POX) had maximum activity in the combined treatment +UV-B/+ABA. The sterols are compounds that provide structural stability to cell membranes and β -sitosterol, the most abundant sterol, increased under +ABA, regardless of UV-B treatments. Changes in photoprotective pigment content, the activity of antioxidant enzymes, and membrane sterols, correlated with a decrease in the damage produced by +UV-B to the cell membrane, although the contents of MDA, an indicator of lipid peroxidation, increased under +UV-B. Based on these results a model of tissues defense against UV-B is proposed.

ABA levels in the berry skins increased sharply from veraison, when the berries begin to color and accumulate sugars, up to 20 days later and subsequently decreased towards harvest, indicating a possible role of the phytohormone in controlling maturation. +UV-B caused a reduction in berry size and sugar absolute content, although there was no effect on concentration values (depending on the size of the berry) at harvest. However, at veraison, +UV-B and +ABA induced an increase in berry sugar content. The phenolic compounds in the skins were increased by +UV-B and +ABA, showing an advance in the onset of its accumulation. Most phenolic compounds in the skins were increased by +UV-B, with a further increase when combined with +ABA, changing profiles of anthocyanins and phenols of low molecular weight, and increasing the proportion of those with higher antioxidant capacity. +ABA did not produce the same effect as +UV-B respect to phenolic compounds accumulation, suggesting that the UV-B signaling is not only mediated by ABA and other factors are possibly involved. These results were consistent with those obtained analyzing different growing seasons.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- Berli F, Moreno D, Piccoli P, Hespanhol-Viana L, Silva MF, Bressan-Smith R, Cavagnaro JB, Bottini R. "Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet- absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols". *Plant, Cell and Environment* (2010) 33: 1-10
- Berli F, Fanzone M, Piccoli P, Bottini R. "Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. regulating biosynthesis of berry skin polyphenols". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2011). DOI: 10.1021/jf200040z

ABREVIACIONES

2007	temporada 2006-2007
2008	temporada 2007-2008
2009	temporada 2008-2009
2010	temporada 2009-2010
ABA	ácido abscísico
+ABA	tratamientos con aplicaciones de ABA
-ABA	tratamientos sin aplicaciones de ABA
absol	valores absolutos
ADN	ácido desoxirribonucleico
ACP	análisis multivariados de componentes principales
APX	ascorbato peroxidasa
ARN	ácido ribonucleico
°Brix	concentración relativa de azúcar
BSA	albúmina de suero bovino (bovine serum albumin)
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
CAT	catalasa
CE	conductividad eléctrica
Chl	clorofilas
CHS	chalcona sintasa
CIE	Comisión Internacional de Iluminación (Commission Internationale de l'Éclairage)
conc	valores de concentración
CP	componente principal
CZE	electroforesis capilar de zona (capillary zone electrophoresis)
DDF	días después de floración
DMSO	dimetilsulfóxido
DOI	identificador digital de objetos (digital object identifier)
F3'H	flavonoide 3'-hidroxilasa
F3'5'H	flavonoide 3'5'-hidroxilasa
FLS	flavonol sintasa
GC-EIMS	cromatografía gaseosa capilar con espectrometría de masa por impacto de iones (gas chromatography with electron impact mass spectrometry)
GR	glutación reductasa
GWC	Red Internacional de las Grandes Capitales del Vino (Great Wine Capitals Global Network)
HPLC-DAD	cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector con arreglo de diodos (high-performance liquid chromatography with diode-array detection)
HR	humedad relativa del aire
INV	Instituto Nacional de Vitivinicultura
IPT	índice de polifenoles totales
MDA	malondialdehído
MEP	metil-eritritol fosfato
snm	sobre el nivel del mar
m/z	relación masa-carga (mass-to-charge ratio)
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (National Institute of Standards and Technology)
OD	absorbancia (optical density)
OMT	O-metiltransferasa
ORAC	capacidad de absorción de radicales de oxígeno (oxygen radical absorbance capacity)
<i>P</i>	nivel de significancia
<i>P</i> _{ABA}	nivel de significancia del factor ABA
<i>P</i> _{DDF}	nivel de significancia del factor momento de desarrollo
<i>P</i> _{MES}	nivel de significancia del factor mes
<i>P</i> _{TEMPORADA}	nivel de significancia del factor temporada de cultivo

P_{UV-B}	nivel de significancia del factor UV-B
$P_{UV-B \times ABA}$	nivel de significancia de la interacción entre los factores UV-B y ABA
PAL	fenilalanina amonio liasa
PAR	radiación fotosintéticamente activa (photosynthetically active radiation)
PE	poliéster cristal
PET	polietileno de baja densidad
PF	peso fresco
POX	peroxidasa
PRD	dsecamiento parcial de raíces (partial root drying)
PS	peso seco
PSII	fotosistema II
PVPP	polivinilpolipirrolidona
r^2	coeficiente de correlación
ROS	especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
SEM	error estándar de la media (standard error of the mean)
SIM	monitoreo de iones seleccionados (selective ion monitoring)
SOD	superóxido dismutasa
T amplitud	amplitud térmica del aire
T máx	temperatura máxima del aire
T med	temperatura media del aire
T mín	temperatura mínima del aire
UV	radiación ultravioleta
UVAC	compuestos fenólicos que absorben UV (ultraviolet absorbing compounds)
+UV-B	tratamientos con UV-B
-UV-B	tratamientos con exclusión de UV-B
UV-B _{BE}	UV-B biológicamente efectiva

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Capítulo 1: Introducción general	14
1.1. Radiación UV-B	14
1.1.1. Introducción	14
1.1.2. Radiación UV-B en el ambiente y métodos de medición	15
1.1.3. Respuestas de las plantas a UV-B	17
1.2. Ácido abscísico	20
1.3. Interacción entre UV-B y ABA	22
1.4. Compuestos fenólicos	22
1.5. Vitivinicultura en Mendoza, cv. Malbec y prácticas frecuentes de manejo	26
1.6. Hipótesis general	28
1.7. Objetivo general	28
2. Capítulo 2: Características de la radiación UV-B en uno de los viñedos ubicado a mayor altitud en Mendoza	29
2.1. Hipótesis	29
2.2. Objetivos específicos	29
2.3. Materiales y métodos	29
2.4. Análisis estadístico	30
2.5. Resultados y discusión	30
2.6. Conclusiones	34
3. Capítulo 3: Respuesta del tejido foliar de plantas de vid cv. Malbec a UV-B y ABA	35
3.1. Hipótesis	35
3.2. Objetivos específicos	35
3.3. Materiales y métodos	35
3.3.1. Material vegetal y diseño experimental	35
3.3.2. Tratamientos	36
3.3.3. Mediciones	39
3.3.3.1. Radiaciones UV-B y PAR	39
3.3.3.2. Ácido abscísico	39
3.3.3.3. Pigmentos fotoprotectores	41
3.3.3.4. Compuestos fenólicos y esteroides de membrana	41
3.3.3.5. Pigmentos fotosintéticos	42
3.3.3.6. Integridad de la membrana celular	42
3.3.3.7. Peroxidación de lípidos de membrana	43
3.3.3.8. Contenido de proteínas y actividad de enzimas antioxidantes	43
3.3.4. Análisis estadístico	44
3.4. Resultados	44
3.5. Discusión	50
3.6. Conclusiones	53
4. Capítulo 4: Efectos de UV-B y ABA sobre bayas de vid cv. Malbec	56
4.1. Hipótesis	56
4.2. Objetivos específicos	56
4.3. Materiales y métodos	56
4.3.1. Material vegetal y diseño experimental	56
4.3.2. Tratamientos	57
4.3.3. Muestreo de bayas y determinaciones de su peso, volumen y contenido de azúcar	60

4.3.4. Extracción de ABA y de compuestos fenólicos en hollejos	60
4.3.5. Contenido de ABA en hollejos	60
4.3.6. Contenido y perfil de antocianos y fenoles de bajo peso molecular en hollejos	61
4.3.7. Análisis estadístico	62
4.4. Resultados	62
4.4.1. Crecimiento y contenido de azúcar de las bayas	62
4.4.2. Contenido de ABA en los hollejos	65
4.4.3. Contenido y perfil de antocianos en los hollejos	66
4.4.4. Contenido y perfil de fenoles de bajo peso molecular en hollejos	69
4.5. Discusión	76
4.6. Conclusiones	81
5. Capítulo 5: Efectos de UV-B, ABA, su interacción, la temporada y el momento de desarrollo de las bayas sobre la calidad enológica del cv. Malbec	83
5.1. Hipótesis	83
5.2. Objetivos específicos	83
5.3. Materiales y métodos	83
5.3.1. Material vegetal y diseño experimental	83
5.3.2. Tratamientos	83
5.3.3. Muestreo de bayas y determinaciones de peso, contenido de azúcar, antocianos y polifenoles	84
5.3.4. Datos meteorológicos	84
5.3.5. Análisis estadístico	85
5.4. Resultados	85
5.5. Discusión	93
5.6. Conclusiones	94
6. Conclusiones finales	95
7. Bibliografía	97
8. Anexo	108

1. CAPÍTULO 1: Introducción general

1.1. Radiación UV-B

1.1.1. Introducción

Se denomina radiación ultravioleta (UV) a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida entre los 200 y los 400 nm. Se denomina así porque empieza desde longitudes de onda más cortas de lo que los humanos identificamos como el color violeta. Según la Comisión Internacional de Iluminación (CIE, Commission Internationale de l'Éclairage), organización internacional de normalización, la fracción ultravioleta se puede dividir en tres, dependiendo de las longitudes de onda: UV-C, UV-B y UV-A (**Figura 1.1 A**). La radiación UV-C (200-280 nm), que constituye la fracción de menor longitud de onda y por lo tanto es la que posee mayor energía por fotón, es totalmente absorbida por el ozono y el oxígeno atmosférico y no alcanza la superficie terrestre. Las radiaciones con longitudes de onda superiores a 290 nm son las únicas que llegan a la superficie de la Tierra (**Figura 1.1 B**). La radiación UV-B (280-315 nm), es mayormente absorbida por el ozono y los gases atmosféricos, aunque una cierta proporción pasa y aproximadamente el 5% del total de la energía solar ultravioleta que recibimos del sol (UV-B y UV-A; 290-400 nm) y el 0,5% del total de energía electromagnética solar en la superficie terrestre corresponden a la radiación UV-B (Caldwell y Flint, 1997; Krupa *et al.*, 1998). La radiación UV-A (315-400 nm), fracción de mayor longitud de onda, no se ve afectada por los gases atmosféricos y representa el 95% restante.

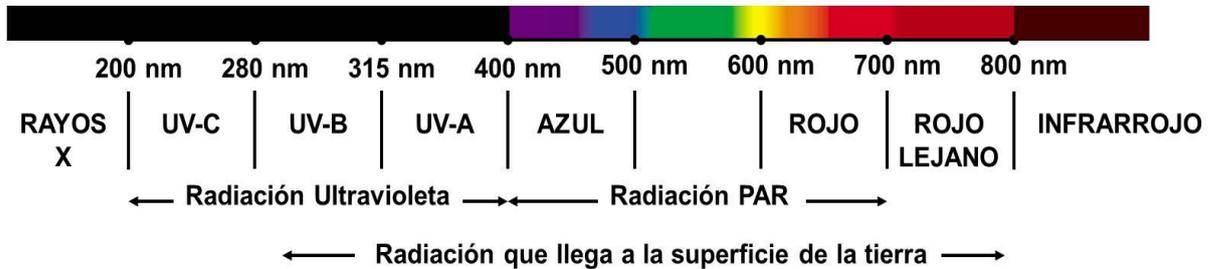
La radiación UV-B es la fracción del espectro electromagnético solar de menor longitud de onda y mayor energía que penetra la capa de ozono en la estratósfera, atraviesa la atmósfera y llega a la superficie terrestre. La mayoría de la radiación UV-B es absorbida por el ozono atmosférico y por lo tanto el UV-B representa solamente una pequeña fracción de la radiación solar que llega a la superficie terrestre (Pyle, 1997; McKenzie *et al.*, 2003 y 2007). No obstante, el UV-B tiene un impacto significativo en la biosfera porque es el componente más energético del espectro solar que la alcanza. UV-B puede dañar macromoléculas como el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, generar radicales libres y perjudicar procesos celulares. Es conocido que los niveles de UV-B solar en algunas regiones son suficientes para causar daños en los tejidos sensibles de los humanos y otros animales, y promover algunas formas de cáncer de piel. Sin embargo, UV-B no es solamente un agente dañino ya que tiene un papel importante como señal informativa (Ballaré *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1998; Boccacandro *et al.*, 2001; Brosché y Strid, 2003; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Paul y Gwynn-Jones, 2003; Ulm y Nagy, 2005; Gruber *et al.*, 2010). Las plantas perciben la luz del ambiente con dos consecuencias distintas, adquieren energía e información (Ballaré, 1999), donde la percepción de UV-B estimula respuestas que la ayudan a protegerse contra la misma y a reparar el daño que causa.

Las plantas están inevitablemente expuestas a UV-B porque necesitan captar la radiación

solar para la fotosíntesis, y el hecho que las plantas raramente muestren signos de daño por UV-B en los ambientes naturales, demuestra que han desarrollado mecanismos efectivos para protegerse y reparar los daños por UV-B.

A

Longitud de onda (nm)



B

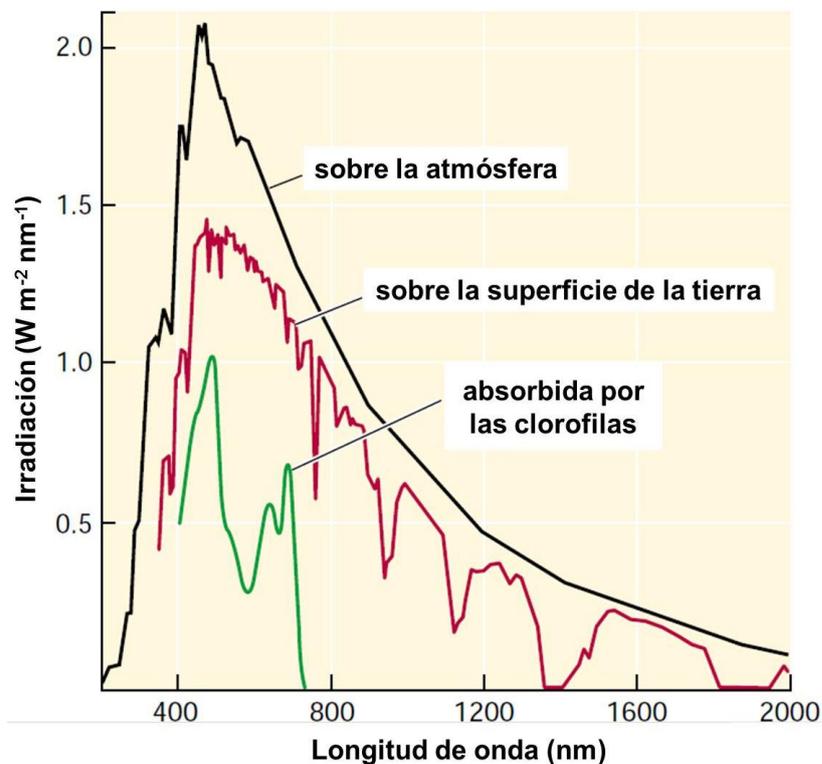


Figura 1.1 Espectro electromagnético solar por encima de la atmósfera y sobre la superficie terrestre (A) y (B), adaptado de (Taiz y Zeiger, 2002).

1.1.2. Radiación UV-B en el ambiente y métodos de medición

Aparte de la absorción por el ozono estratosférico, hay una variedad de factores que influyen sobre la cantidad de UV-B a la que las plantas están expuestas (McKenzie *et al.*, 2003; Paul y Gwynn-Jones, 2003). Uno de los factores más importantes que afectan los niveles de UV-B es el ángulo solar, ya que determina la trayectoria de la luz a través de la atmósfera. Así, la radiación UV-B es mayor en los trópicos y menor en las latitudes más altas. La elevación del sol varía con las estaciones del año y a lo largo del día por lo que, en latitudes medias y

altas, las intensidades de UV-B son mayores en verano que en invierno. Otro factor significativo es la altitud, que incrementa los niveles de UV-B debido a que hay menos masa de aire y mayor transparencia atmosférica a las radiaciones de menor longitud de onda a medida que nos elevamos (Madronich *et al.*, 1995; McKenzie *et al.*, 2003). La **Figura 1.2** muestra cómo aumentan las intensidades de UV-B que perciben las plantas al incrementar la altitud y está confeccionado en base a datos propios, registrados en la provincia de Mendoza, durante el mes de enero de 2007 (Berli, 2007). Los niveles de UV-B también varían por las condiciones meteorológicas (nubosidad, reflexión superficial y polución atmosférica), además de la absorción por las canopias vegetales que reducen fuertemente las cantidades de UV-B que alcanzan a las plantas.

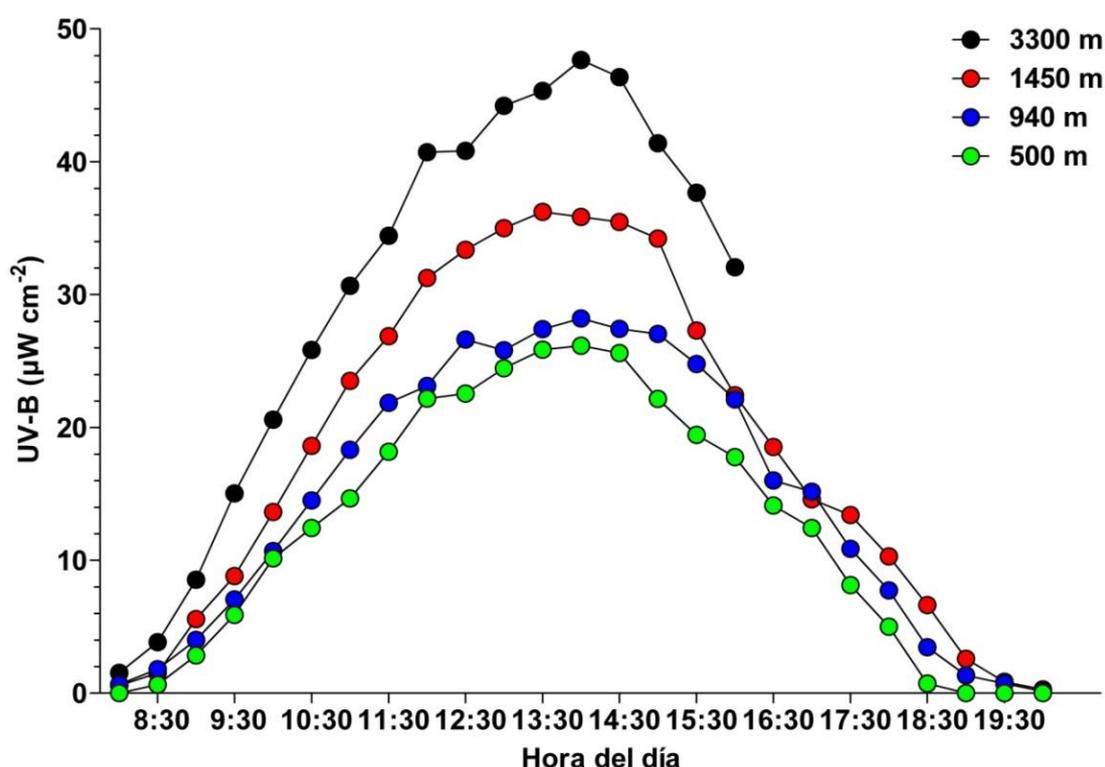


Figura 1.2 Intensidades de UV-B ($\mu\text{W cm}^{-2}$) registradas durante un día (entre el 22 y 26 de enero de 2007), a 500, 940, 1.450 y 3.300 m snm de altitud, en distintos lugares de la provincia de Mendoza: La Libertad ($33^{\circ}12'S$, $68^{\circ}28'O$), Facultad de Ciencias Agrarias ($33^{\circ}0'S$, $68^{\circ}52'O$), Gualtallary ($33^{\circ}24'S$, $69^{\circ}16'O$) y Laguna del Diamante ($34^{\circ}09'S$, $69^{\circ}41'O$), respectivamente.

Se han utilizado diferentes métodos para medir la radiación UV-B reportada en la literatura, por lo que puede resultar difícil y confuso hacer comparaciones entre distintos estudios. Algunos autores reportan la tasa del flujo de fotones ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), mientras que otros usan niveles de energía por unidad de área ($\text{KJ m}^{-2} \text{h}^{-1}$ o W m^{-2}). Las mediciones de los niveles de energía (irradiancia) son influenciadas por la distribución de las longitudes de onda de la fuente de luz, ya que las longitudes de onda más cortas son más energéticas. Además, muchos autores usan una medida ponderada de UV-B, radiación UV-B biológicamente

efectiva (UV-B_{BE}), que incorpora la efectividad biológica de UV-B, basándose en el espectro de acción para una respuesta seleccionada, como el enrojecimiento de la piel por quemadura solar (eritema) en humanos, o un espectro de acción de UV-B generalizado en las plantas (Caldwell, 1971; Caldwell *et al.*, 2003). Los distintos tipos de mediciones se adaptan a los diferentes propósitos. Para estudios de fotorecepción de UV-B y transducción de señales es más usual y apropiado medir la tasa del flujo de fotones, al igual que en otros estudios fotomorfogénicos, porque los procesos de fotorecepción generalmente involucran fotones individuales de acuerdo con el espectro de absorción del fotoreceptor. Sin embargo, si una respuesta particular resulta en daño de los tejidos o en daño molecular, la energía de la radiación parece ser más importante, por lo que las mediciones de la irradiancia serán más apropiadas.

1.1.3. Respuestas de las plantas a UV-B

Existen numerosos estudios sobre los efectos de UV-B en las plantas, en los que se han utilizado una gran variedad de especies, diferentes momentos del desarrollo, diversas condiciones de crecimiento, varias calidades espectrales, cantidades y duración de los tratamientos de UV-B. Estos estudios son difíciles de comparar, pero se pueden extraer algunas conclusiones generales. Primero, UV-B tiene un gran impacto sobre las plantas, provocando cambios en la expresión de genes, que pueden mediar total o parcialmente cambios en la fisiología, el crecimiento, la morfología y el desarrollo (Tevini y Teramura, 1989; Björn, 1996; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Stratmann, 2003). Segundo, las diferencias en las tasas de flujo, irradiancia, duración y longitud de onda de UV-B, producen diferencias considerables en las respuestas (Brosché y Strid, 2003; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Ulm y Nagy, 2005). Además, las respuestas son dependientes del contexto en el que se dé el tratamiento de UV-B, esto es la interacción con otras variables ambientales como son las cantidades de otras calidades de radiación, temperatura, agua y estado nutricional (Caldwell *et al.*, 2003; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Kakani *et al.*, 2003). En general, se observan efectos más moderados de UV-B en condiciones de campo que en condiciones con ambientes controlados (Caldwell *et al.*, 2003). Experimentos con balances irreales, es decir diferentes a los encontrados en ambientes naturales, entre las radiaciones UV-B, UV-A y la radiación fotosintéticamente activa (PAR, photosynthetically active radiation; 400 a 700 nm), pueden exagerar los efectos de UV-B (Björn, 1996; Caldwell y Flint, 1997; Allen *et al.*, 1998), posiblemente porque UV-A y PAR pueden inducir mecanismos de protección y de reparación, reduciendo el daño por UV-B (Jordan *et al.*, 1992).

Altos niveles de UV-B pueden causar daño directo o indirecto a una amplia gama de constituyentes celulares en los diferentes tejidos de las plantas. Hay reportes de daños al ADN, proteínas y lípidos, y de inhibición de las reacciones de la fotosíntesis, procesos de la membrana celular, etc. (Björn, 1996; Jansen *et al.*, 1998; Schmitz-Eiberger y Noga, 2001;

Frohnmeier y Staiger, 2003). Además, altos niveles de UV-B generan sobreproducción de radicales libres, llamados especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species), lo cual puede causar daño oxidativo a diferentes macromoléculas (Foyer *et al.*, 1994). Para protegerse del aumento de ROS, las plantas han desarrollado un sistema de defensa antioxidante que involucra tanto mecanismos enzimáticos como no enzimáticos. Los primeros están representados por enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), peroxidasa (POX) y glutatión reductasa (GR) (Karabal *et al.*, 2003), mientras que las moléculas antioxidantes son: carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico y glutatión. Sin embargo, los niveles de UV-B empleados en algunos estudios son superiores a los experimentados en la naturaleza, y por lo tanto algunas de las observaciones pueden tener una relevancia limitada. La medida del daño que se produce en plantas que crecen con altos niveles ambientales de UV-B no está clara. Si la planta se ha aclimatado a la luz en un ambiente particular, los mecanismos de fotoprotección y reparación son generalmente suficientes para evitar la aparición de daños. El daño es más probable que se haga evidente cuando las plantas son expuestas a altos niveles de UV-B sin aclimatación previa, ya que las plantas en la naturaleza rara vez presentan deterioros visibles.

UV-B también tiene efectos regulatorios y fotomorfogénicos en las plantas (Frohnmeier y Staiger, 2003; Jenkins, 2009). Niveles ambientales de UV-B promueven cambios variados en la morfología y desarrollo de las plantas, incluyendo: inhibición de la extensión de los tallos y reducción del alargamiento de los entrenudos, disminución en el área foliar, incrementos en el espesor de las hojas, número de capas de células epidérmicas, ceras epicuticulares y pubescencia. También se ha observado que produce promoción de las ramificaciones, alteraciones del momento de floración, reducción de la fertilidad y disminución de la biomasa (Tevini y Teramura, 1989; Ballaré *et al.*, 1996; Björn, 1996; Rozema *et al.*, 1997; Jansen *et al.*, 1998; Pinto *et al.*, 1999; Frohnmeier y Staiger, 2003; Semerdjieva *et al.*, 2003). Muchos de estos efectos pueden deberse a alteraciones en las cantidades, distribución o sensibilidad a fitohormonas que promueven la elongación celular y el crecimiento, tales como auxinas y brasinoesteroides. Se ha reportado que UV-B causa fotooxidación del ácido indolacético (Ros y Tevini, 1995; Jansen *et al.*, 2001) y también hay evidencia de que los brasinoesteroides señalizan las respuestas a UV-B (Savenstrand *et al.*, 2004).

Además de los efectos sobre la morfología y el desarrollo de las plantas, UV-B regula aspectos del metabolismo y por lo tanto modula la composición química de las células. UV-B estimula la biosíntesis de metabolitos secundarios, en particular de compuestos fenólicos que absorben UV (UVAC, ultraviolet absorbing compounds) que se acumulan en las vacuolas de las células epidérmicas (Hahlbrock y Scheel, 1989; Day *et al.*, 1992; Olsson *et al.*, 1998; Kakani *et al.*, 2003; Manetas, 2003). Algunos flavonoides, principalmente los flavonoles, actúan en conjunto con otros compuestos fenólicos como los ácidos

hidroxicinámicos para proveer protección a través de la absorción de UV, limitando su penetración en los tejidos de las hojas (Caldwell *et al.*, 1983; Bornman *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1997; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Nagata *et al.*, 2003). Se ha encontrado, en distintas especies, correlación entre el contenido de flavonoides y la sensibilidad a UV-B (Tevini y Teramura, 1989) y se ha demostrado que genotipos mutantes que no poseen flavonoides son mucho más susceptibles que las plantas silvestres al daño por UV-B (Li *et al.*, 1993; Lois y Buchanan, 1994; Stapleton y Walbot, 1994; Landry *et al.*, 1995).

Algunas de las respuestas a UV-B se basan en una regulación diferencial de la expresión génica en respuesta a diferentes niveles de UV-B (Brosché y Strid, 2003; Frohnmeyer y Staiger, 2003; Ulm y Nagy, 2005). La expresión de genes relacionados con estrés requieren la exposición a niveles relativamente altos de UV-B (Brosché y Strid, 2003), mientras que niveles relativamente bajos de UV-B son suficientes para inducir a una variedad de genes, muchos de los cuales están involucrados en respuestas de protección a esta radiación (Ulm *et al.*, 2004), incluso en plantas de vid cultivadas *in vitro* (Pontin *et al.*, 2010). Además, la expresión de estos últimos genes posiblemente requiera una breve exposición a UV-B, de tipo inductivo, como se demostró para los genes que codifican para fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), enzimas que regulan las rutas biosintéticas de los fenilpropanoides y flavonoides (Jansen *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 1998; Frohnmeyer *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2001; Casati y Walbot, 2003; Wolf *et al.*, 2010). La expresión de los genes que responden a exposiciones breves y/o a bajos niveles de UV-B posiblemente estén mediadas por fotosensores y las rutas sean diferentes a las de las respuestas generadas por el estrés de altos niveles de UV-B. Además, los experimentos con filtros de exclusión para producir diferentes espectros de UV proporcionaron evidencia de la existencia de distintas vías de respuesta dentro del rango UV-B; una vía para las mayores longitudes de onda de UV-B y una vía para las menores longitudes de onda de UV-B (Ulm *et al.*, 2004). Diferentes efectos de longitudes de onda de UV-B también se han reportado para las respuestas en crecimiento de diferentes especies (Shinkle *et al.*, 2004) y en este caso la respuesta a las menores longitudes de onda parecen implicar daños en el ADN (Shinkle *et al.*, 2005).

Los análisis transcripcionales de las respuestas a UV-B han brindado información de los genes inducidos por UV-B y de la naturaleza de las rutas biosintéticas de respuesta. Mediante análisis moleculares con microarreglos en maíz (Casati y Walbot, 2003 y 2004; Casati *et al.*, 2006), *Nicotiana longiflora* (Izaguirre *et al.*, 2003) y arábidopsis (Brosché *et al.*, 2002; Ulm *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2005), se ha demostrado que UV-B modifica la expresión de genes que codifican enzimas, proteínas de membrana, factores de transcripción, componentes de señalización y varias proteínas involucradas en distintos procesos celulares, incluyendo fotosíntesis, metabolismo primario y secundario, biosíntesis de pared celular, protección contra estrés, procesos de liberación de ADN, procesamiento de ácido ribonucleico (ARN), traducción y proteólisis. Casati y Walbot (2004) encontraron que

que posean plastídios y es transportado por xilema y floema en su forma conjugada y posteriormente liberado en los destinos. La biosíntesis de ABA y su concentración puede fluctuar en los diferentes tejidos durante su desarrollo o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales; por ejemplo, los niveles de ABA en las hojas sometidas a estrés hídrico pueden aumentar hasta 50 veces (Taiz y Zeiger, 2002). Las respuestas al ABA dependen de la concentración de la fitohormona y de la sensibilidad de los tejidos a la misma. El ABA puede ser desactivado por oxidación (catabolismo) o por conjugación covalente con otras moléculas como los monosacáridos (por ejemplo, esterificada con glucosa) y acumulado en las vacuolas (compartimentalizado), el cual puede actuar posiblemente como una forma de reserva de la hormona.

El ABA está asociado con las respuestas de las plantas a una amplia gama de estreses bióticos y abióticos como la sequía, altas temperaturas, heladas y salinidad, controlando numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas, donde los incrementos en los niveles de ABA regularían la aclimatación a estas condiciones ambientales adversas (Pastori y Foyer, 2002; Seki *et al.*, 2002; Zhu, 2002; Kollist *et al.*, 2007; Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008). Hay evidencias de que el ABA induce la acumulación de ROS en células vegetales y que estos actuarían como segundos mensajeros para la activación de las respuestas defensivas (Sakamoto *et al.*, 2008). Esta señal de ABA también pueden inducir la expresión de genes que codifican tanto para enzimas antioxidantes (Jiang y Zhang, 2001) como para los sistemas de defensa no enzimático (Jiang y Zhang, 2002).

En vid se ha observado que el ABA controla el cierre estomático (Stoll *et al.*, 2000) y que aplicaciones de ABA reducen el crecimiento vegetativo (Dry *et al.*, 2000) e inducen la síntesis de compuestos fenólicos en las bayas (Jeong *et al.*, 2004). Los niveles de ABA en los hollejos de las bayas se incrementan marcadamente durante el envero (el inicio de la maduración, cuando las bayas se ablandan, empiezan a acumular azúcar y las variedades tintas desarrollan color) y posteriormente declinan hasta ser bajos a cosecha (Coombe y Hale, 1973; Düring *et al.*, 1978; Baigorri *et al.*, 2001; Antolín *et al.*, 2003; Nambara y Marion-Poll, 2005; Gagné *et al.*, 2006; Deytieux-Belleau *et al.*, 2007; Wheeler *et al.*, 2009). Esto indica un posible papel del ABA en el control del desarrollo de las bayas, marcando el inicio de la maduración (Hale y Coombe, 1974; Düring *et al.*, 1978; Matsushima *et al.*, 1989; Antolín *et al.*, 2003; Wheeler *et al.*, 2009). La suposición de que el ABA controla la maduración de las bayas de vid, un fruto no climatérico, ha sido justificada por la demostración que aplicaciones de ABA incrementan varios de los procesos involucrados, como la biosíntesis de antocianos (Mori *et al.*, 2005; Gagné *et al.*, 2006; Peppi *et al.*, 2006; Peppi *et al.*, 2007) y la acumulación de azúcar (Pan *et al.*, 2005). También se han observado aumentos en la concentración de compuestos fenólicos en las bayas cuando se realizan restricciones hídricas desde envero (práctica habitual de manejo en los viñedos). Está

demostrado que la restricción hídrica aumenta los niveles de ABA en el flujo xilemático de las plantas (Stoll *et al.*, 2000).

1.3. Interacción entre UV-B y ABA

Son escasos los trabajos que abordan la interacción entre UV-B y ABA en la fisiología y bioquímica de las plantas (Duan *et al.*, 2008), y no se ha establecido si las aplicaciones de ABA pueden alterar la tolerancia de las plantas a UV-B. Hay estudios previos sobre el efecto de interacción entre la sequía y el UV-B con resultados contradictorios. Por ejemplo, se ha observado que tratamientos con restricción hídrica aumentan (Drilias *et al.*, 1997) o disminuyen (Alexieva *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2003) la sensibilidad a UV-B. Estas diferencias, al igual que las detalladas para las respuestas a UV-B, pueden deberse a las diferentes condiciones experimentales entre los estudios.

Se ha reportado que aplicaciones de ABA pueden incrementar la capacidad de resistencia de las plantas a la sequía (Cochard *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2004) y al frío (Bornman y Jansson, 1980; Li *et al.*, 2002; Mantyla *et al.*, 1995), y posiblemente también a UV-B debido a que muchos de los mecanismos de respuesta son comunes a los diferentes estreses.

1.4. Compuestos fenólicos

Las plantas producen una variedad de metabolitos secundarios que contienen un grupo fenol y son clasificados como compuestos fenólicos. Los fenoles de las plantas son un grupo heterogéneo con más de 10.000 compuestos reconocidos. De acuerdo con su diversidad química los compuestos fenólicos cumplen diversas funciones biológicas en la planta. Muchos sirven como compuestos atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, otros actúan como compuestos de defensa contra herbívoros y patógenos, y otros son compuestos protectores que absorben la radiación ultravioleta (Croteau *et al.*, 2000). Juegan un papel importante en la enología, ya que si bien representan menos del 5% de los constituyentes del vino, contribuyen significativamente a la apariencia (color), sabor (amargor), sensación en la boca (astringencia y cuerpo) y valor nutracéutico, por los potenciales beneficios a la salud humana (Cheynier, 2005). Las uvas difieren en la composición fenólica y en la concentración en base a las variedades, microclima de los viñedos y prácticas de manejo (Downey *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos derivan de las rutas biosintéticas de los fenilpropanoides y de los flavonoides, e incluyen a los ácidos fenólicos (hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos), a los estilbenos como el resveratrol y a los flavonoides como los antocianos, flavonoles, flavanoles y dihidroflavonoles (**Figura 1.4**, basado en Castellarin *et al.*, 2007).

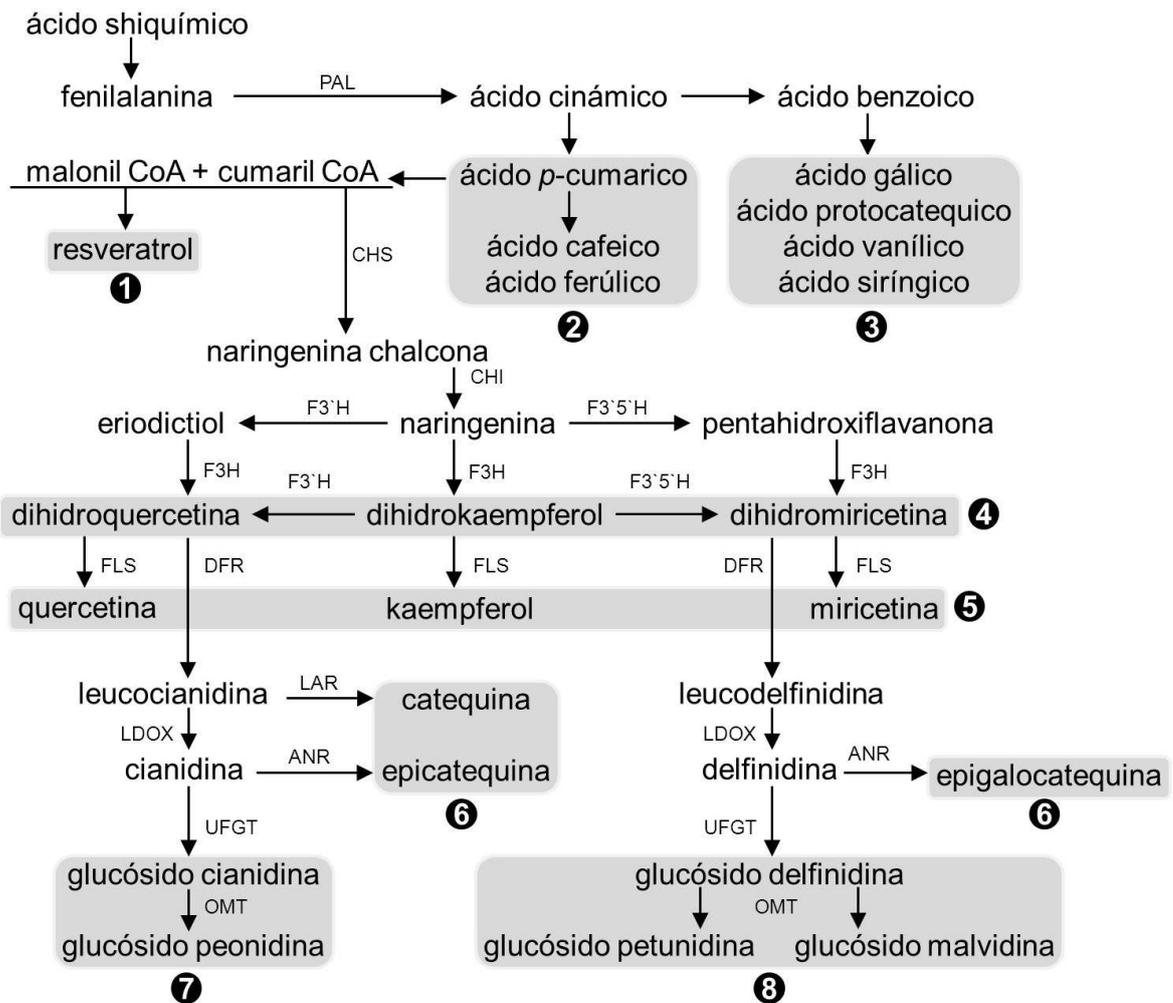


Figura 1.4 Rutas biosintéticas de los compuestos fenólicos principales en vid (basado en Castellarin *et al.*, 2007). Subgrupos: 1, estilbenos; 2, ácidos hidroxicinámicos; 3, ácidos hidroxibenzoicos; 4, dihidroflavonoles; 5, flavonoles; 6, flavanoles; 7, antocianinas dihidroxiladas; 8, antocianinas trihidroxiladas. Abreviaciones: ANR, antocianidina reductasa; CHI, chalcona isomerasa; CHS, chalcona sintasa; DFR, dihidroflavonol reductasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3'5'-hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; LDOX, leucoantocianidina dioxigenasa; OMT, O-metiltransferasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; UFGT, flavonoide 3-glucosiltransferasa.

Las uvas y los vinos contienen ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos; **Figura 1.5 A**) y en las uvas los primeros están mayormente presentes combinados con glicósidos. Los ácidos hidroxicinámicos se pueden presentar en forma libre, pero están mayoritariamente esterificados, en particular con ácido tartárico. También pueden estar glucosilados o combinados con antocianos para formar los antocianos acilados, a través de la esterificación con el ácido cafeico y el ácido *p*-cumárico. Los ácidos fenólicos son incoloros en soluciones alcohólicas diluidas, pero se tornan amarillos por oxidación. Desde un punto de vista organoléptico, estos compuestos no tienen un sabor u olor particular.

Los estilbenos poseen dos anillos bencénicos, generalmente unidos por una cadena de etano o etileno. Entre estos compuestos, el más conocido es el resveratrol (**Figura 1.5 B**),

producido por las plantas en respuesta a infecciones fúngicas y otros factores estresantes, tanto bióticos como abióticos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

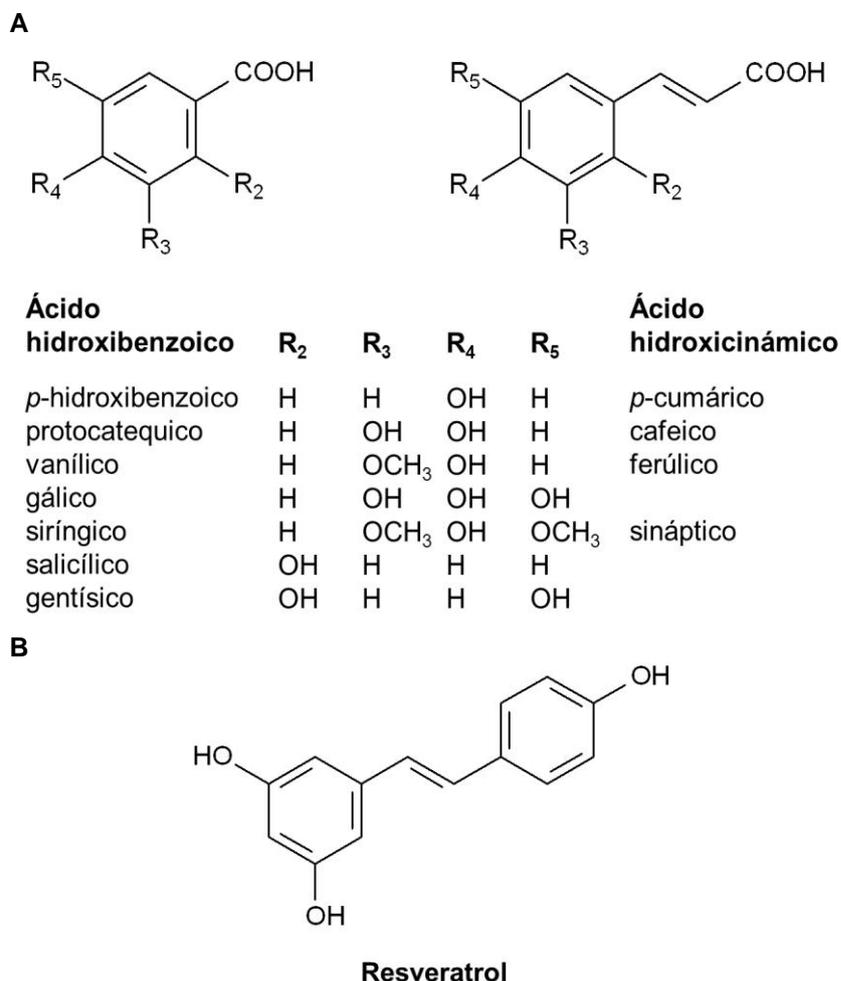


Figura 1.5 Estructuras químicas de los ácidos fenólicos: hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos (**A**) y del resveratrol (**B**).

El grupo más distribuido de pigmentos flavonoides son los antocianos, responsables de la mayoría de las coloraciones rojas, rosadas, púrpuras y azules observadas en las plantas. En la vid son los pigmentos responsables del color rojo en las bayas. Se localizan principalmente en vacuolas de las células de los hollejos a partir de enero (Somers, 1976; Boss *et al.*, 1996). También están presentes en las hojas, principalmente al final de la temporada de crecimiento, cuando cambian a coloraciones rojizas. Son clasificados de acuerdo con el número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo (OH y OCH₃) en el núcleo flavano, y en las uvas se han identificado cinco moléculas: cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina (**Figura 1.6 A**). Estas moléculas son mucho más estables en forma de glicósidos (antocianos) que como agliconas (antocianidinas). Solamente se han identificado antocianos monoglucósidos y monoglucósidos acilados en uvas de *Vitis vinifera* L.; y la acilación es llevada a cabo con los ácidos *p*-cumárico, cafeico y acético. El color de los antocianos es influenciado por muchos factores, incluyendo el número de grupos hidroxilo

y metoxilo, la presencia de ácidos aromáticos esterificados a la estructura principal, y el pH de la vacuola celular. Todas las variedades de vid tienen la misma estructura básica de antocianos, pero hay pequeñas variaciones en su composición. Además, entre las cinco antocianidinas, la malvidina es la molécula dominante, representando entre el 50 y el 90%, dependiendo de la variedad (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Los flavonoles son los pigmentos amarillos en hollejos de variedades blancas y tintas, mientras que los dihidroflavonoles, sus precursores, son compuestos de colores más pálidos. Los flavonoles influyen en ciertas características como el amargor y la estructura, aunque también estabilizan e incrementan el color de los vinos por participar en la copigmentación con antocianos (Asen *et al.*, 1972; Scheffeldt y Hrazdina, 1978; Boulton, 2001). Se diferencian por la sustitución en el núcleo lateral, produciendo quercetina, kaempferol y miricetina (**Figura 1.6 B**) y son mayoritariamente encontrados como glicósidos en los hollejos de las bayas de vid (Price *et al.*, 1995). En vid se han identificado algunos dihidroflavonoles (**Figura 1.6 B**) como la dihidroquercetina 3-rhamnosido (astilbina), y el dihidrokaempferol 3-rhamnoside (engeletina) (Trousdale y Singleton, 1983).

Los flavanoles son un subgrupo de compuestos que protegen al vino contra la oxidación, estabilizan el color e incrementan la complejidad del sabor. Los flavanoles son encontrados como monómeros y oligómeros, pero la mayor parte se encuentra como polímeros (proantoacianidinas o taninos). Se acumulan principalmente antes de envero y sus contenidos disminuyen con el avance de la maduración (Kennedy *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003; Bogs *et al.*, 2005). Las unidades estructurales básicas son (+)-catequina y (-)-epicatequina (**Figura 1.6 C**) y a diferencia de los antocianos y de los flavonoles no tienen formas glicosiladas.

principales regiones vitivinícolas del mundo, junto a Florencia, Bordeaux, Bilbao-Rioja, Porto, Melbourne y Ciudad del Cabo.

Los viñedos en Mendoza se ubican en un gradiente de altitud que va desde los 500 a los 1.500 m sobre el nivel del mar (snm), en cinco zonas bien diferenciadas que corresponden a los distintos oasis productivos (zonas bajo riego). El Valle de Uco está compuesto por los departamentos de Tupungato, Tunuyán y San Carlos, es la zona con viñedos a mayor altitud (900 a 1.500 m) y representa el 12% de la superficie total cultivada con vid en la provincia. La Zona Alta del Río Mendoza (Maipú, Luján de Cuyo, varios distritos de Guaymallén y Las Heras) tiene una altitud intermedia (700 a 1.000 m) y representa el 17% de la superficie total. La Zona Este (San Martín, Rivadavia, Junín, Santa Rosa y La Paz) es la zona con menor altitud (500 a 700 m), mayor superficie y producción, representando el 50% de la superficie total. Las otras zonas vitivinícolas son la Zona Norte (Lavalle y parte de Maipú, Guaymallén, Las Heras y San Martín) y la Zona Sur (General Alvear y San Rafael).

El Malbec es la variedad de uva tinta más representativa de la región y la más importante en la vitivinicultura argentina. Es originaria del sudoeste de Francia y fue introducida al país a mediados del siglo XIX. La superficie cultivada con esta variedad en Argentina es la más grande del mundo (28.532 ha) y se distribuye en todas las zonas vitivinícolas del país (Mendoza, San Juan, La Rioja, Río Negro, Catamarca, Salta, Neuquén y otras). En Mendoza la superficie es de 24.333 ha, lo que representa el 85,3% de la superficie nacional cultivada con Malbec, el 15,1% de la superficie total cultivada con vid (160.704 ha) y el 29,7% de la superficie con variedades tintas para vinificar en la provincia (82.012 ha) (INV, 2009). Se cultiva en los cinco oasis productivos de la provincia, y los viñedos con mayor reputación para vinos de alta calidad son los ubicados a mayor altitud, principalmente por un incremento en el contenido de compuestos fenólicos de los vinos obtenidos.

El concepto de calidad de la uva integra varios aspectos, pero para la elaboración de vinos tintos y con capacidad de ser envejecidos, tiene una alta correlación con altos contenidos de compuestos fenólicos. Por lo tanto, vinos con altos contenidos de compuestos fenólicos pueden ser considerados *a priori* de mayor calidad, pero también dependerá del tipo de compuestos fenólicos (perfil). Se realizan frecuentemente una serie de prácticas de manejo en los viñedos con el objetivo de aumentar la calidad de las bayas y los vinos, pero muchas veces los efectos obtenidos por estas prácticas son muy variables, no cumplen con los objetivos con los que se realizan, y muchas veces hacen que se obtengan rendimientos cuantitativos muy bajos. Por ejemplo, aparte de la elección del sitio de implantación, material vegetal, sistema de conducción y marco de plantación, se pueden realizar una serie de prácticas de manejo en los viñedos ya implantados. Con la poda invernal y los desbrotes se determina el número de brotes y de racimos por planta (densidad de las canopías, relación fuente/destinos de fotoasimilados y exposición de los tejidos a la radiación solar). Con el raleo de racimos se eliminan destinos de fotoasimilados, con los deshojes se aumenta la

exposición a la radiación solar de los racimos y con la restricción hídrica se reduce la disponibilidad de agua y el tamaño de las bayas (mayor relación hollejo/pulpa).

1.6. Hipótesis general

Los niveles de UV-B solar que perciben las plantas en los viñedos de altura de Mendoza en verano al mediodía son altos y producen daño oxidativo en las plantas de vid cv. Malbec. Las plantas, frente a este factor estresante, desencadenan respuestas fisiológicas y bioquímicas que afectan negativamente el crecimiento de las bayas (rendimiento cuantitativo), pero mejoran el cualitativo por un aumento en los niveles de compuestos fenólicos en las uvas. El ABA es la fitohormona que señala y media las respuestas de la planta al UV-B, tanto en hojas como en hollejos, mitigando sus efectos negativos. Con aplicaciones de ABA a las plantas se pueden obtener efectos similares a los que se obtienen al exponerlas a altos niveles de UV-B solar, actuando como señal para la acumulación de compuestos fenólicos.

1.7. Objetivo general

Caracterizar la radiación UV-B solar que reciben las plantas en los viñedos de altura de Mendoza en distintos meses y horas del día, estudiando los efectos de la radiación UV-B, del ABA y de su interacción, sobre aspectos fisiológicos y bioquímicos que afectan el crecimiento de las bayas (rendimiento cuantitativo) y la calidad enológica del cv. Malbec.

Se espera conocer los niveles de UV-B solar que perciben las plantas en los viñedos de altura en Mendoza y las características de las reacciones de la planta frente a cada uno de los factores y a la interacción de los mismos en diferentes temporadas de estudio. En base a esto, establecer bases técnicas que aporten al desarrollo de estrategias de manejo del cultivo para obtener uvas de alta calidad enológica.

2. **CAPÍTULO 2: Características de la radiación UV-B en uno de los viñedos ubicado a mayor altitud en Mendoza**

2.1. **Hipótesis**

Los niveles de UV-B solar, dados por la intensidad y dosis, en uno de los viñedos ubicados a mayor altitud en Mendoza son altos al mediodía y en los meses de verano.

2.2. **Objetivos específicos**

Caracterizar la radiación UV-B solar que reciben las plantas a 1.450 m de altitud en Mendoza, teniendo en cuenta la distribución diaria durante los distintos meses y temporadas de cultivo.

2.3. **Materiales y métodos**

Las mediciones se realizaron el día 5 (± 2 días porque se eligieron días sin nubosidad) de los meses de diciembre-abril en la temporada 2008-2009 (2009) y el día 5 (± 2 días) de los meses de octubre-mayo en la temporada 2009-2010 (2010), en un viñedo comercial ubicado a una altitud de 1.450 m snm. El viñedo es uno de los más altos en Mendoza y se encuentra en Gualtallary (33°24'S, 69°16'O), Tupungato. Para poder comparar ambas temporadas de cultivo se consideraron solamente los meses de diciembre-abril.

Se utilizó un radiómetro y un detector para UV-B (PMA2200 y PMA2102, Solar Light Company Inc., Glenside, PA, EE.UU.; **Figura 2.1**) y las mediciones de UV-B se hicieron en unidades de energía ($\mu\text{W cm}^{-2}$). Las mediciones se realizaron a lo largo del día, cada 15 min, desde las 9:45 hasta las 18:15 hs, con el sensor ubicado perpendicularmente al sol, guiándose por la proyección de la sombra. Con el valor promedio de las intensidades de UV-B ($\mu\text{W cm}^{-2}$) registradas entre las 9:45 y las 18:15 hs se calculó la dosis de UV-B recibida durante las 8,5 h diarias (KJ m^{-2}) en base a la **Ecuación A.1** (Ver anexo).



Figura 2.1 Radiómetro y detector para UV-B (PMA2200 y PMA2102, Solar Light Company Inc., Glenside, PA, EE.UU.).

2.4. Análisis estadístico

Los efectos del factor temporada ($P_{TEMPORADA}$) y del factor mes (P_{MES}) sobre las intensidades de UV-B se determinaron a través de ANOVA multifactorial y la diferencia entre las medias se analizó con la prueba múltiple de Fisher con un nivel de significancia de $P \leq 0,10$; utilizando el software Statgraphics Centurion XV versión 15.0.10 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, EE.UU.).

2.5. Resultados y discusión

En la **Figura 2.2** y en la **Tabla 2.1** se muestran los resultados obtenidos durante las dos temporadas. Las mayores intensidades de UV-B se registraron desde las 12:30 hasta las 15:00 hs, siendo los máximos entre las 13:00 y 13:45 hs, en todos los meses de cultivo. Los niveles de UV-B van aumentando desde valores relativamente bajos en octubre hasta diciembre-febrero, y posteriormente disminuyen hasta valores muy bajos en mayo. Los meses con mayor UV-B fueron diciembre, enero y febrero, y en 2009 los valores máximos de intensidad de UV-B para esos meses fueron de 36,2, 34,8 y 35,1 $\mu\text{W cm}^{-2}$, y las dosis de 7,7, 7,6 y 7,5 KJ m^{-2} ; mientras que en 2010 fueron de 37,4, 39,8 y 34,7 $\mu\text{W cm}^{-2}$, y de 8,4, 8,6 y 7,4 KJ m^{-2} , respectivamente. Las intensidades diarias promedio y las dosis de UV-B disminuyeron desde diciembre-enero a febrero un 8%, hasta marzo un 21% y hasta abril un 49%, considerando ambas temporadas.

Los efectos del factor temporada (2009 y 2010) y del factor mes (diciembre-abril) sobre las intensidades de UV-B se muestran en la **Tabla 2.2**. Las intensidades de UV-B fueron 5% mayores en 2010, y entre los meses de diciembre-enero se produjeron los máximos, sin diferencias significativas entre estos meses. Después de enero las intensidades de UV-B disminuyeron con diferencias significativas cada mes.

Mendoza está ubicada en latitudes medias (33°S), por lo que las distintas radiaciones solares aumentan en los meses de verano, cuando el eje de la Tierra está inclinado con un ángulo máximo hacia el sol (la distancia entre el sol y la Tierra es menor y los rayos solares son más perpendiculares a la superficie terrestre). Como parte de la tesis de maestría, en enero de 2007, se realizaron mediciones de las intensidades de UV-B en distintos viñedos de Mendoza ubicados a 500, 940 y 1.450 m snm para estudiar los efectos del gradiente altitudinal sobre la UV-B en enero (Berli, 2007; Figura 1.2). El viñedo ubicado a 1.450 m de altitud era el mismo que se estudió en las temporadas 2009 y 2010, y para poder comparar y analizar los resultados entre las distintas temporadas se recalcularon las dosis utilizando la misma metodología. Las dosis en los viñedos a 500, 940 y 1.450 m snm de altitud en enero de 2007 fueron de 5,3, 6,1 y 7,6 KJ m⁻², respectivamente. Las dosis calculadas en el viñedo a 1.450 m snm de altitud para el mes de enero fueron similares en 2007 y 2009, e inferiores a las de 2010.

En una revisión bibliográfica Kakani *et al.* (2003) muestran que las dosis de UV-B reportadas en distintos lugares del mundo durante las temporadas de cultivo varían desde 2 a 12 KJ m⁻² por día, y que los mayores valores se obtienen en zonas cercanas al Ecuador y en latitudes medias. Al calcular las dosis en el experimento se consideraron solamente 8,5 h diarias por lo que los valores en los meses de verano podrían ser mayores que los presentados. La adopción de esta metodología para calcular la dosis de UV-B tuvo como objetivo poder comparar todos los meses entre las 9:45 y las 18:15 hs, aunque también cambien las cantidades de horas de luz (largo del día) entre los meses.

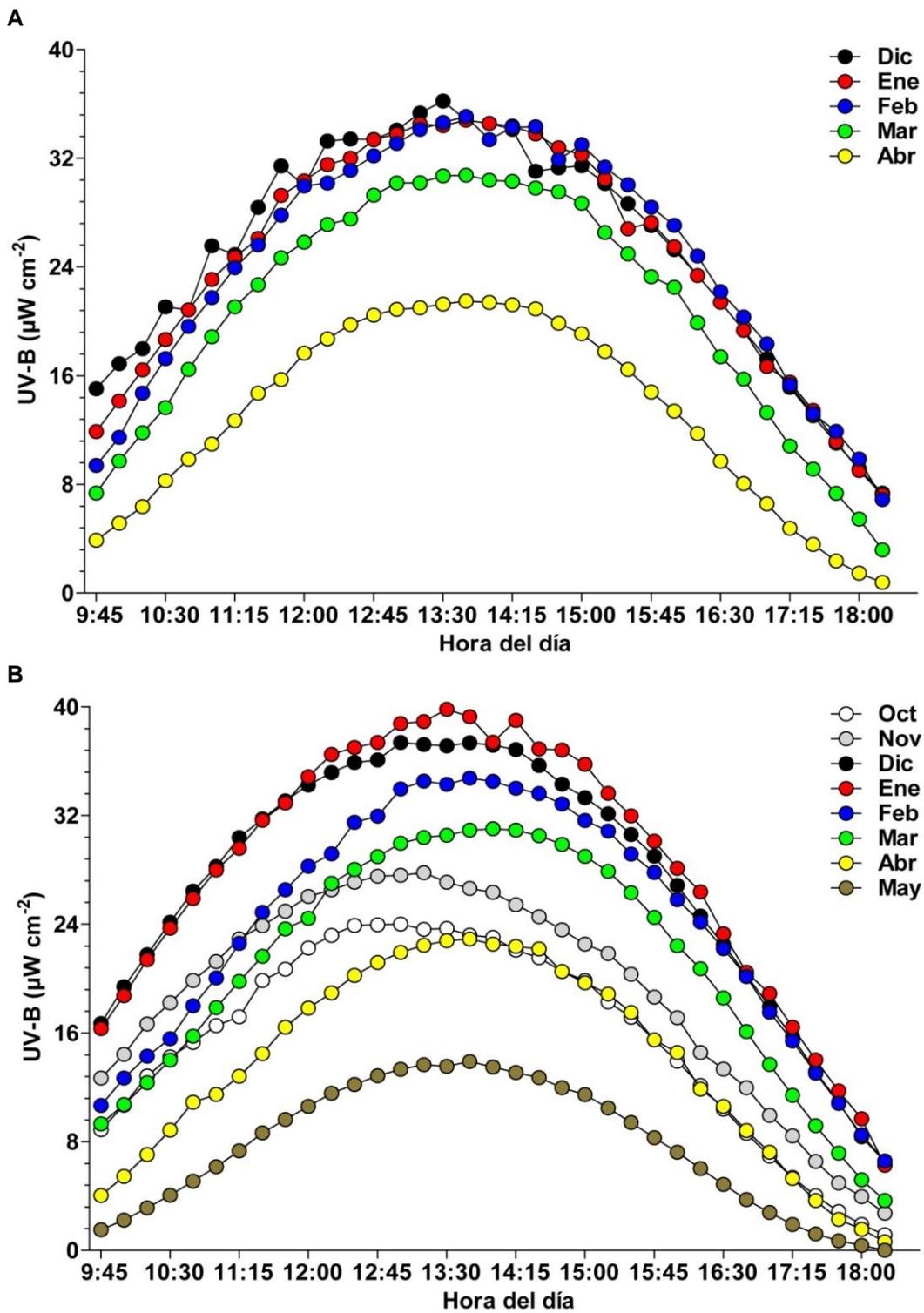


Figura 2.2 Intensidades de UV-B ($\mu\text{W cm}^{-2}$) registradas en Gualtallary ($33^{\circ}24'S$, $69^{\circ}16'O$), el día 5 de los meses de diciembre-abril en la temporada 2009 (A), y el día 5 de los meses de octubre-mayo en la temporada 2010 (B).

Tabla 2.1 Intensidades y dosis de UV-B ($\mu\text{W cm}^{-2}$ y KJ m^{-2}) registradas en Gualtallary ($33^{\circ}24'S$, $69^{\circ}16'O$) el día 5 de los meses de diciembre-abril en la temporada 2009 y el día 5 de los meses de octubre-mayo en la temporada 2010. Con colores se indica el gradiente de intensidades (rojo indica los valores más altos y verde los valores más bajos).

Hora	2009					2010							
	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May
9:45	15,03	11,88	9,39	7,36	3,88	8,88	12,67	16,69	16,31	10,66	9,30	4,04	1,51
10:00	16,88	14,14	11,46	9,72	5,14	10,68	14,42	19,40	18,74	12,68	10,72	5,45	2,22
10:15	17,97	16,41	14,70	11,80	6,36	12,82	16,65	21,75	21,38	14,28	12,33	7,06	3,12
10:30	21,05	18,65	17,24	13,64	8,27	14,24	18,22	24,14	23,70	15,57	14,00	8,85	4,05
10:45	20,83	20,83	19,62	16,46	9,84	15,30	19,86	26,42	25,88	17,99	15,75	10,90	5,09
11:00	25,54	23,08	21,73	18,85	10,97	16,54	21,25	28,24	27,98	20,04	17,85	11,48	6,16
11:15	24,91	24,70	23,94	21,06	12,70	17,18	22,92	30,37	29,57	22,58	19,78	12,81	7,32
11:30	28,37	26,08	25,61	22,69	14,71	19,85	23,89	31,75	31,64	24,87	21,64	14,47	8,64
11:45	31,42	29,25	27,80	24,66	15,71	20,68	24,96	33,07	32,92	26,52	23,65	16,41	9,62
12:00	29,98	30,32	29,95	25,81	17,65	22,25	26,03	34,24	34,84	28,26	24,42	17,83	10,59
12:15	33,25	31,52	30,17	27,12	18,70	23,18	26,53	35,15	36,49	29,17	27,00	18,94	11,56
12:30	33,40	31,99	31,10	27,52	19,75	23,91	27,08	35,90	37,00	31,49	28,02	20,23	12,20
12:45	33,37	33,36	32,17	29,28	20,45	23,95	27,53	36,08	37,36	31,94	28,97	21,18	12,85
13:00	34,07	33,78	33,09	30,17	20,87	24,00	27,60	37,37	38,76	33,95	29,95	21,92	13,32
13:15	35,31	34,50	34,11	30,19	20,99	23,61	27,78	37,22	38,90	34,52	30,37	22,45	13,66
13:30	36,20	34,38	34,63	30,70	21,27	23,69	27,08	37,12	39,81	34,29	30,54	22,78	13,54
13:45	34,79	34,79	35,06	30,74	21,48	23,20	26,63	37,35	39,26	34,74	30,92	22,90	13,90
14:00	34,56	34,56	33,35	30,38	21,38	23,03	26,34	37,17	37,39	34,50	31,02	22,54	13,49
14:15	34,11	34,36	34,27	30,28	21,21	22,09	25,43	36,85	39,00	34,00	30,92	22,36	13,09
14:30	31,03	33,78	34,30	29,80	20,91	21,53	24,54	35,67	36,90	33,61	30,50	22,18	12,71
14:45	31,28	32,76	31,90	29,53	19,85	20,51	23,58	34,30	36,80	32,85	29,86	20,52	11,97
15:00	31,44	32,24	32,99	28,68	19,07	19,85	22,54	33,30	35,75	31,62	28,98	19,69	11,45
15:15	30,14	30,45	31,33	26,53	17,77	18,28	21,83	32,12	33,62	30,85	27,88	18,86	10,47
15:30	28,67	26,80	30,04	24,96	16,46	17,15	20,31	30,59	31,96	29,15	26,30	17,50	9,41
15:45	27,04	27,26	28,39	23,27	14,79	15,48	18,63	29,00	30,11	27,80	24,49	15,49	8,29
16:00	25,27	25,47	27,05	22,50	13,39	13,91	17,11	26,85	28,11	25,80	22,42	14,55	7,22
16:15	23,37	23,37	24,80	19,89	11,74	12,13	14,56	24,60	26,37	24,15	20,72	11,86	6,02
16:30	21,39	21,39	22,18	17,38	9,70	10,39	13,34	22,50	23,29	22,20	18,57	10,59	4,85
16:45	19,33	19,33	20,31	15,74	8,06	8,61	11,97	20,25	20,46	20,15	16,10	8,81	3,74
17:00	17,23	16,68	18,33	13,28	6,56	6,93	9,93	17,92	18,89	17,52	13,67	7,22	2,79
17:15	15,13	15,52	15,31	10,82	4,77	5,36	8,43	15,70	16,41	15,40	11,40	5,30	1,90
17:30	13,05	13,44	13,20	9,12	3,58	4,03	6,55	13,15	14,01	13,03	9,17	3,66	1,21
17:45	11,04	11,15	11,90	7,34	2,37	2,86	4,96	10,90	11,72	10,82	7,15	2,27	0,71
18:00	9,13	9,01	9,86	5,45	1,46	1,91	3,96	8,35	9,68	8,50	5,19	1,55	0,37
18:15	7,35	7,22	6,89	3,17	0,79	1,15	2,73	6,52	6,25	6,58	3,66	0,64	0,00
Máximo	36,20	34,79	35,06	30,74	21,48	24,00	27,78	37,37	39,81	34,74	31,02	22,90	13,90
Media	25,23	24,70	24,52	20,74	13,22	15,69	19,08	27,37	28,21	24,06	20,95	13,87	7,69
KJ m⁻²	7,72	7,56	7,50	6,35	4,05	4,80	5,84	8,38	8,63	7,36	6,41	4,24	2,35

Tabla 2.2 Intensidades de UV-B ($\mu\text{W cm}^{-2}$) registradas en Gualtallary (33°24'S, 69°16'O), el día 5 de los meses de diciembre-abril en las temporadas 2009 y 2010. $P_{(\text{TEMPORADA})}$: efecto de la temporada; $P_{(\text{MES})}$: efecto del mes. Los valores representan la media y letras distintas indican diferencias significativas con un $P \leq 0,10$.

UV-B		
Temporada		
2009	21,68	B
2010	22,89	A
Mes		
Dic	26,30	A
Ene	26,45	A
Feb	24,29	B
Mar	20,84	C
Abr	13,54	D
ANOVA		
$P_{(\text{TEMPORADA})}$	0,00001	
$P_{(\text{MES})}$	0,00001	

2.6. Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten cumplir con el objetivo de caracterizar la UV-B solar que reciben las plantas a 1.450 m de altitud en Mendoza, a lo largo del día, durante los distintos meses y temporadas de cultivo. También confirman las hipótesis planteadas de que los niveles de UV-B solar en uno de los viñedos ubicados a mayor altitud en Mendoza son altos al mediodía (las intensidades son máximas entre las 13:00 y 13:45 hs) y en los meses de verano (diciembre-febrero). Al comparar estos valores con los reportados en la bibliografía para distintos lugares del mundo, observamos que a pesar de la diferencia en la metodología de cálculo de las dosis con respecto a otros autores, valores de dosis de $8,6 \text{ KJ m}^{-2}$, como los obtenidos en enero de 2010, son valores relativamente altos de UV-B.

3. CAPÍTULO 3: Respuesta del tejido foliar de plantas de vid cv. Malbec a UV-B y ABA

3.1. Hipótesis

Los niveles de UV-B solar en los viñedos de altura de Mendoza producen daño oxidativo en las plantas de vid cv. Malbec. El ABA está involucrado en las respuestas de protección de las hojas de vid a la radiación UV-B, incrementando los sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos, disminuyendo los daños oxidativos potenciales de este tipo de radiación.

3.2. Objetivos específicos

Estudiar los efectos de la radiación UV-B que reciben las plantas de vid cv. Malbec en los viñedos de altura en Mendoza, del ABA y de su interacción, sobre:

- el contenido de ABA en las hojas.
- el contenido de pigmentos fotoprotectores (compuestos fenólicos) y esteroides de membrana en las hojas.
- el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides) en las hojas.
- la actividad de enzimas antioxidantes en las hojas
- el daño oxidativo por peroxidación de lípidos de membrana e integridad de la membrana celular en las hojas.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Material vegetal y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo durante la temporada 2006-2007 (2007) en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina (33°0'S, 68°52'O) a una altitud de 940 m snm. Plantas de un año de un clon seleccionado de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec fueron plantadas en macetas plásticas de 2,5 L rellenas con compost de vid (orujos agotados) y cultivadas bajo una cobertura de polietileno (100 µm de espesor; **Figura 3.1**). Después de 3 meses en las condiciones mencionadas, las hojas se removieron y las plantas se podaron dejando 5 yemas desde la base del brote. Las plantas se ubicaron a campo, brotaron y crecieron durante un mes sin restricción hídrica en un diseño de bloques completos al azar, con un arreglo factorial de tratamientos 2 x 2 (dos factores con dos niveles cada uno) y 5 bloques (n=5). La unidad experimental estuvo constituida por dos plantas.



Figura 3.1 Plantas de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec en macetas plásticas de 2,5 L rellenas con compost de vid y cultivadas bajo una cobertura de polietileno, previo al inicio de los tratamientos.

3.3.2. Tratamientos

Tratamientos con exclusión de UV-B (-UV-B): la radiación UV-B solar se filtró usando coberturas plásticas de poliéster cristal (PE) de 100 μm de espesor (Oeste Aislante, Buenos Aires, Argentina). Este PE absorbe más del 95% de UV-B, afectando aproximadamente el 30% de UV-A y el 15% de PAR, tal lo observado mediante mediciones espectrofotométricas UV-Visible (Cary-50, Varian Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.; **Figura 3.2 A**).

Tratamientos con UV-B (+UV-B): la radiación UV-B solar fue suplementada con una dosis diaria extra de 2,7 KJ m^{-2} , utilizando dos lámparas fluorescentes que emiten en UV-B (TL 100 W/01; Philips, Nieuwegein, Holanda), suspendidas sobre las plantas. Las lámparas se encendían durante períodos de 5 h, desde las 11:00 hasta las 16:00 hs y producían, a la altura de las plantas, una intensidad adicional de 15 $\mu\text{W cm}^{-2}$. Estas lámparas emiten UV-B en un espectro estrecho de 310-315 nm con un máximo a 311 nm (**Figura 3.2 B**). Este tratamiento con suplementación de UV-B se realizó para imitar las radiaciones UV-B recibidas por los viñedos a 1.450 m snm, altitud en la que se ubican los viñedos más altos en Mendoza. Para minimizar las diferencias ambientales entre los tratamientos -UV-B y +UV-B respecto de viento, temperatura y humedad, se colocó un polietileno de baja densidad (PET) de 40 μm de espesor sobre las plantas con tratamiento +UV-B. Este PET transmite la mayoría de la radiación solar, aproximadamente el 75% de UV-B, 80% de UV-A y el 85% de PAR (**Figura 3.2 A**).

Para cada uno de los tratamientos de UV-B, se tuvieron dos tratamientos con ABA (dos factores con dos niveles cada uno):

1) +ABA: desde la brotación se asperjó una solución con una concentración 1 mM de \pm -S-cis, trans ácido abscísico (90%, Kelinon Agrochemical Co., Beijing, China) conteniendo 0,1% Triton X-100 como surfactante y una cantidad mínima de etanol 96% para disolver

inicialmente el ABA ($10 \mu\text{L mg}^{-1}$ de ABA). Las aspersiones se hicieron semanalmente en las hojas hasta que gotearan, con aproximadamente $25 \text{ mL planta}^{-1}$, y en horas del atardecer para minimizar la fotodegradación de la fitohormona. En total se realizaron 5 aplicaciones y la dosis de ABA fue elegida en base a trabajos previos con diferentes especies (Sansberro *et al.*, 2004; Travaglia *et al.*, 2007) incluyendo vid (Quiroga *et al.*, 2009).

2) -ABA: una solución conteniendo H_2O más 0,1% Triton X-100 y una cantidad mínima de etanol se asperjó semanalmente en las mismas condiciones descriptas anteriormente.

La **Figura 3.2 C** muestra una representación esquemática del ensayo con los distintos tratamientos de UV-B y ABA.

Las dos hojas más viejas, con un mes de edad y totalmente expandidas, ubicadas en la base del brote de cada planta, se colectaron al mediodía del día posterior a la última aplicación. Una de las hojas se refrigeró con hielo seco y se procesó inmediatamente para determinar el contenido de proteínas, actividad de enzimas antioxidantes e integridad de membrana. La otra hoja fue rápidamente congelada con N_2 líquido y almacenada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, para posteriormente evaluar el contenido de ABA, pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores, compuestos fenólicos, esteroides y peroxidación de lípidos de membrana.

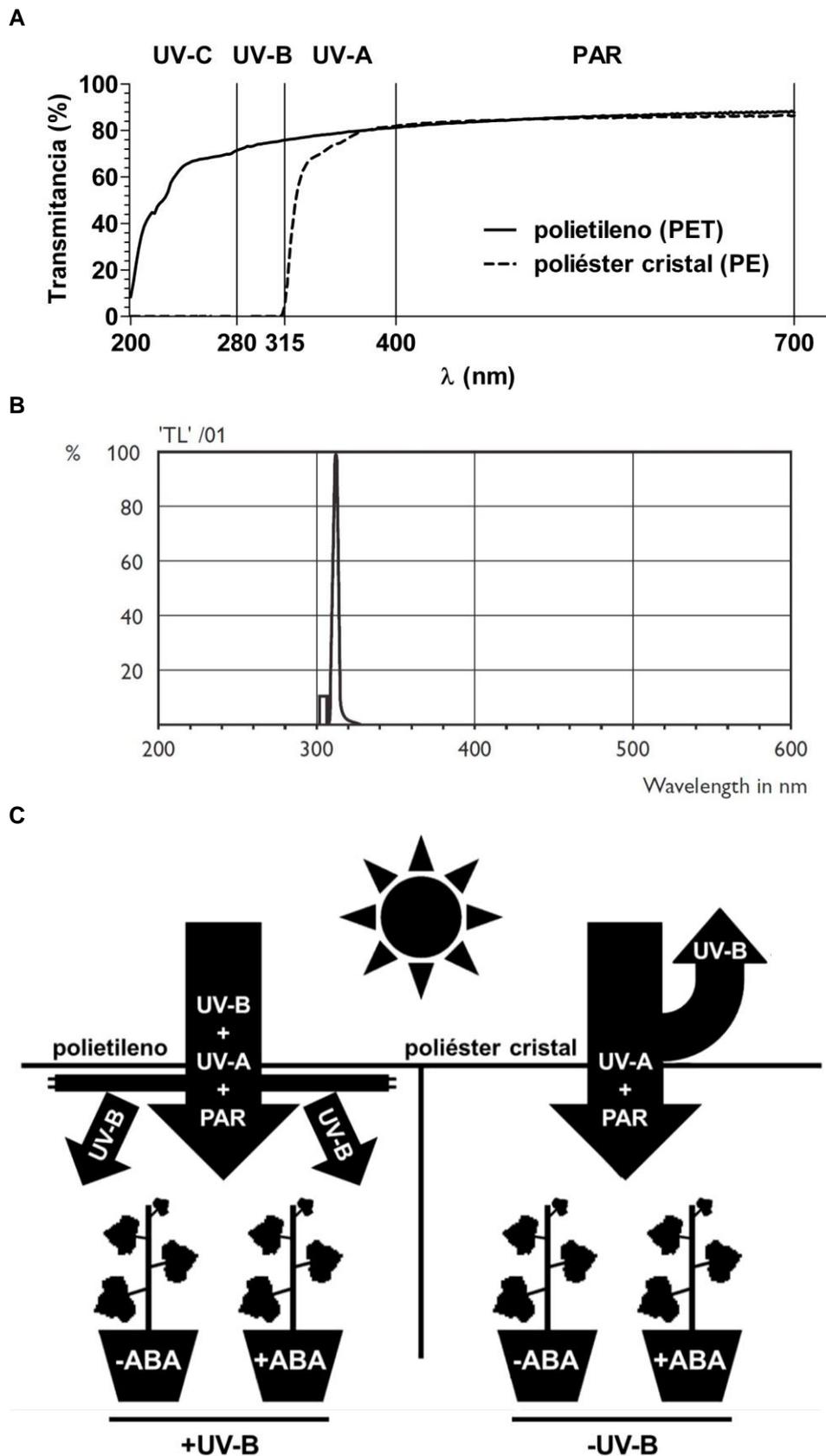


Figura 3.2 Transmitancia de los plásticos: polietileno de baja densidad (PET) y poliéster cristal (PE) a distintas longitudes de onda, determinada en el laboratorio con un espectrofotómetro UV-Visible (A), distribución espectral de las lámparas fluorescentes de UV-B (TL 100 W/01; Philips) en base al catálogo de las mismas (B) y representación esquemática del ensayo en macetas (C).

3.3.3. Mediciones

3.3.3.1. Radiaciones UV-B y PAR

Se utilizó un medidor de radiación LI-250 con un sensor de PAR LI-190SA (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, EE.UU.) y un radiómetro PMA2200 con un sensor de UV-B PMA2102 (Solar Light Company Inc., Glenside, PA, EE.UU.). La **Figura 3.3** muestra la radiación solar (PAR y UV-B) recibida en un día despejado de enero a altitudes de 1.450 y 940 m snm, y la radiación UV-B suplementada a la que las plantas de los tratamientos +UV-B fueron sometidas. Las intensidades y las dosis de UV-B variaron durante el experimento, dependiendo de las condiciones meteorológicas (datos no presentados).

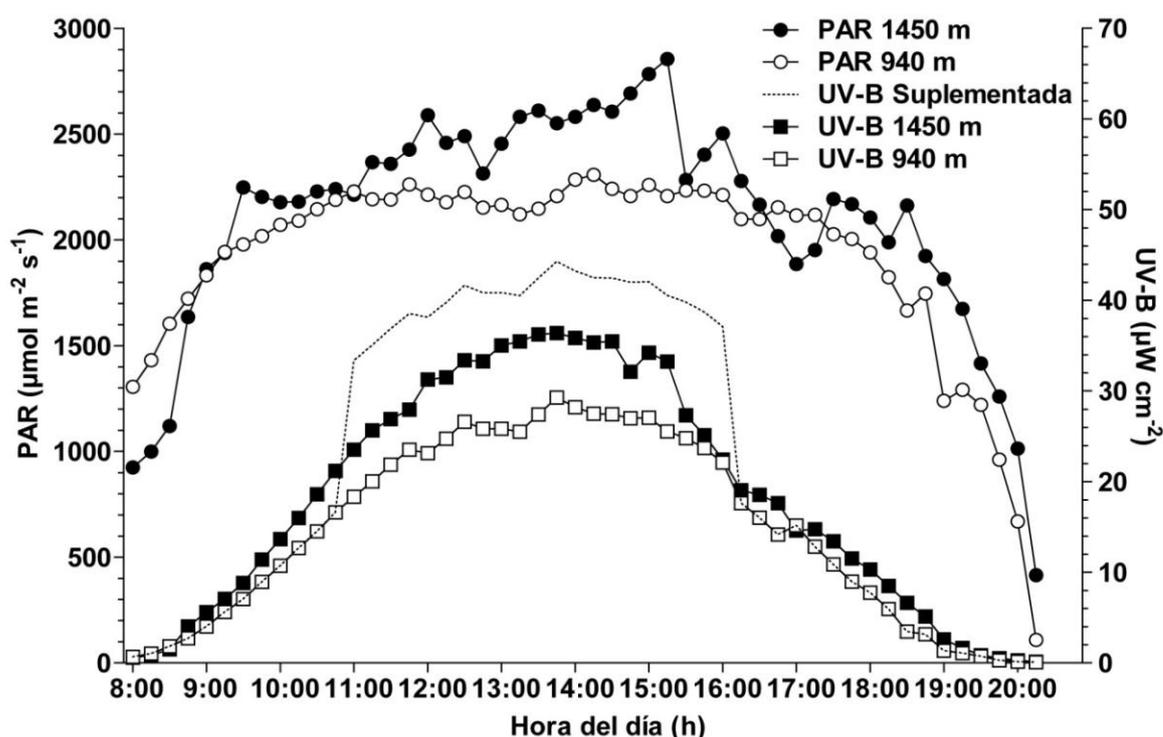


Figura 3.3 Radiaciones PAR y UV-B registradas el día 22 de enero de 2007 en Gualtallary (33°24'S, 69°16'O y 1.450 m snm), el día 26 de enero de 2007 en la Facultad de Ciencias Agrarias (33°0'S, 68°52'O y 940 m snm), y la intensidad de UV-B con la que se suplementó a las plantas en los ensayos.

3.3.3.2. Ácido abscísico

Cada muestra de 200 mg de peso fresco (PF) de hoja de vid se homogeneizó en un mortero de porcelana con N_2 líquido, y se le adicionaron 2 mL de una solución 80:19:1 metanol: H_2O bidestilada: ácido acético. Después de 12 h a 4 °C se agregaron 40 ng de ABA hexa-deuterado ($[\text{H}_6]$ -ABA; regalo del Profesor Richard P. Pharis, University of Calgary, Canadá) como estándar interno, disuelto en 2 mL de 100% metanol, y se dejó 1 h a 4 °C para que se equilibren los isótopos de ABA. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 9.300 g y el sobrenadante se recolectó y evaporó en un rotavapor con vacío a 35 °C. El residuo acuoso fue ajustado a pH 3,0 con ácido acético y particionado cuatro veces con

volúmenes iguales de acetato de etilo saturado con 1% ácido acético. Después, se evaporaron los solventes con vacío a 35 °C, se disolvió el residuo en 1 mL de H₂O pH 3,0 (1% ácido acético) y se los hizo pasar a través de columnas Sep-Pak C18 (500 mg de material) de fase reversa (Waters Associates, Milford, MA, EE.UU.). Esta elución se realizó con un flujo de 0,2 mL min⁻¹ usando el siguiente gradiente: 1 mL de H₂O bidestilada pH 3,0, 1 mL de hexano, y 1 mL de 80% metanol en H₂O con 1% ácido acético (pH 3,0).

Se colectó todo el eluido y luego de evaporar el solvente con vacío a 35 °C, el residuo se disolvió en 1 mL de H₂O bidestilada pH 7,0. Esta solución se transfirió a columnas intercambiadoras aniónicas débiles con 60 mg de material (Oasis WAX, Waters Associates, Milford, MA, EE.UU.) con un gradiente de 1 mL de 5% hidróxido de amonio en H₂O, 1 mL de 100% metanol, 1 mL de 2% ácido formico en metanol, y 1 mL de 5% ácido formico en metanol. El eluido ácido se evaporó a 35 °C con vacío y posteriormente se adicionaron 10-20 µL de 100% metanol y 50-100 µL de diazometano, dejándolos reaccionar durante 30 min a temperatura ambiente para derivatizar el ABA esterificando el grupo carboxilo con un metilo. Después de eliminar los solventes con un flujo suave de N₂ gaseoso a temperatura ambiente, las muestras derivatizadas se disolvieron con acetato de etilo y se inyectó 1 µL en un equipo de cromatografía gaseosa capilar acoplada a espectrometría de masa por impacto de electrones (GC-EIMS, gas chromatography with electron impact mass spectrometry; Clarus 500, PerkinElmer, Shelton, CT, EE.UU.) con una columna capilar de baja polaridad de metil silicona (HP-5, 30 m largo, 0,25 mm diámetro interno y 0,25 µm de espesor de capa). Se utilizó como fase móvil helio (1 mL min⁻¹) y el programa de temperaturas del horno del GC-EIMS se describe en la **Figura A.1** (Ver anexo).

El espectrómetro de masa fue operado con una energía de ionización por impacto de electrones de 70 eV. La temperatura del inyector fue de 230 °C, la temperatura de la fuente de iones de 260 °C y la temperatura de la interfase de 280 °C. Una vez realizado el monitoreo de iones seleccionados (SIM, selective ion monitoring), se calculó la cantidad de ABA comparando el área de los picos de los iones más abundantes del estándar interno deuterado (194/166) con los de su contraparte no marcado (190/162). En la **Figura 3.4** se muestra el espectro de masas del ABA derivatizado (metilado) con diazometano. Las mediciones de las muestras de cada tratamiento se realizaron utilizando solamente tres réplicas (n=3), seleccionadas al azar.

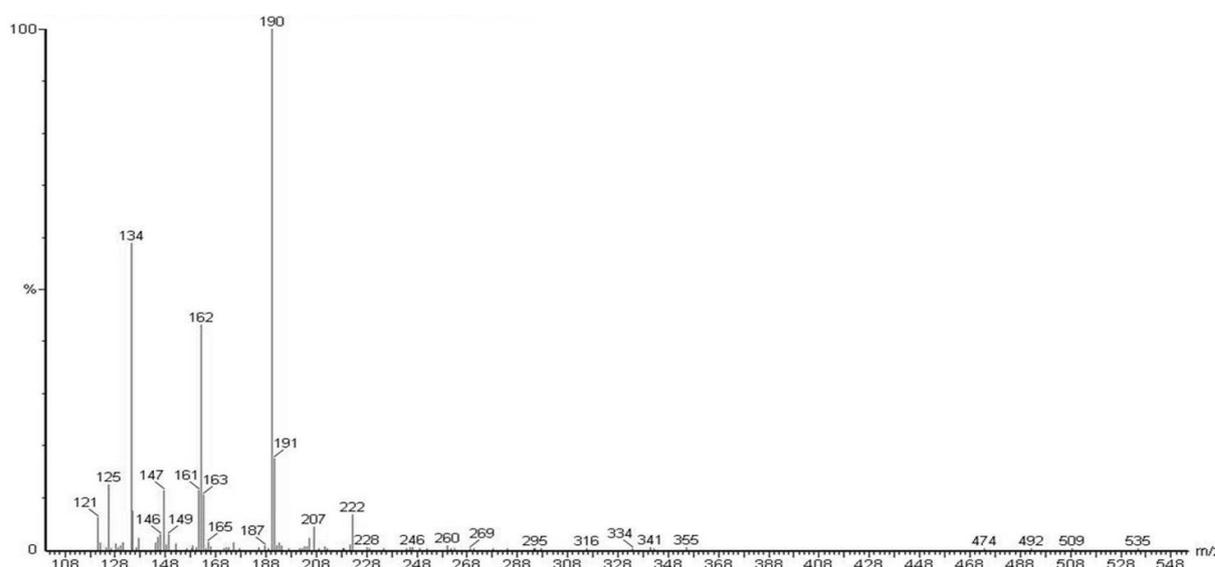


Figura 3.4 Espectro de masa del ABA metilado con diazometano, presente en los extractos de las hojas de Malbec y determinado por GC-EIMS.

3.3.3.3. Pigmentos fotoprotectores

Dos discos de hojas (1 cm² cada uno) fueron sumergidos en 2 mL de 99: 1 metanol: ácido clorhídrico y se los dejó 72 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia (OD, optical density) de los extractos a 305 y 546 nm de longitud de onda contra un blanco de reactivo, para determinaciones de compuestos fenólicos que absorben UV (UVAC) y antocianos, con cubetas de cuarzo de 1 y 10 mm de paso óptico, respectivamente. Se siguió la técnica descrita por Mazza *et al.* (1999), y se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible (Cary-50, Varian Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.). Las mediciones de las muestras de cada tratamiento se realizaron utilizando cinco réplicas (n=5).

3.3.3.4. Compuestos fenólicos y esteroides de membrana

La extracción y la derivatización de los compuestos se realizó de acuerdo con Minuti *et al.* (2006), con las siguientes modificaciones. Cada muestra de 20 mg de PF de hojas se molió y homogeneizó en un mortero de porcelana con N₂ líquido y se colocó en un tubo de centrifuga. Se agregaron 0,6 mL de acetato de etilo acidificado (0,2% de ácido clorhídrico), se sonicaron (200 W, Cleanson CS-1106, Buenos Aires, Argentina) y centrifugaron durante 5 min a 9.300 g. Se colectó el sobrenadante y se repitió la extracción dos veces más utilizando 0,6 mL de acetato de etilo acidificado. Posteriormente, los tres extractos se juntaron, se filtraron y deshidrataron haciéndolas pasar por minicolumnas cónicas rellenas con fibra de vidrio y Na₂SO₄, y se evaporaron con un flujo suave de N₂ gaseoso hasta sequedad. El residuo sólido se adicionó con 30 µL de piridina (Flucka, Steinheim, Alemania) y 70 µL de N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) 1% TCMSi (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Se los dejó reaccionar 75 min a 70 °C y se tomó una alícuota de 1 µL del extracto derivatizado (trimetilsililado) y se inyectó al equipo de GC-EIMS. El análisis se realizó con el

mismo equipo y las condiciones detalladas para las determinaciones de ABA, excepto que la temperatura del inyector fue de 300 °C y el programa de temperaturas del horno del GC-EIMS fue el indicado en la **Figura A.2** (Ver anexo).

La identidad de cada compuesto fenólico y esterol de membrana se estableció por el tiempo de retención en la columna capilar y el espectro completo de masas de los estándares trimetilsililados, en base a la relación masa-carga (m/z , mass-to-charge ratio) realizado en un rango desde 120 a 700 m/z (quercetina, kaempferol, ácidos cafeico, ferúlico y *p*-cumárico; Sigma Chem. Co.) y de la librería del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, National Institute of Standards and Technology) los esteroides. Los espectros de masa de los compuestos trimetilsililados con BSTFA se muestran en el anexo: **Figura A.3 A y B** (flavonoles: quercetina y kaempferol), **Figura A.4 A, B y C** (ácidos hidroxicinámicos: cafeico, ferúlico y *p*-cumárico) y **Figura A.5 A y B** (esteroides: estigmasterol y β -sitoesterol). El cromatograma total de iones de quercetina (el metabolito más abundante de los estudiados) se utilizó como valor de referencia para cuantificar al resto de los compuestos. Una curva de calibración de seis puntos fue obtenida para quercetina con una solución estándar que contenía 15% metanol en H₂O y se la sometió al mismo procedimiento de extracción y derivatización descrito para las muestras. La cuantificación fue realizada relacionando el área de los picos de los compuestos identificados en cada muestra con el de calibración. Las mediciones de las muestras de cada tratamiento se realizaron utilizando cinco réplicas ($n=5$).

3.3.3.5. Pigmentos fotosintéticos

Para determinar el contenido de clorofilas (Chl) *a*, Chl *b* y carotenoides en las muestras de hojas ($n=5$), se cortó un disco de 1 cm² y se lo colocó en 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Se los dejó durante 45 min en oscuridad a 70 °C y se determinó la OD a 665, 649 y 480 nm contra un blanco de reactivo, con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, de acuerdo con Chappelle *et al.* (1992) y las fórmulas de Wellburn (1994; **Ecuación A.2**; Ver anexo).

La **Figura A.6 A y B** muestra las estructuras químicas de los pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, Chl *b* y β -caroteno), mientras que la **Figura A.7 A y B** muestra los espectros de absorbancia de los pigmentos fotosintéticos extraídos con DMSO (dónde la absorbancia de los distintos pigmentos está superpuesta) y los de cada pigmento en particular (en base a Taiz y Zeiger, 2002; Ver anexo).

3.3.3.6. Integridad de la membrana celular

A las muestras de hojas refrigeradas ($n=5$) se les extrajeron 10 discos de hojas de 1 cm² cada uno. Los discos se lavaron tres veces con H₂O bidestilada para remover los electrolitos adheridos a la superficie externa, y posteriormente se los colocó en viales con 30 mL de H₂O bidestilada. Se los dejó en oscuridad por 24 h a 8 °C. Se midió la conductividad eléctrica (CE) de la solución (CE libre), después de equilibrar a 25 °C, con un conductímetro (pH/CON

510, Oakton Instruments, Vernon Hills, IL, EE.UU.). Las muestras fueron posteriormente calentadas durante 1 h a 80 °C, enfriadas y mantenidas a oscuridad durante 16 h a 8 °C. Después, se midió la CE de la solución (CE total) a 25 °C. La integridad de la membrana celular se calculó de acuerdo con Vasquez-Tello *et al.* (1990; **Ecuación A.3**; Ver anexo).

3.3.3.7. **Peroxidación de lípidos de membrana**

Para evaluar el daño oxidativo como peroxidación de lípidos de membrana, se midió el contenido de malondialdehído (MDA) siguiendo el procedimiento descrito por Beligni y Lamattina (2002). Las muestras de 75 mg de PF de hoja fueron adicionadas con 1,5 mL de una solución con 15% de ácido tricloroacético, 0,5% de ácido tiobarbitúrico y 0,25% de ácido clorhídrico. La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a 95 °C por 60 min. Después de centrifugarla a 9.300 g por 10 min, se colectó el sobrenadante. Se midió la absorbancia de los extractos a 535 nm de longitud de onda contra un blanco de reactivo, con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La concentración se calculó con la **Ecuación A.4** considerando el coeficiente de extinción molar del MDA = $1,56 \times 10^5 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ver anexo) Las mediciones de las muestras de cada tratamiento se realizaron utilizando cinco réplicas (n=5).

3.3.3.8. **Contenido de proteínas y actividad de enzimas antioxidantes**

Se tomaron 250 mg de PF de muestras refrigeradas de hoja, se molieron y homogeneizaron utilizando un mortero de porcelana con 5 mL de solución de extracción (buffer fosfato de potasio 100 mM y pH 7,5; Triton X-100 0,1%, EDTA 1 mM y ácido ascórbico 0,5 mM) a 5 °C y 0,25 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Se centrifugó por 5 min a 9.300 g, se colectó el sobrenadante y se congeló a -20 °C.

El contenido de proteínas se determinó con la técnica descrita por Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (BSA, bovine serum albumin) como estándar y reactivo de Bradford (Coomassie Blue G-90 disuelto en una solución acuosa con 10% etanol y 10% ácido fosfórico), midiendo la absorbancia a 595 nm de longitud de onda con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico contra un blanco de reactivo. El cálculo del contenido de proteínas en las muestras se realizó en base a una curva de calibración con BSA ($r^2=0,99$).

La actividad de la enzima catalasa (CAT) fue determinada siguiendo el consumo de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 240 nm de longitud de onda en 2,5 mL de mezcla de reacción (búfer fosfato de potasio 100 mM y pH 7,5) y 75 μL de muestra. La reacción se empezó agregando 7,5 μL de una solución con H_2O_2 34,8 mM y los cambios de absorbancia fueron seguidos durante 60 s tal como lo describieron Azevedo *et al.* (1998).

La actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX) se midió por la disminución de absorbancia del ascorbato a 290 nm de longitud de onda en 2,5 mL de mezcla de reactivo (buffer fosfato de potasio 50 mM y pH 7,0; EDTA 1 mM; ácido ascórbico 0,5 mM y H_2O_2 1 mM). La reacción empezó cuando se agregó 40 μL de la muestra y los cambios en absorbancia se siguieron durante 60 s de acuerdo con Barka (2001).

La actividad de la enzima peroxidasa (POX) fue determinada siguiendo la oxidación de guayacol a tetraguayacol a 470 nm de longitud de onda en 2,5 mL de mezcla de reacción con buffer fosfato de potasio 50 mM y pH 6,0; H₂O₂ 1,2 mM y guayacol 2 mM. La reacción empezó agregando 100 µL de la muestra y los cambios en absorbancia fueron seguidos durante 60 s como lo establecieron Zhang y Kirkham (1994).

Todas las determinaciones se hicieron utilizando cinco réplicas (n=5).

3.3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo como bloques completos al azar con un arreglo factorial de tratamientos 2 x 2. Los efectos del factor UV-B (P_{UV-B}), del factor ABA (P_{ABA}) y de su interacción ($P_{UV-B \times ABA}$) se determinaron a través de ANOVA multifactorial, utilizando el software Statgraphics Centurion XV versión 15.0.10 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). El nivel de significancia utilizado para el análisis y la discusión de los resultados fue de $P \leq 0,10$.

3.4. Resultados

UV-B incrementó 2,7 veces el contenido de ABA en las hojas de vid, el tratamiento con ABA 3,6 veces y el efecto combinado de UV-B y ABA 12,5 veces al compararlo con -UV-B/-ABA (Figura 3.5).

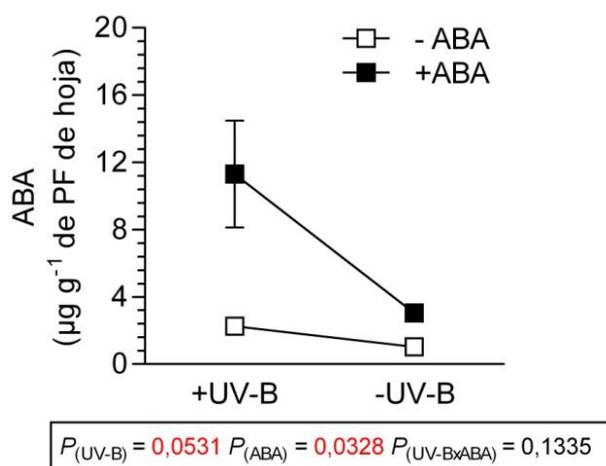


Figura 3.5 ABA en hojas de vid cv. Malbec ($\mu\text{g g}^{-1}$ de PF de hoja) en los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

No se observaron diferencias en el contenido de Chl, tanto totales como Chl a y Chl b, y en el de carotenoides (Figura 3.6 A, B, C y D). Sólo la combinación de +UV-B y +ABA produjo el mayor contenido de carotenoides, con un nivel de significancia de $P=0,06$ para el factor UV-B (Figura 3.6 B).

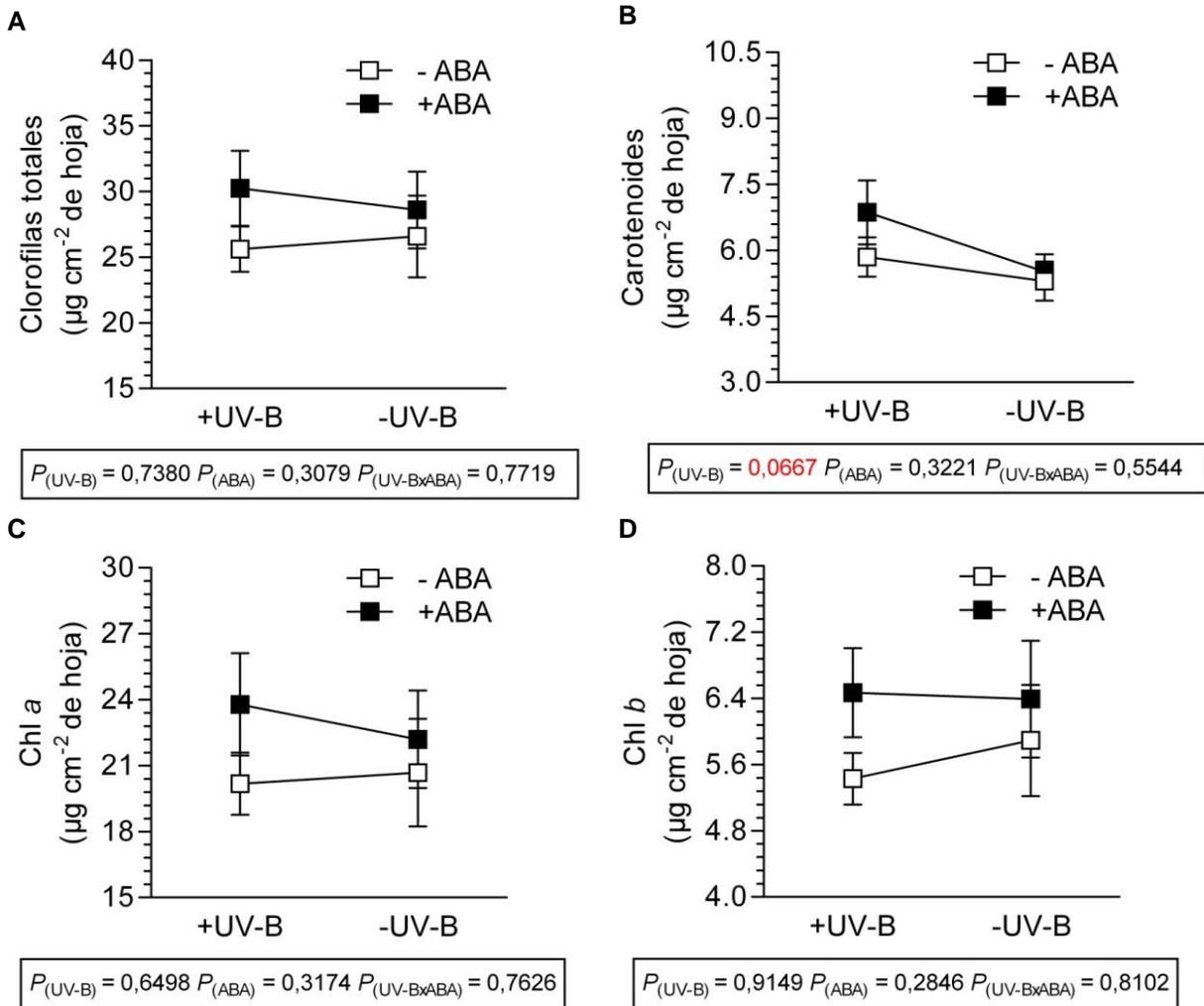


Figura 3.6 Clorofilas totales (A), carotenoides (B), Chl a (C) y Chl b (D) en hojas de vid cv. Malbec (µg cm⁻² de hoja) en los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media ± SEM.

El contenido de UVAC fue incrementado por +UV-B y +ABA con una interacción significativa entre UV-B y ABA (**Figura 3.7 A**) indicando que los efectos de ABA son dependientes de UV-B. Los niveles de antocianos fueron también incrementados por +UV-B y +ABA (**Figura 3.7 B**). La **Figura 3.7 C** muestra una fotografía donde se puede apreciar la pigmentación diferencial en las hojas de cada tratamiento. Los UVAC caracterizados por GC-EIMS fueron flavonoles (quercetina y kaempferol) y los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico y *p*-cumárico).

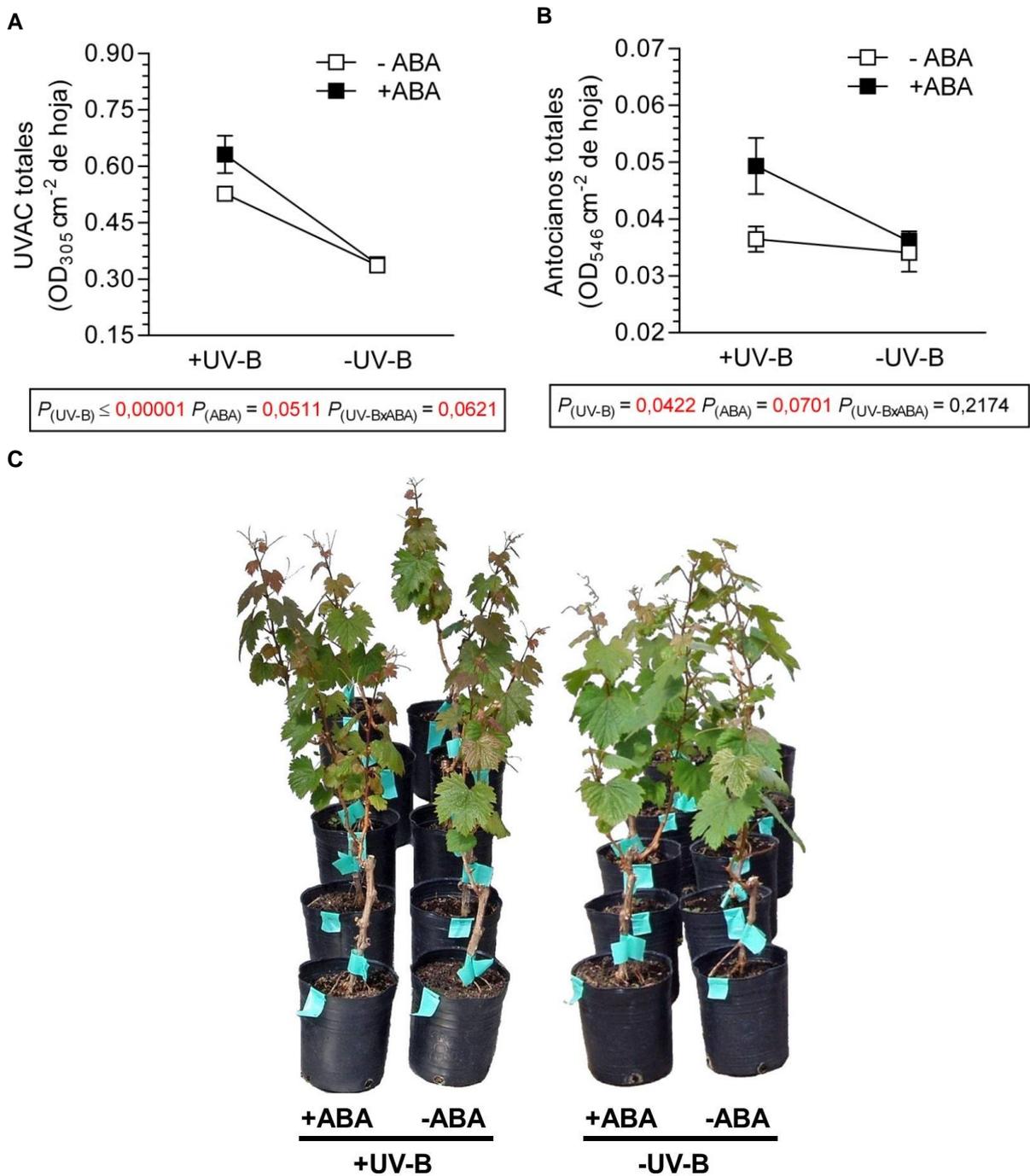


Figura 3.7 UVAC totales (**A**) y antocianos totales (**B**) en hojas de vid cv. Malbec ($OD_{305} \text{ cm}^{-2}$ de hoja y $OD_{546} \text{ cm}^{-2}$ de hoja, respectivamente), y plantas en macetas de los distintos tratamientos al final del experimento (**C**), en los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

La **Figura 3.8** muestra los cromatogramas característicos de GC-EIMS de flavonoles y esteroides obtenidos en hojas de vid cv. Malbec bajo los diferentes tratamientos. La concentración de quercetina fue aproximadamente 20 veces mayor que la de kaempferol para todos los tratamientos y los niveles de ambos fueron significativamente incrementados por +UV-B y +ABA (**Figura 3.9 A y B**). Hubo interacción significativa entre UV-B y ABA en la concentración de kaempferol, indicando que la promoción de kaempferol por +ABA es

dependiente de los niveles de UV-B. Estos resultados también se correlacionan con las determinaciones espectrofotométricas de los UVAC (**Figura 3.7 A**). La concentración de ácido cafeico fue aproximadamente cinco veces mayor que la del ácido *p*-cumárico y 20 veces mayor que la del ácido ferúlico, considerando un valor medio para todos los tratamientos (**Figura 3.10 A, B y C**). Las aplicaciones de ABA aumentaron significativamente la concentración de ácido cafeico y de ácido ferúlico, pero no afectaron la de ácido *p*-cumárico. Ninguno de los ácidos hidroxicinámicos fue afectado por UV-B.

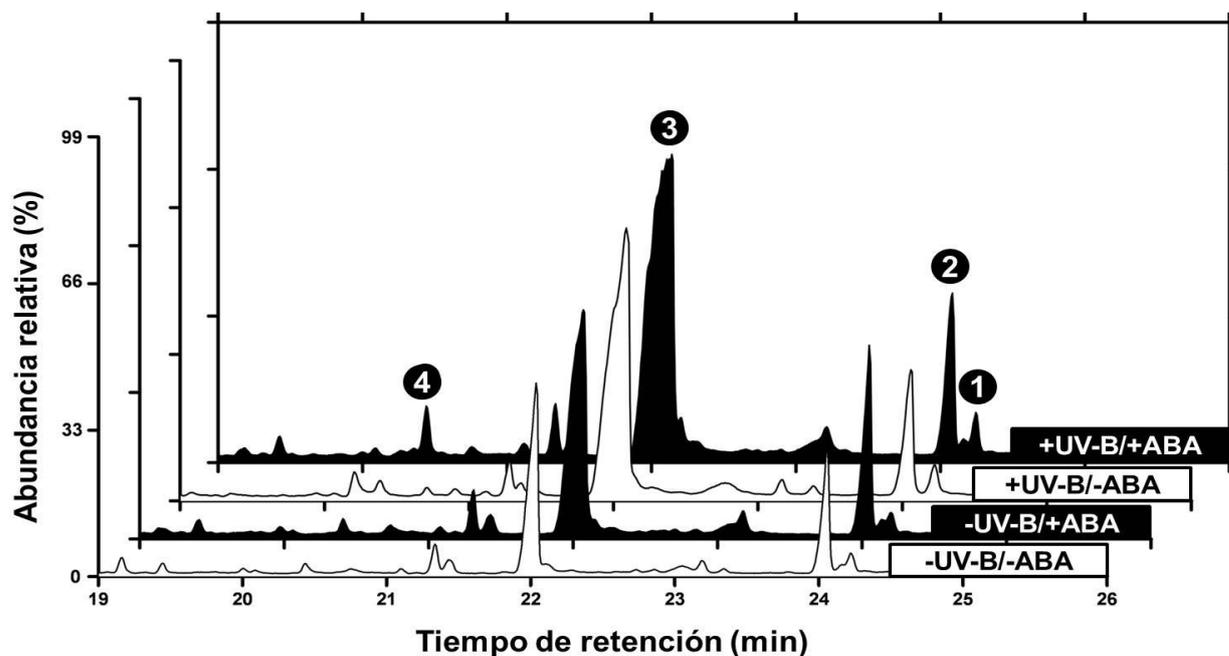


Figura 3.8 Cromatogramas característicos de GC-EIMS de flavonoles y esteroides de membrana en hojas de vid cv. Malbec para los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). Estigmasterol (1), β -sitoesterol (2), quercetina (3) y kaempferol (4).

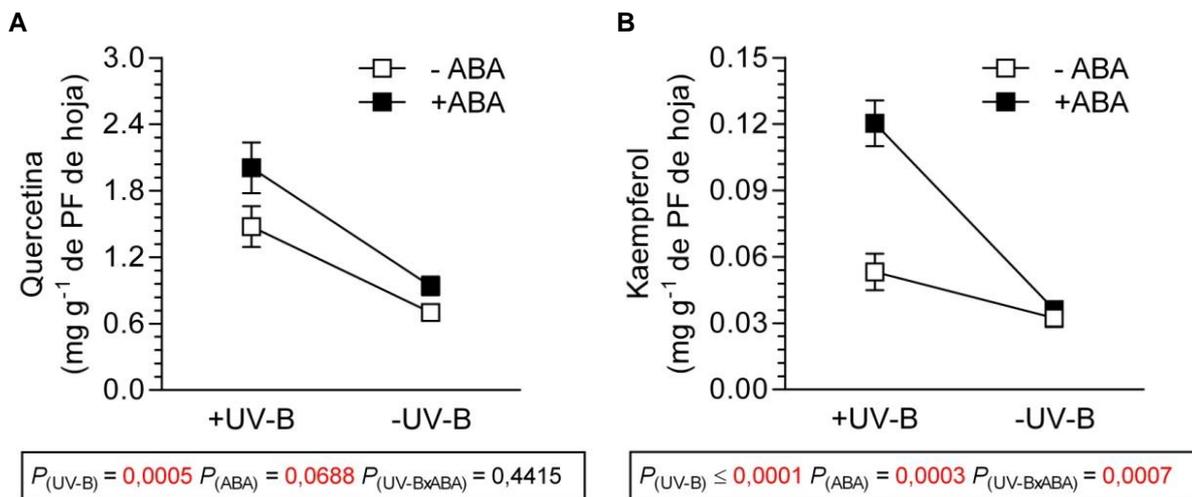


Figura 3.9 Quercetina (A) y kaempferol (B) en hojas de vid cv. Malbec (mg g^{-1} de PF de hoja), determinadas en los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

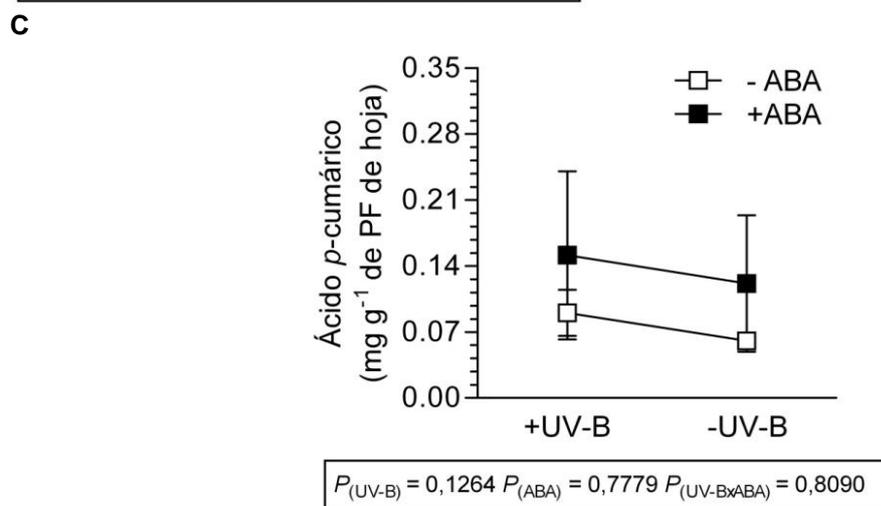
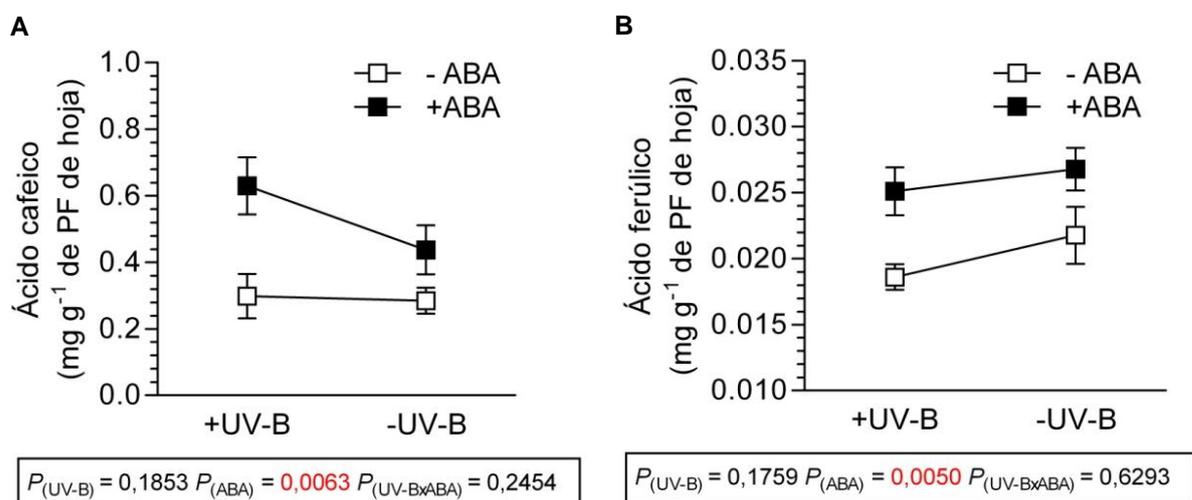


Figura 3.10 Ácidos cafeico (A), ferúlico (B) y *p*-cumárico (C) en hojas de vid cv. Malbec (mg g^{-1} de PF de hoja), determinadas en los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

La actividad de CAT se incrementó significativamente por aplicaciones de ABA, pero no hubo efecto significativo por UV-B (**Figura 3.11 A**). Las actividades de APX y POX tuvieron una interacción significativa entre UV-B y ABA, siendo máximas en el tratamiento combinado +UV-B/+ABA (**Figura 3.11 B y C**). Esto indica que la promoción de las actividades de APX y de POX por +ABA son dependientes de UV-B.

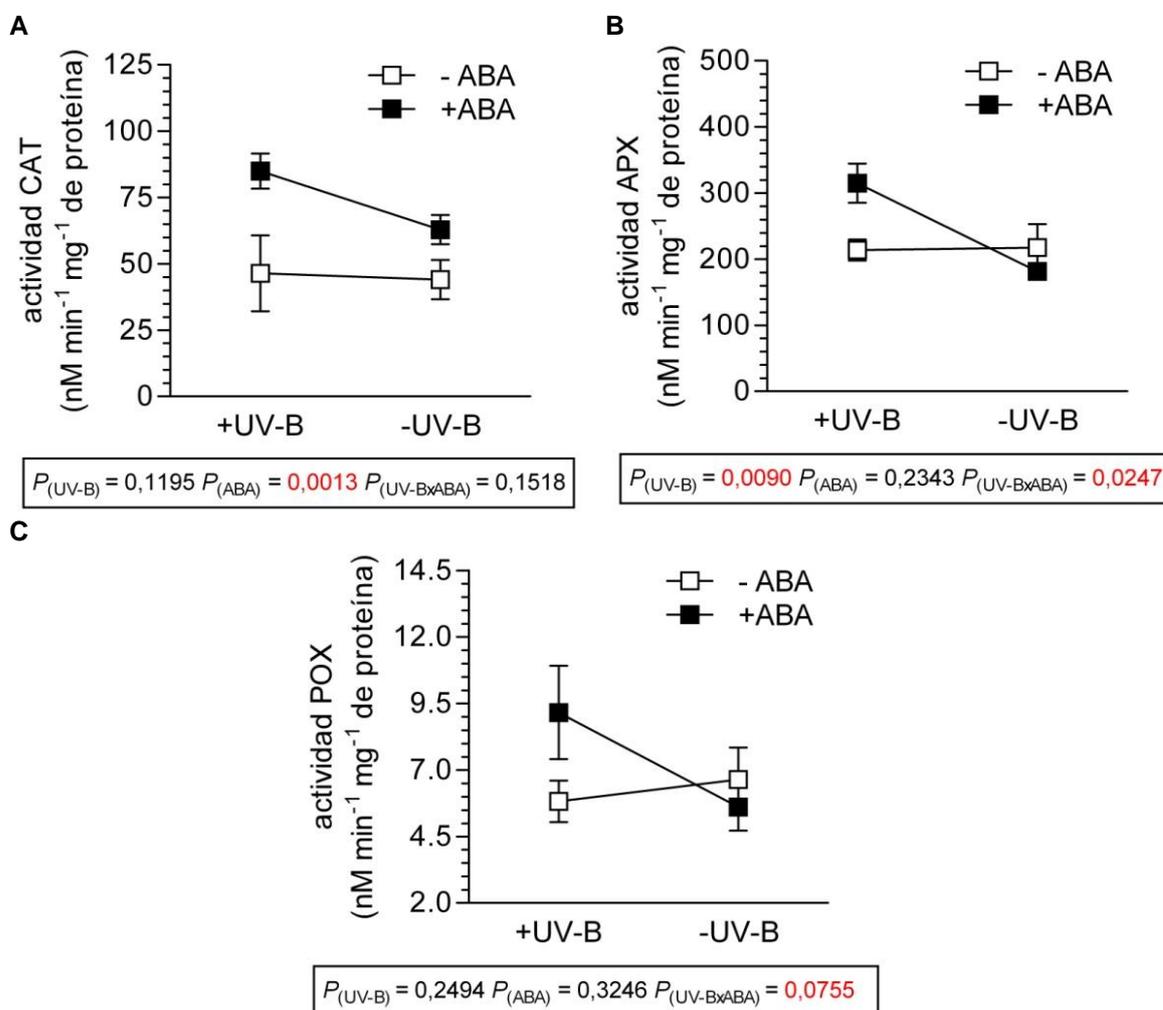


Figura 3.11 Actividades de las enzimas CAT (**A**), APX (**B**) y POX (**C**) en hojas de vid cv. Malbec ($\text{nM min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína), determinadas en los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

Los esteroides de membrana estigmasterol y β -sitoesterol fueron identificados por GC-EIMS y el contenido de β -sitoesterol fue aproximadamente cinco veces superior que el de estigmasterol, considerando un valor medio para todos los tratamientos (**Figura 3.12 A y B**). La integridad de la membrana celular y el contenido de β -sitoesterol fueron significativamente mejorados por aplicaciones de ABA, pero no se vieron afectados por UV-B (**Figura 3.12 B y C**). El daño oxidativo, de acuerdo con la concentración de MDA, fue reducido significativamente al excluir UV-B (**Figura 3.12 D**). El contenido de estigmasterol no fue afectado por los tratamientos (**Figura 3.12 A**).

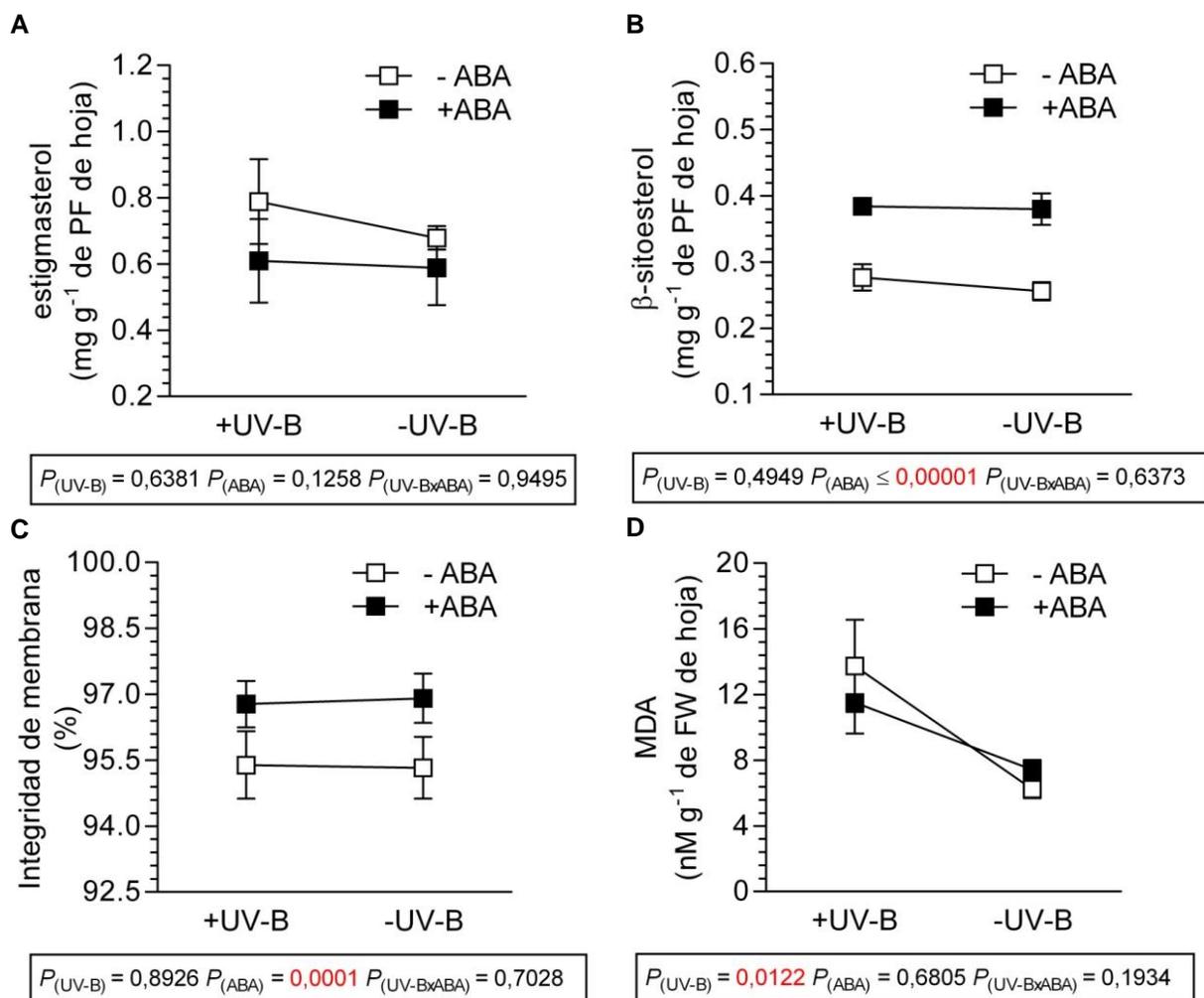


Figura 3.12 Esteroles: estigmasterol (A) y β -sitosterol (B), integridad de membrana (C) y MDA (D) en hojas de vid cv. Malbec (mg g^{-1} de PF de hoja, %, y nM g^{-1} de PF de hoja, respectivamente), en los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA (negro) y -ABA (blanco). $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

3.5. Discusión

Aunque UV-B representa solamente una pequeña porción de la radiación solar que llega a la superficie terrestre, su impacto en los procesos biológicos es considerado de gran importancia (Björn *et al.*, 2002; Jordan, 2002). Diferentes investigaciones han demostrado que la producción de ROS se desencadena en distintos compartimentos celulares cuando los tejidos de las plantas son expuestos a UV-B y, como resultado, puede ocurrir un daño oxidativo de las proteínas y membranas celulares (Scandalios, 1993). El presente estudio se realizó en un ambiente natural y, aunque se observó un incremento en el contenido de MDA, que refleja peroxidación de lípidos (un indicador de estrés oxidativo ampliamente utilizado; Dai *et al.*, 1997; Alexieva *et al.*, 2001), y por lo tanto se manifestó cierto nivel de estrés, no se observó daño en la integridad de la membrana plasmática o fotooxidación de Chl en hojas expuestas a +UV-B.

El mantenimiento de los niveles de Chl en +UV-B fue bastante inesperado ya que Day *et al.* (1996) encontraron que UV-B puede dañar los tilacoides y dificultar la síntesis de clorofilas y carotenoides. También Pfündel, (2003) informó que UV-B era responsable de la inhibición del fotosistema II (PSII), es decir, pérdida de pigmentos fotosintéticos e inhibición de la fotosíntesis. Sin embargo, en los experimentos de Pfündel, las hojas de vid habían sido aclimatadas a crecer en oscuridad antes de los tratamientos con UV-B, mientras que en el caso de las plantas de este estudio, las mismas habían sido “aclimatadas” a crecer bajo niveles de UV-B ambientales. Efectos inhibitorios similares también fueron reportados en tejidos de maíz por disminución de pigmentos fotosintéticos, intercambio gaseoso, actividad de la enzima Rubisco y contenido total de azúcar (Correia *et al.*, 2005), aunque estos efectos de UV-B fueron obtenidos en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Esto significa que la sensibilidad de los tejidos a UV-B puede depender de la presencia de otros factores de estrés.

El incremento de los UVAC y de los antocianos es otra respuesta que protegería las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos, a través de dos vías: directamente absorbiendo la radiación UV-B o indirectamente reaccionando con las ROS generados por dicha radiación (Frohnmeier y Staiger, 2003; Merzlyak *et al.*, 2008). Los fenoles transforman la radiación de onda corta, con alta energía y altamente destructiva, en radiación de longitud de onda más larga, menos destructiva para las estructuras celulares de las hojas, incluyendo el aparato fotosintético en el mesófilo de las hojas (Burger y Edwards, 1996; Mazza *et al.*, 2000; Bilger *et al.*, 2001). Adicionalmente, los compuestos fenólicos pueden aumentar la protección contra el estrés oxidativo ya que poseen estructuras químicas capaces de eliminar radicales libres, siendo efectivos antioxidantes (Blokhina *et al.*, 2003). En muchos tejidos de plantas, dos clases de compuestos fenólicos parecen estar involucrados en la protección epidérmica a UV-B, los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides. Estos compuestos varían entre especies y de acuerdo con los estadios de desarrollo y con los tejidos. Los resultados con hojas de vid cv. Malbec muestran que los UVAC encontrados en los tejidos de hoja fueron flavonoles (quercetina y kaempferol) y ácidos hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico y *p*-cumárico), aunque solamente quercetina y kaempferol fueron significativamente incrementados por +UV-B. La quercetina es más eficiente eliminando ROS que el kaempferol, debido a que posee un mayor número de grupos hidroxilos; además, la concentración de quercetina en los tejidos de hoja fue aproximadamente 20 veces superior a la de kaempferol. Nuestros resultados son consistentes con los observados por Kolb *et al.* (2001), quienes también encontraron un aumento en la síntesis de flavonoides, específicamente los flavonoles quercetina y kaempferol en hojas de vid expuestas a UV-B. También con el trabajo de Pontin *et al.* (2010), quienes observaron que plantas de Malbec *in vitro* sometidas a altas y bajas intensidades de UV-B aumentan la expresión de genes involucrados en las rutas generales de biosíntesis de flavonoles y fenilpropanoides (PAL y

CHS). La acumulación de compuestos fenólicos que absorben UV selectiva y pasivamente en la epidermis probablemente represente la estrategia más efectiva desde el punto de vista costo-beneficio, como adaptación en el caso de exposiciones regulares y prolongadas a intensidades y dosis altas de UV-B, situación en que resulta muy costoso mantener continuamente procesos activos de reparación (Cockell y Knowland, 1999; Liakoura *et al.*, 2003).

Por otra parte, Núñez-Olivera *et al.* (2006) observaron un incremento en la concentración de Chl y carotenoides y una reducción de UVAC en plantas de vid cv. Tempranillo crecidas bajo exclusión de UV-B. Es decir que la radiación solar UV-B parece que causa cierto daño en vides de Tempranillo (posiblemente susceptibles), lo que no ocurrió con Malbec (posiblemente más tolerante), dado que las plantas con +UV-B mantuvieron los niveles de Chl e incluso aumentaron los niveles de carotenoides. Estos compuestos juegan un papel importante en el complejo de captación de luz, no solamente ampliando el rango de luz absorbida por el aparato fotosintético, sino también protegiendo los fotosistemas (Ort, 2001). Los carotenoides reprimen las moléculas de Chl en estado excitado de triplete y secuestran oxígeno singulete y otras ROS tóxicas que se forman en el cloroplasto (Ong y Tee, 1992) y así disipan el exceso de energía bajo condiciones estresantes (Young, 1991).

La actividad enzimática antioxidante puede explicar parcialmente por qué la integridad de la membrana celular no se afectó por +UV-B cuando también se aplicó ABA, ya que las actividades de CAT, APX y POX fueron mayores con este tratamiento. Se ha informado que POX es inducida por luz en vid (Barceló *et al.*, 2003) y ABA puede inducir la biosíntesis de estas enzimas (Jiang y Zhang, 2001). Otros estudios consideran que el ABA es mayormente un potenciador del daño oxidativo, ya que puede incrementar la producción de ROS e inducir la actividad de SOD, CAT, APX y GR en plantas (Jiang y Zhang, 2001; Sakamoto *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los aumentos en la actividad CAT fueron causados por +ABA independientemente de UV-B, mientras que las actividades de APX y POX fueron incrementados por +ABA, pero sólo cuando estaba presente +UV-B.

La integridad de la membrana celular, evaluada por la pérdida de electrolitos, puede ser un buen indicador de la tolerancia a estrés de las plantas (Vasquez-Tello *et al.*, 1990). En el experimento se obtuvo una correlación positiva entre esta variable y el sistema de defensa inducido por ABA. La integridad de la membrana celular aumentó después de aplicar ABA independientemente de los tratamientos con UV-B. Este aumento se asoció con un incremento en el contenido de β -sitoesterol. Las membranas celulares de las plantas incluyen varios esteroides en su estructura, donde β -sitoesterol usualmente predomina (Hartmann, 1998; Nomura *et al.*, 1999) y los resultados obtenidos lo confirman.

No hay antecedentes en vid del aumento de ABA por UV-B ni del efecto de interacción entre UV-B y ABA. Hay un trabajo con *Arabidopsis thaliana* donde demuestran que con

tratamientos de UV-B las plantas silvestres incrementan los niveles de ABA (Rakitin *et al.*, 2008). Una búsqueda en bases de datos de microarreglos (Genevestigator Expression Data) mostró que la expresión del gen *aba-1* (At5g67030) de *Arabidopsis*, clave en la síntesis de ABA, es estimulada por UV-B. Esto apoya el efecto promotor del UV-B sobre la síntesis de ABA que observamos en el presente estudio con vid. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el aumento de ABA por UV-B también puede deberse a cambios en su degradación.

3.6. Conclusiones

La hipótesis inicial de que los niveles de UV-B solar en los viñedos de altura de Mendoza producen daño oxidativo en las plantas de vid cv. Malbec fue confirmada en parte. Hay que tener en cuenta que aunque se observó un incremento en el contenido de MDA, lo que refleja que ocurrió peroxidación de lípidos, un indicador de estrés oxidativo, no se observó daño en la integridad de la membrana plasmática o fotooxidación de Chl en hojas expuestas a +UV-B.

La hipótesis de que el ABA está involucrado en las respuestas de protección de las hojas de vid cv. Malbec a UV-B fue corroborada. El ABA está involucrado en la tolerancia de los tejidos epidérmicos a UV-B, incrementando los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes y aumentando la defensa estructural con esteroides de membrana, aunque estas respuestas son, en algunos casos, también dependientes de la presencia de altos niveles de UV-B, lo que posiblemente indicaría que también hay otros factores involucrados en la señalización de UV-B. El sistema de defensa antioxidante parece ser inicialmente activado por +UV-B, y ABA parece actuar río abajo en las rutas de señalización, aunque algunas respuestas son activadas solamente por +ABA.

Proponemos un modelo (**Figura 3.13 A, B y C**) en el que: la primera línea de defensa probablemente incluya elevar los niveles de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos, filtrando parte de la radiación UV-B incidente. La quercetina, el kaempferol y los antocianos fueron incrementados por +UV-B, con un aumento adicional cuando se aplicó +ABA. En contraste, aumentos de la concentración de ácido cafeico y ácido ferúlico (ácidos hidroxicinámicos) fueron desencadenados solamente por +ABA. Se postula también que parte del exceso de energía originado por UV-B es disipado por los carotenoides. Los niveles de carotenoides fueron aumentados solamente por +UV-B, aunque se debe tener en cuenta que +UV-B también incrementó la concentración endógena de ABA en las hojas. Trabajos del grupo del Dr. R. Bottini han demostrado que ABA incrementa el contenido de carotenoides en tejido foliar de yerba mate (Sansberro *et al.*, 2004) y trigo (Travaglia *et al.*, 2007). El sistema enzimático antioxidante (CAT, APX y POX) también se postula que contribuye a mitigar el estrés inducido por UV-B y su actividad es incrementada por las aplicaciones de ABA (CAT), y por +ABA cuando las plantas también perciben +UV-B (APX y POX). Finalmente, una resistencia estructural extra a los daños inducidos por +UV-B incluyen un aumento en los

esteroles de membrana, que en el estudio fueron aumentados exclusivamente por +ABA, pero no por +UV-B.

La mayor parte de los resultados de este capítulo han sido publicados en un artículo de *Plant Cell and Environment* (Berli *et al.*, 2010).

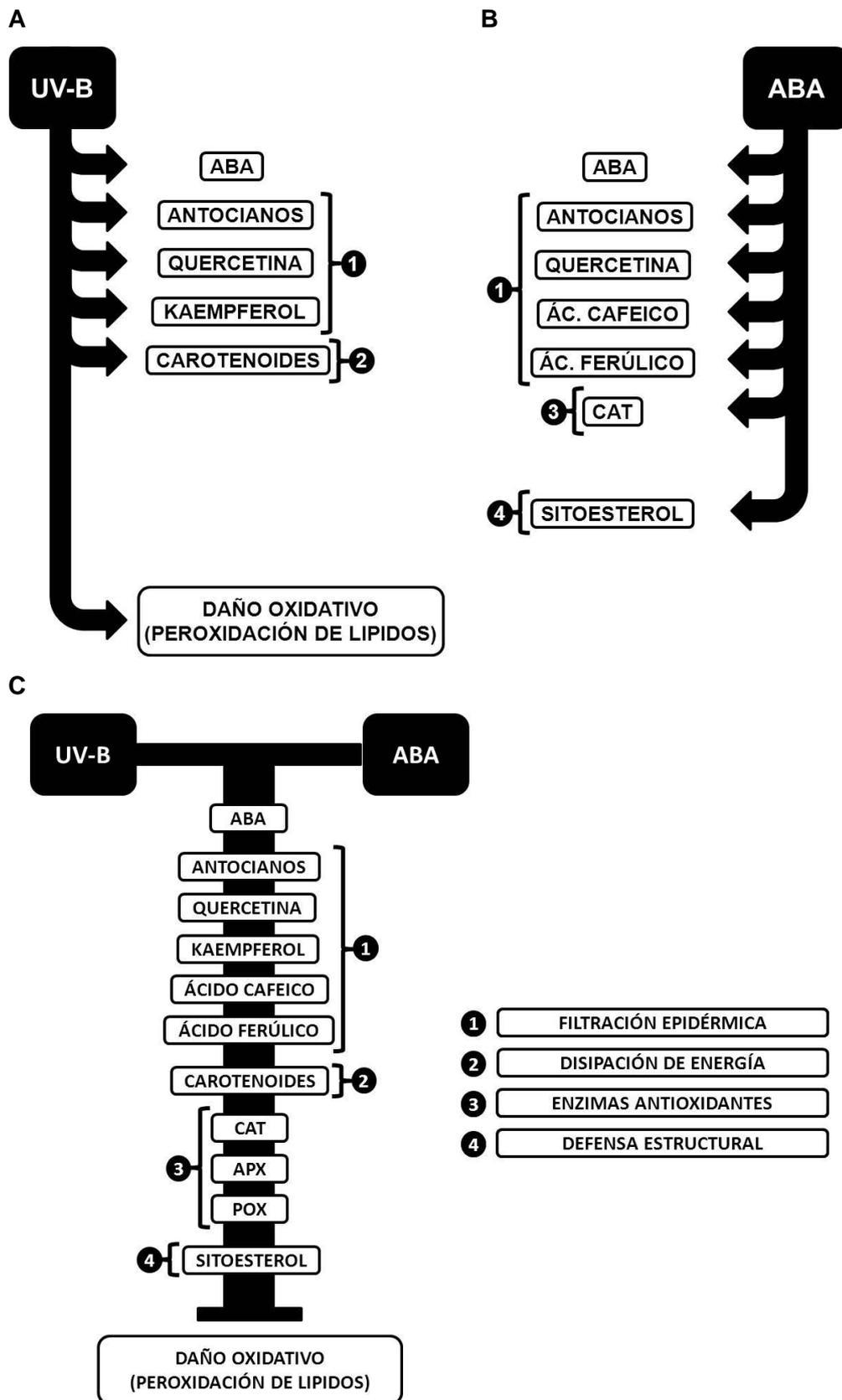


Figura 3.13 Modelo propuesto de los efectos de UV-B (A), ABA (B), y de la combinación de UV-B y ABA (C) en hojas de vid cv. Malbec.

4. CAPÍTULO 4: Efectos de UV-B y ABA sobre bayas de vid cv. Malbec

4.1. Hipótesis

La radiación UV-B solar que reciben las plantas a 1.450 m de altitud es un factor estresante que incrementa los niveles de ABA en los hollejos de las bayas del cv. Malbec. Esta señal aumenta la biosíntesis de compuestos fenólicos como mecanismo de defensa, modificando el perfil de antocianos y de fenoles de bajo peso molecular.

Las aplicaciones de ABA a las plantas pueden producir efectos similares a los que se obtienen con altos niveles de UV-B solar, al señalizarle a la planta una situación de estrés, aumentando la acumulación de compuestos fenólicos.

4.2. Objetivos específicos

Estudiar los efectos de la radiación UV-B que reciben las plantas de vid cv. Malbec a 1.450 m de altitud en uno de los viñedos más altos de Mendoza, del ABA y de su interacción, durante el crecimiento y desarrollo de las bayas, sobre:

- el contenido de ABA en los hollejos de las bayas.
- el crecimiento de las bayas.
- la acumulación de azúcar en las bayas.
- el contenido y perfil de compuestos fenólicos (antocianos y fenoles de bajo peso molecular) en los hollejos.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Material vegetal y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo durante la temporada 2008-2009 (2009) en un viñedo comercial ubicado a una altitud de 1.450 m snm, uno de los más altos en la región, en Gualtallary (33°24'S, 69°16'O), Tupungato, Mendoza, Argentina. Las plantas de vid fueron clones seleccionados de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec, plantados en 1997, a pie franco (sin portainjertos), conducidas en un sistema de espaldero alto, podadas como Guyot con hileras orientadas de norte a sur y separadas 2 m, con 1,20 m entre plantas de la hilera. El viñedo tiene suelos arenosos con 5-10% de grava, 0,8 m de profundidad y un sistema de riego por goteo. Las plantas fueron mantenidas sin restricción hídrica durante el experimento.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con un arreglo factorial de tratamientos 2 x 2 (dos factores con dos niveles cada uno) y 5 bloques (n=5). La unidad experimental consistió en 4 plantas seleccionadas de 6 plantas consecutivas en la hilera en base a su homogeneidad. Las plantas se podaron cuando los brotes alcanzaron 10 cm de largo (etapa 12; Coombe, 1995), dejando 12 brotes por planta, con dos racimos cada uno.

4.3.2. Tratamientos

Se establecieron dos regímenes de radiación, utilizando diferentes coberturas plásticas desde 15 días antes de floración hasta cosecha a los 126 días después de floración (DDF), considerando floración al desprendimiento del 50% de las caliptras (etapa 23; Coombe, 1995). La radiación UV-B solar se filtró para producir los tratamientos con exclusión de UV-B (-UV-B) utilizando coberturas de poliéster cristal (PE) con 100 μm de espesor (Oeste Aislante, Buenos Aires, Argentina). Estos filtros de PE absorbieron el 78% de UV-B y el 12% de PAR solar (**Figura 4.1 A**). Se establecieron también tratamientos que recibieron la radiación solar UV-B (+UV-B) utilizando coberturas de polietileno de baja densidad (PET) con 40 μm de espesor para minimizar las diferencias microambientales entre los tratamientos -UV-B y +UV-B. Estas coberturas PET transmitieron la mayoría de la radiación solar (90% de UV-B y el 87% de PAR; **Figura 4.1 A**). Los plásticos se ubicaron a 2,5 m por encima del nivel del suelo, cubrieron toda la canopia formando un techo a dos aguas (**Figura 4.1 B**) y fueron reemplazados después de roturas o reducciones en la transmitancia, según controles cada 15 días con un radiómetro y sensor para PAR (LI-250 y LI-190SA, Licor Inc., Lincoln, NE, EE.UU.) y un radiómetro y sensor para UV-B (PMA2200 y PMA2102, Solar Light Company Inc., Glenside, PA, EE.UU.). Todos los tratamientos fueron protegidos por tela antigranizo (polietileno negro) que absorbió un 15% y un 17% de las radiaciones solares UV-B y PAR, respectivamente (**Figura 4.1 A**).

Para cada uno de los tratamientos de UV-B, se realizaron dos tratamientos con ABA (dos factores con dos niveles cada uno). Los tratamientos hormonales se llevaron a cabo con aspersiones semanales a la parte aérea de la planta (incluyendo hojas y bayas) con diferentes soluciones, desde 45 a 126 DDF. Para los tratamientos con aplicaciones de ABA (+ABA) se utilizó una solución acuosa conteniendo 1 mM \pm -S-*cis*, *trans* ácido abscísico (90%, Kelinon Agrochemical Co., Beijing, China), 0,1% de Triton X-100 como surfactante y etanol acuoso 96% para disolver inicialmente el ABA (10 mL g⁻¹ de ABA). Esta dosis de ABA se eligió de acuerdo con trabajos previos en vid (Quiroga *et al.*, 2009; Berli *et al.*, 2010). Las aspersiones se hicieron hasta goteo, con aproximadamente 125 mL planta⁻¹, utilizando aspersores manuales y en el atardecer, para minimizar la fotodegradación del ABA. Una solución con H₂O y la concentración de surfactante y etanol descripta anteriormente se utilizó para los tratamientos sin aplicaciones de ABA (-ABA).

La **Figura 4.1 C** muestra una representación esquemática de los diferentes tratamientos y la **Figura 4.2 A y B** es un ejemplo de las plantas de los tratamientos -UV-B y +UV-B en una unidad experimental, mientras que la **Figura 4.2 C** una vista aérea de los ensayos a campo.

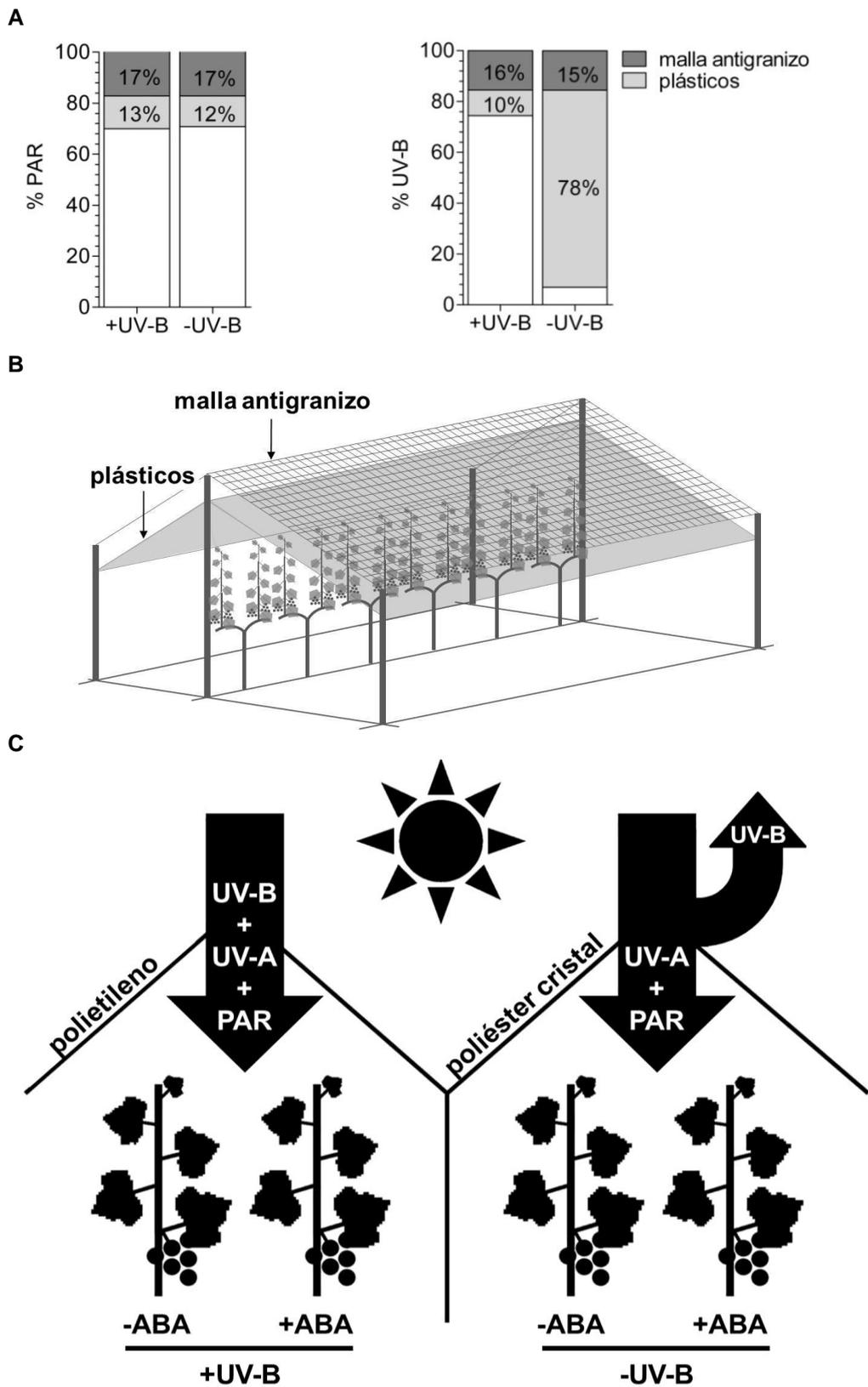


Figura 4.1 Porcentaje de las radiaciones PAR y UV-B solar absorbidas por la malla antigranizo (gris oscuro) y por los distintos plásticos (gris) utilizados en los tratamientos +UV-B y -UV-B (PET y PE, respectivamente), en base a las mediciones realizadas a campo (**A**). Representación esquemática de una unidad experimental donde se seleccionaban 4 plantas de 6 en la hilera, con 12 brotes por planta y 2 racimos por brote (**B**). Representación esquemática de los diferentes tratamientos en los ensayos a campo (**C**).



Figura 4.2 Plantas de los tratamientos -UV-B (A) y +UV-B (B) en una unidad experimental y vista aérea del ensayo a campo donde se muestran los 5 bloques utilizados con los distintos tratamientos (C).

4.3.3. Muestreo de bayas y determinaciones de su peso, volumen y contenido de azúcar

Se recolectaron 55 bayas al azar por unidad experimental ($n=5$) en bolsas de nylon, tomando 5 bayas por racimo (2 de la parte superior, 2 del medio y 1 de la base) de 11 racimos distintos expuestos al oeste. Este muestreo se realizó en 5 momentos del desarrollo de las mismas, a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. En el campo, las muestras se mantuvieron en hielo seco para prevenir que se deshidraten y en el laboratorio fueron pesadas para obtener el peso fresco (PF) de las bayas, congeladas y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se descongelaron 50 bayas por unidad experimental a temperatura ambiente y los hollejos fueron separados de las pulpas y semillas a mano. Las pulpas se recolectaron en bolsas de nylon, se aplastaron con la presión de los dedos y se determinó la concentración relativa de azúcar ($^{\circ}\text{Brix}$) en el jugo con un refractómetro digital (Pocket PAL-1, Atago Co., Ltd., Tokio, Japón). Los $^{\circ}\text{Brix}$ se consideraron como el peso del azúcar en g cada 100 g PF bayas, porque tienen alta correlación, aunque en realidad representan el peso de los sólidos solubles. Este valor de concentración se multiplicó con el PF de las bayas para calcular el contenido de azúcar por baya (**Ecuación A.5**; Ver anexo). Las otras 5 bayas por unidad experimental también fueron descongeladas a temperatura ambiente y se utilizaron para determinar el volumen de las bayas, sumergiéndolas en una probeta con H_2O para medir el volumen desplazado de líquido. También se midió el peso seco (PS) de los hollejos, pulpas y semillas, después de secar los tejidos a 40°C hasta peso constante.

4.3.4. Extracción de ABA y de compuestos fenólicos en hollejos

Los hollejos obtenidos a partir de las 50 bayas, como se describió anteriormente, fueron deshidratados parcialmente dejándolos en oscuridad a temperatura ambiente durante 24 h. Posteriormente, se les adicionaron 50 mL de una solución acuosa (12% de etanol, 6 g L^{-1} de ácido tartárico y el pH ajustado en 3,2 con NaOH) y se realizó la extracción a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en oscuridad durante 3 h, siguiendo la técnica descrita por Riou y Asselin (1996). La fracción líquida fue separada por decantación, mantenida 24 h a 4°C en heladera y centrifugada por 10 min a 10.000 g para eliminar el exceso de ácido tartárico (en forma de sales tartáricas) y otros sedimentos. Finalmente, se recolectó el sobrenadante, se congeló y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.5. Contenido de ABA en hollejos

Una alícuota de 0,5 mL de la solución de extracción de hollejos por unidad experimental fue adicionada con 100 ng de ABA hexa-deuterado ($[\text{}^2\text{H}_6\text{]-ABA}$), estándar interno previamente disuelto en 10 μL de 100% metanol, y se dejó 1 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que se equilibren los diferentes isótopos de ABA. Posteriormente, se agregaron 2 mL de una solución 80% metanol en H_2O acidificada con 1% ácido acético y la muestra se evaporó en un rotavapor con vacío a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La purificación, derivatización y cuantificación del ABA en hollejos se realizó por GC-EIMS como se describió en el **Capítulo 3** para las hojas. Las mediciones de las muestras de cada tratamiento se realizaron utilizando solamente tres réplicas (n=3), seleccionadas al azar.

4.3.6. Contenido y perfil de antocianos y fenoles de bajo peso molecular en hollejos

Para antocianos, una alícuota de la solución de extracción de hollejos por unidad experimental fue filtrada con una membrana de nylon con poros de 0,45 μm y se inyectaron 100 μL en un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector con arreglo de diodos (HPLC-DAD, high-performance liquid chromatography with diode-array detection, Series 200, PerkinElmer, Shelton, CT, EE.UU.). La separación se realizó con columnas de fase reversa de 100 mm de largo, 4.6 mm de diámetro interno y de 2 μm de espesor de film (Chromolith Performance C₁₈, Merck, Darmstadt, Germany). La elución se realizó a 25 °C, con un gradiente de concentración entre el solvente A (10% ácido fórmico en H₂O), el solvente B (100% acetonitrilo) y el solvente C (100% metanol), aplicados a las tasas de flujo y tiempos que se detallan en la **Tabla A.1** (Ver anexo).

La detección se llevó a cabo desde 210 a 600 nm, de acuerdo con Fanzone *et al.* (2010) y la cuantificación se realizó por el cálculo del área de los picos a 520 nm de longitud de onda. El contenido de antocianos se expresó utilizando malvidina 3-glucósido (Extrasynthese, Lyon, France) como estándar para una curva de calibración ($r^2=0,96$).

Para los fenoles de bajo peso molecular, una alícuota de 10 mL de solución de extracción de hollejos por unidad experimental fue adicionada con 1 g de NaCl y sujeta a tres extracciones sucesivas con 5 mL de éter dietílico y tres con 5 mL de acetato de etilo. Las fracciones orgánicas se combinaron, se deshidrataron con 2,5 g Na₂SO₄, se filtraron con membranas de celulosa con poros de 3 μm y se evaporaron con un flujo suave de N₂ gaseoso a 30 °C hasta sequedad. El residuo sólido fue disuelto con 0,4 mL de una solución de 50% metanol en H₂O, filtrado a través de una membrana de nylon con poros de 0,45 μm y finalmente 30 μL fueron inyectados en el equipo de HPLC-DAD con columnas de fase reversa de 300 mm de largo, 3,9 mm de diámetro interno y 4 μm de espesor de film (Nova-Pak C₁₈, Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.). Un gradiente de concentración entre el solvente D (2% ácido acético en H₂O), el solvente E (H₂O: acetonitrilo: ácido acético, 78: 20: 2) y el solvente F (100% metanol) fue aplicado a las tasas de flujo y tiempos que se detallan en la **Tabla A.2** (Ver Anexo).

La detección se realizó desde 210 a 360 nm de longitud de onda y la identificación se realizó por comparación del espectro UV-Visible y del tiempo de retención con el de los estándares adquiridos de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, EE.UU.): ácido gálico, protocatequico, vanílico, sirínico, *p*-cumárico y cafeico; tyrosol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, *trans*-resveratrol, miricetina, quercetina, quercetina 3-galactosido y quercetina 3-glucósido. Los

compuestos, para los que no se consiguieron los estándares, fueron identificados en base a sus tiempos de retención y a las características de sus espectros UV-Visible, según lo establecido por Peña-Neira *et al.* (2000 y 2007). La cuantificación se llevó a cabo con las curvas de calibración obtenidas con la inyección de las soluciones estándares, con las mismas condiciones que para las muestras analizadas, utilizando un rango de concentraciones similar al observado ($r^2 \geq 0,94$).

Los compuestos para los que no se consiguieron estándares se cuantificaron con las curvas de compuestos relacionados químicamente: quercetina para dihidroflavonoles; quercetina 3-glucósido para quercetina 3-rhamnosido, glicósidos de miricetina y de kaempferol; ácido cafeico para los ácidos caftárico; *p*-cumárico y cutárico; y (+)-catequina para las diferentes procianidinas.

Las mediciones de las muestras de cada tratamiento, tanto para antocianos como para fenoles de bajo peso molecular, se realizaron utilizando solamente tres réplicas ($n=3$), seleccionadas al azar.

4.3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo en bloques completos al azar, con un arreglo factorial de tratamientos 2 x 2 utilizando el software Statgraphics Centurion XV versión 15.0.10 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). Los efectos del factor UV-B (P_{UV-B}), del factor ABA (P_{ABA}) y de su interacción ($P_{UV-B \times ABA}$) se determinaron a través de ANOVA multifactorial. El nivel de significancia utilizado para el análisis y la discusión de los resultados fue de $P \leq 0,10$.

4.4. Resultados

4.4.1. Crecimiento y contenido de azúcar de las bayas

El PF y contenido de azúcar de las bayas se incrementó desde 50 a 126 DDF, siguiendo una curva sigmoide típica, donde el inicio del envero (etapa 35; Coombe, 1995), con el 50% de las bayas coloreadas, ocurrió aproximadamente a los 72 DDF (**Figura 4.3 A y B**). +UV-B redujo el contenido de azúcar por baya cuando se combinó con +ABA (interacción entre UV-B y ABA con un nivel de significancia de $P=0,09$; **Figura 4.3 B**), e incrementó su concentración relativa ($^{\circ}$ Brix), independientemente de los tratamientos con ABA (**Figura 4.3 C**). El efecto en los contenidos de azúcar por baya empezó a los 92 DDF y fue mayor a cosecha, mientras que el efecto sobre la concentración fue visible en inicio del envero (72 DDF). La acumulación de azúcar fue 11% mayor por baya y 23,6% mayor en $^{\circ}$ Brix en el tratamiento combinado +UV-B/+ABA comparándolo con -UV-B/-ABA en el inicio del envero. Sin embargo, a cosecha +UV-B/+ABA fue 23,3% menor en azúcar por baya y similar en $^{\circ}$ Brix que -UV-B/-ABA.

La **Tabla 4.1** muestra que el crecimiento de las bayas (volumen, PF y PS de hollejo y pulpa) a cosecha fue reducido aditivamente por +UV-B y +ABA, mientras que el PS de las semillas disminuyó solo por +UV-B y la proporción entre PS de hollejos y PS de bayas no fue afectada por los tratamientos. +UV-B/+ABA produjo las bayas más chicas con una reducción del 32,5% en volumen, 22,1% en PF y 31% en PS, comparándolo con -UV-B/-ABA. La distribución general del PS de las bayas a cosecha fue: 27,9% hollejos, 60,9% pulpas y 11,2% semillas (**Figura 4.4**).

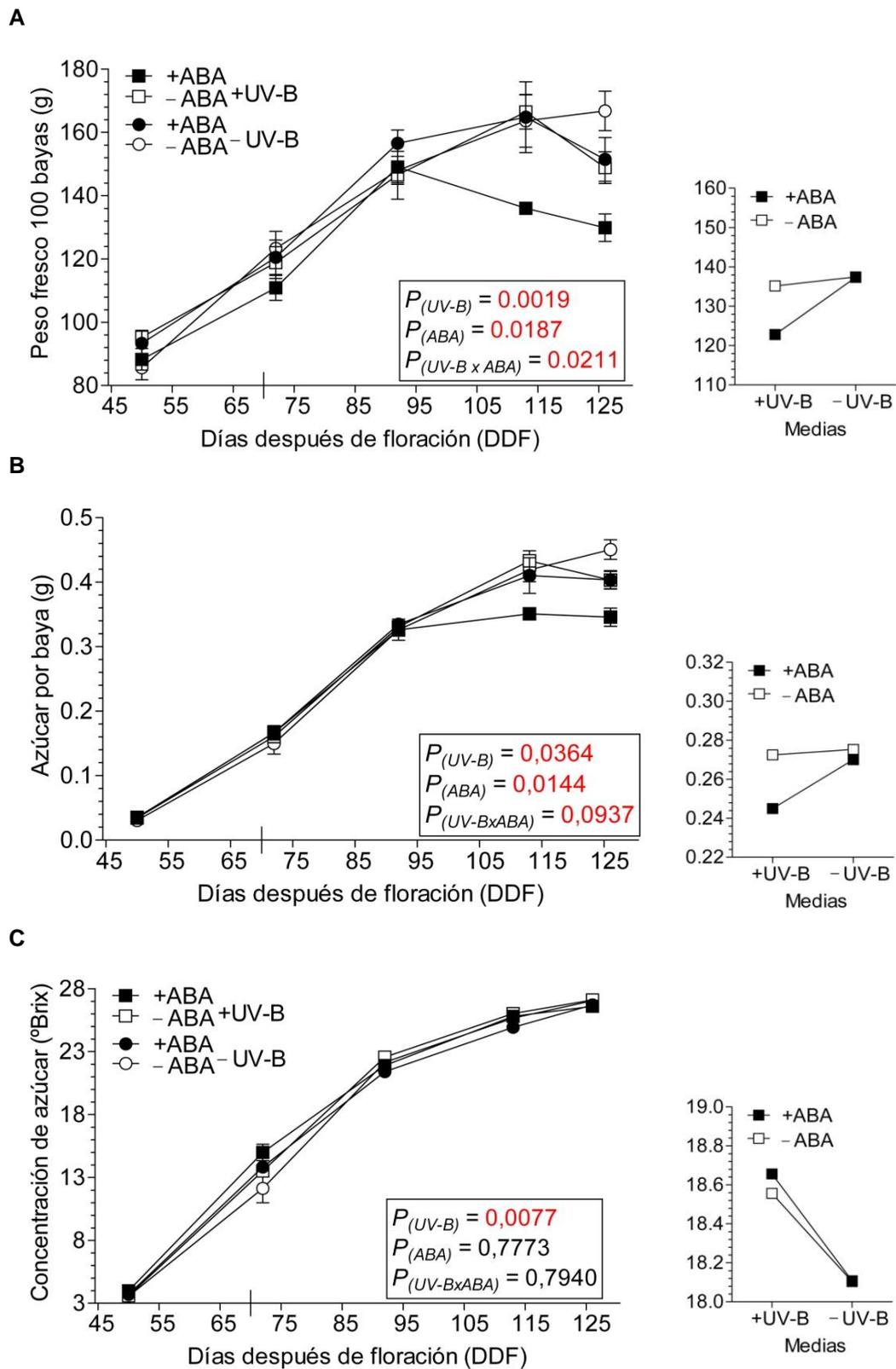


Figura 4.3 Peso fresco de 100 bayas (A), azúcar por baya (B) y °Brix (C), a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del envero se indica con una línea a los 70 DDF. Las figuras a la derecha son las medias generales de los tratamientos.

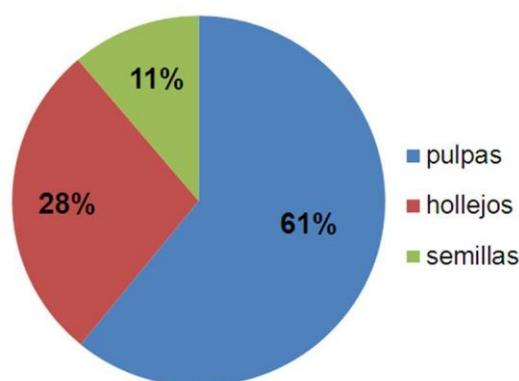


Figura 4.4 Distribución general del peso seco de las bayas (pulpas, hollejos y semillas) a cosecha.

Tabla 4.1 Volumen (mL), PF (mg) y PF (mg) por baya; PS por hollejo, pulpa y semillas de una baya (mg); y proporción de hollejo en el PS de las bayas (%), determinadas a los 126 DDF. Los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA y -ABA. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

Tratamientos		Volumen	PF	PS	PS hollejo	PS pulpa	PS semillas	hollejo baya
+UV-B	+ABA	1,1 \pm 0,0	1298,5 \pm 43,4	377,3 \pm 24,1	105,9 \pm 7,2	230,1 \pm 12,9	41,2 \pm 4,8	28.1 \pm 0.3
	-ABA	1,3 \pm 0,1	1488,4 \pm 50,1	442,3 \pm 25,7	120,7 \pm 6,6	276,4 \pm 14,9	45,3 \pm 5,0	27.3 \pm 0.5
-UV-B	+ABA	1,4 \pm 0,1	1514,5 \pm 69,3	456,1 \pm 18,9	132,1 \pm 3,8	268,0 \pm 14,3	55,9 \pm 3,4	29.1 \pm 1.1
	-ABA	1,6 \pm 0,1	1667,3 \pm 62,3	546,5 \pm 33,3	150,0 \pm 6,1	335,5 \pm 23,9	61,0 \pm 5,7	27.6 \pm 0.9
ANOVA								
$P_{(UV-B)}$		0,0010	0,0106	0,0049	0,0008	0,0188	0,0035	0,4263
$P_{(ABA)}$		0,0191	0,0222	0,0127	0,0224	0,0079	0,2951	0,2018
$P_{(UV-B \times ABA)}$		1,0000	0,7811	0,6415	0,8013	0,5641	0,9082	0,6538

4.4.2. Contenido de ABA en los hollejos

Los contenidos absolutos de ABA en los hollejos de todos los tratamientos aumentaron 109,7% desde los 50 hasta los 72 DDF, 126,6% desde los 72 hasta los 92 DDF, donde alcanzaron los mayores niveles y posteriormente, disminuyeron hacia cosecha con un efecto positivo de la aplicación de ABA (**Figura 4.5**). +UV-B no tuvo efecto sobre los contenidos de ABA, no obstante +UV-B/+ABA fue 370, 56, 110,3 y 60,3% mayor que -UV-B/-ABA a los 50, 72, 92 y 126 DDF, respectivamente.

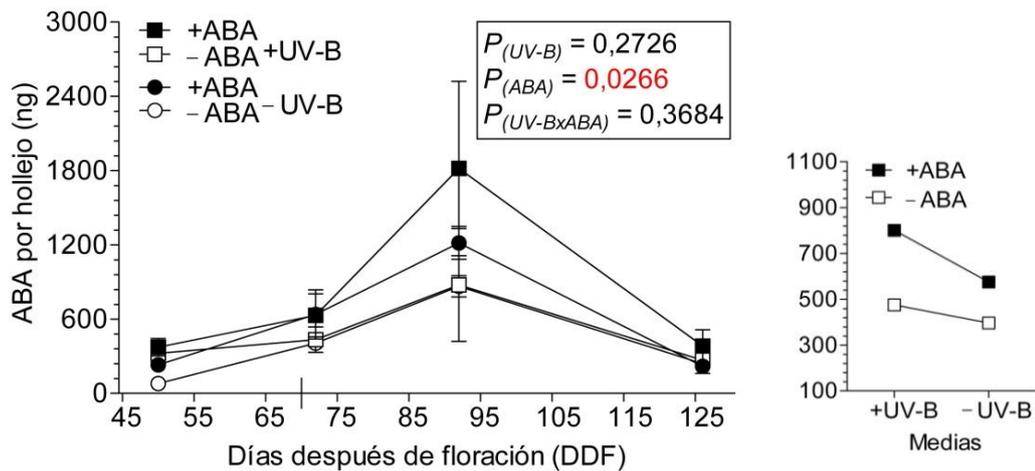


Figura 4.5 ABA por hollejo (ng), a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del invierno se indica con una línea a los 70 DDF. La figura a la derecha es las media general de los tratamientos.

4.4.3. Contenido y perfil de antocianos en los hollejos

Un perfil de antocianos característico de HPLC-DAD a cosecha es presentado en la **Figura A.8** (Ver anexo), y la distribución general de antocianos por acilación fue: 35,7% acilados (20,7% acetilados y 15% *p*-cumarilados) y 64,3% no-acilados (**Figura 4.6 A**); y por antocianidinas: 47,7% malvidina, 19% delphinidina, 18,2% petunidina, 12,4% peonidina y 2,8% cianidina (**Figura 4.6 B**).

El contenido total de antocianos siguió una curva sigmoide, con los mayores incrementos desde 72 a 92 DDF. +UV-B y +ABA aumentaron aditivamente los contenidos, manteniendo las diferencias hasta cosecha. +UV-B/+ABA tuvo 96,8 y 29,7% más antocianos totales que -UV-B/-ABA a 72 y 126 DDF, respectivamente (**Figura 4.7**).

Las antocianidinas fueron diferencialmente afectadas por UV-B y ABA. +UV-B incrementó todas las antocianidinas, tanto aciladas como no aciladas, mientras que +ABA solamente aumentó el total de no aciladas, delphinidina, cianidina, petunidina y peonidina. En +UV-B/+ABA, comparado con -UV-B/-ABA en cosecha, la cianidina fue la que más aumentó (110%), mientras que delphinidina, petunidina y peonidina aumentaron aproximadamente un 50% y la malvidina solamente un 10%. Consecuentemente, +UV-B y +ABA redujeron aditivamente la abundancia relativa de las antocianinas trihidroxiladas (petunidina, delphinidina y malvidina) y +ABA disminuyó la proporción de las antocianidinas metoxiladas (peonidina, petunidina y malvidina; **Tabla 4.2**).

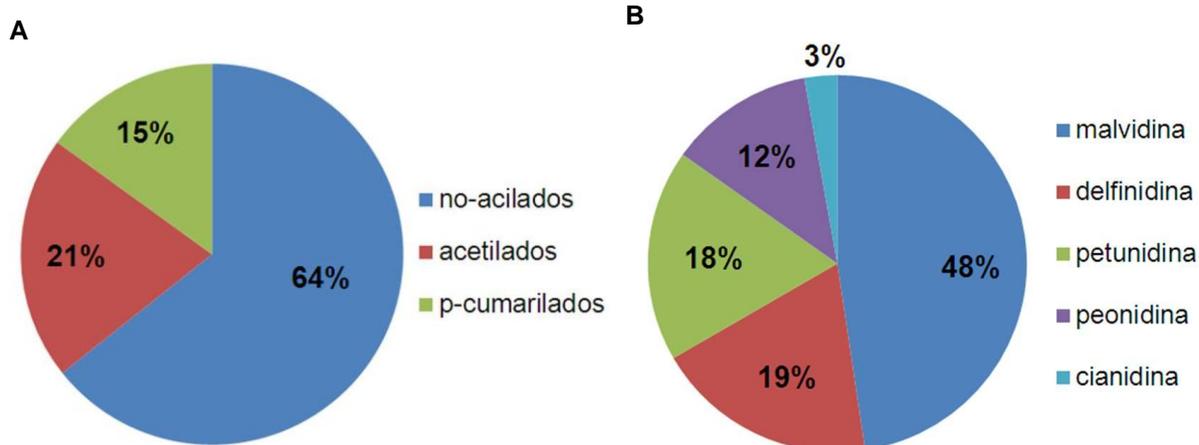


Figura 4.6 Distribución general de las antocianinas por acilación: no-acilados, acetilados y *p*-cumarilados (A) y por antocianidinas: malvidina, delfinidina, petunidina, peonidina y cianidina (B) a en los hollejos de las bayas a cosecha.

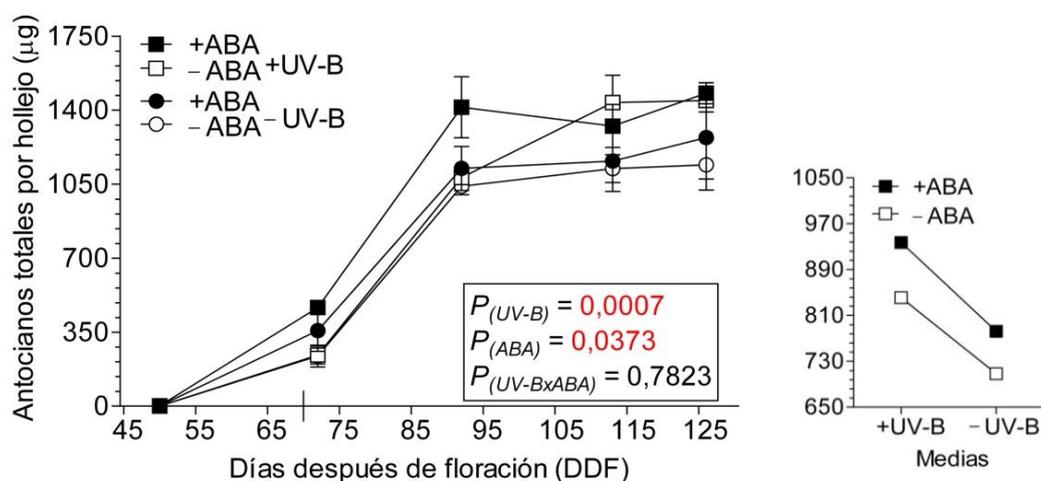


Figura 4.7 Antocianos totales por hollejo (μg), a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del envero se indica con una línea a los 70 DDF. La figura a la derecha es la media general de los tratamientos.

Tabla 4.2 Diferentes antocianos por hollejo (μg) y abundancia relativa de antocianos trihidroxilados y metoxilados (%), a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA y -ABA. $P_{(\text{UV-B})}$: efecto del factor UV-B; $P_{(\text{ABA})}$: efecto del factor ABA; $P_{(\text{UV-B}\times\text{ABA})}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

Compuestos	DDF	+UV-B		-UV-B		$P_{(\text{UV-B})}$	$P_{(\text{ABA})}$	$P_{(\text{UV-B}\times\text{ABA})}$
		+ABA	-ABA	+ABA	-ABA			
No Acilados	50	1,2 \pm 0,3	0,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2			
	72	353,6 \pm 15,4	185,0 \pm 31,3	265,7 \pm 72,0	183,2 \pm 41,4			
	92	935,4 \pm 128,6	717,4 \pm 32,6	746,9 \pm 65,0	682,9 \pm 30,5	0,0003	0,0105	0,6934
	113	875,3 \pm 61,5	916,6 \pm 78,6	747,4 \pm 78,4	722,9 \pm 60,8			
	126	965,0 \pm 48,9	924,1 \pm 15,2	829,7 \pm 113,7	714,9 \pm 72,7			
Acetilados	50	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0			
	72	72,2 \pm 4,7	38,2 \pm 7,9	61,7 \pm 16,8	37,1 \pm 7,1			
	92	299,0 \pm 31,6	231,3 \pm 8,2	241,3 \pm 26,2	221,7 \pm 13,5	0,0081	0,1561	0,9530
	113	267,1 \pm 31,5	302,2 \pm 30,1	243,5 \pm 37,8	235,3 \pm 6,6			
	126	303,1 \pm 9,9	297,4 \pm 17,2	259,0 \pm 52,4	244,9 \pm 25,7			
<i>p</i> -cumarilados	50	0,1 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0			
	72	40,4 \pm 4,4	19,0 \pm 3,2	29,8 \pm 9,5	16,6 \pm 3,1			
	92	179,4 \pm 16,1	132,4 \pm 1,4	136,0 \pm 13,7	135,1 \pm 9,7	0,0148	0,6080	0,9540
	113	182,6 \pm 27,5	217,2 \pm 22,6	168,7 \pm 27,7	165,0 \pm 2,1			
	126	212,1 \pm 30,7	224,1 \pm 24,0	181,0 \pm 33,9	181,5 \pm 22,5			
Delfinidinas	50	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0			
	72	90,8 \pm 5,0	44,1 \pm 8,6	66,2 \pm 19,1	43,5 \pm 10,2			
	92	303,0 \pm 54,0	224,3 \pm 12,1	237,3 \pm 26,4	204,0 \pm 15,0	0,0004	0,0359	0,8505
	113	261,9 \pm 22,6	284,8 \pm 35,8	209,9 \pm 26,9	203,3 \pm 28,0			
	126	287,1 \pm 19,9	290,5 \pm 9,8	245,7 \pm 48,7	190,1 \pm 28,9			
Cianidinas	50	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0			
	72	19,2 \pm 3,5	9,1 \pm 2,0	13,2 \pm 3,2	8,5 \pm 2,3			
	92	55,2 \pm 17,8	33,1 \pm 0,9	29,1 \pm 4,4	23,8 \pm 3,4	0,0001	0,0052	0,3736
	113	46,5 \pm 11,2	42,5 \pm 4,3	29,9 \pm 4,9	26,8 \pm 5,1			
	126	49,8 \pm 10,0	38,2 \pm 3,9	35,8 \pm 7,5	23,6 \pm 3,5			
Petunidinas	50	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0			
	72	86,1 \pm 2,6	44,2 \pm 8,2	66,4 \pm 19,5	43,2 \pm 9,4			
	92	271,0 \pm 39,7	214,8 \pm 9,5	219,7 \pm 23,3	198,3 \pm 10,8	0,0006	0,0386	0,9364
	113	244,6 \pm 21,5	264,4 \pm 27,7	207,5 \pm 26,4	201,2 \pm 18,0			
	126	272,0 \pm 14,3	267,5 \pm 4,3	234,6 \pm 40,8	196,1 \pm 23,4			
Peonidinas	50	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0			
	72	63,6 \pm 5,6	31,0 \pm 5,7	46,4 \pm 13,5	29,3 \pm 7,1			
	92	197,1 \pm 30,5	115,5 \pm 22,2	134,6 \pm 18,8	116,6 \pm 9,6	0,0002	0,0081	0,3947
	113	181,4 \pm 19,8	180,7 \pm 24,8	132,8 \pm 20,9	125,4 \pm 14,5			
	126	200,7 \pm 15,9	184,3 \pm 6,6	152,0 \pm 30,4	125,6 \pm 15,2			
Malvidinas	50	0,8 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1			
	72	206,4 \pm 7,4	113,9 \pm 18,0	165,2 \pm 42,8	112,3 \pm 22,7			
	92	587,5 \pm 6,2	493,2 \pm 6,3	503,5 \pm 31,9	497,1 \pm 19,4	0,0258	0,2348	0,7437
	113	590,6 \pm 46,1	663,5 \pm 42,7	579,5 \pm 64,8	566,7 \pm 7,4			
	126	670,5 \pm 48,1	665,1 \pm 38,5	601,7 \pm 72,1	605,9 \pm 48,5			
Trijidroxilados abundancia relativa	50	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0	100,0 \pm 0,0			
	72	82,3 \pm 1,6	83,6 \pm 0,5	83,4 \pm 0,3	84,3 \pm 0,6			
	92	82,5 \pm 1,5	86,3 \pm 1,8	85,6 \pm 0,7	86,5 \pm 0,7	0,0001	0,0013	0,2360
	113	82,9 \pm 1,4	84,6 \pm 0,6	86,1 \pm 0,5	86,6 \pm 0,9			
	126	83,1 \pm 1,4	84,6 \pm 0,4	85,4 \pm 0,6	87,0 \pm 0,2			
Metoxilados abundancia relativa	50	82,3 \pm 1,7	85,9 \pm 6,8	79,4 \pm 1,7	85,1 \pm 2,2			
	72	76,5 \pm 1,3	78,3 \pm 0,8	77,9 \pm 0,5	78,3 \pm 0,7			
	92	75,1 \pm 2,3	76,2 \pm 1,1	76,4 \pm 0,6	78,1 \pm 1,3	0,1949	0,0302	0,5740
	113	76,8 \pm 1,4	77,3 \pm 1,2	79,4 \pm 0,3	79,7 \pm 1,7			
	126	77,3 \pm 1,7	77,2 \pm 0,5	78,1 \pm 1,4	81,4 \pm 0,8			

4.4.4. Contenido y perfil de fenoles de bajo peso molecular en hollejos

Un perfil de fenoles de bajo peso molecular representativo de HPLC-DAD a cosecha se muestra en la **Figura A.9** (Ver anexo). El perfil cambió marcadamente desde los 50 hasta los 126 DDF: los flavonoles, dihidroflavonoles y ácidos hidroxibenzoicos representaron el 40,5, 13,5 y 0,4% del total a los 50 DDF, mientras que a 126 DDF aumentaron al 50,9, 31,8 y 3,2%, respectivamente. Los flavanoles y los ácidos hidroxicinámicos disminuyeron desde 35,6 y 10,0% al 10,4 y 3,6% del total, respectivamente (**Figura 4.8 A y B**).

Los fenoles de bajo peso molecular totales siguieron una curva sigmoide con el mayor incremento desde 50 hasta 92 DDF y +UV-B aumentó sus contenidos, manteniendo las diferencias hasta cosecha. +ABA no tuvo efectos en los contenidos totales, pero +UV-B/+ABA fue 75,0 y 40,9% mayor que -UV-B/-ABA a los 72 y 126 DDF, respectivamente (**Figura 4.9**). +UV-B aumentó los contenidos totales de todos los subgrupos, mientras que +ABA incrementó solamente el total de flavonoles (con un nivel de significancia de $P=0,08$; **Tabla 4.3**). Específicamente, +UV-B incrementó todos los flavonoles detectados (la **Figura 4.10 A, B y C** muestra la acumulación de los flavonoles más abundantes: glucósidos de quercetina, miricetina y kaempferol). +UV-B también aumentó los flavanoles: (+)-catequina y procianidina B3 (**Figura 4.11 A y B**), los ácidos hidroxibenzoicos: gálico, protocatequico y vanílico (**Figura 4.12 A, B y C**) y los dihidroflavonoles detectados (**Figura 4.13**). +UV-B no afectó el contenido del ácido hidroxibenzoico más abundante, el ácido siríngico (dato no presentado), ni el de los principales ácidos hidroxicinámicos, los ácidos cafeico y cutárico (**Figura 4.14 A y B**).

+ABA aumentó específicamente los glucósidos de quercetina y kaempferol (**Figura 4.10 A y C**), ácido gálico y protocatequico (**Figura 4.12 A y B**), y uno de los dihidroflavonoles detectados (pico 16 del cromatograma mostrado en la **Figura A.9**). La abundancia relativa de los flavonoles fue incrementada por +UV-B y +ABA, haciendo que +UV-B/+ABA fuera un 23,9% mayor que -UV-B/-ABA a cosecha (**Tabla 4.3**).

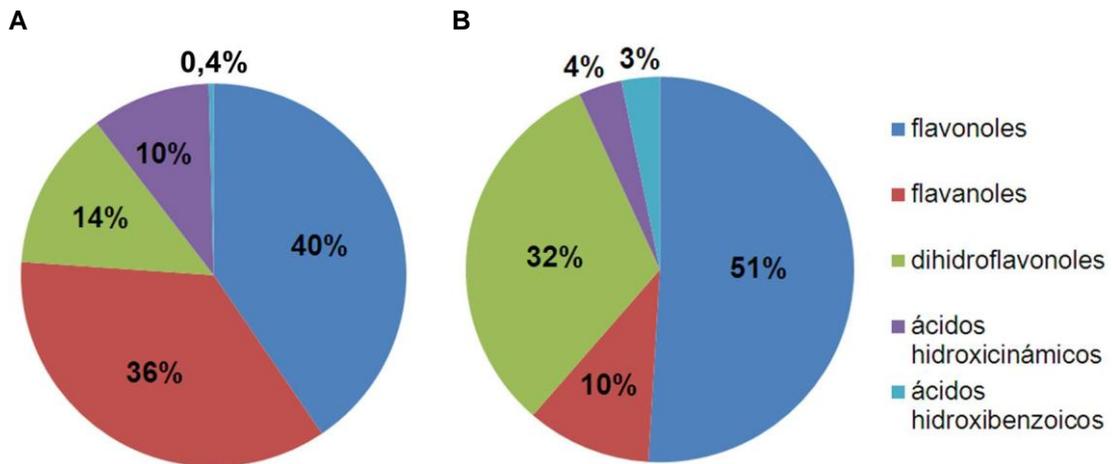


Figura 4.8 Distribución los fenoles de bajo peso molecular (flavonoles, flavanoles, dihidroflavonoles, ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos) en los hollejos de las bayas a los 50 DDF (A) y a los 126 DDF (B).

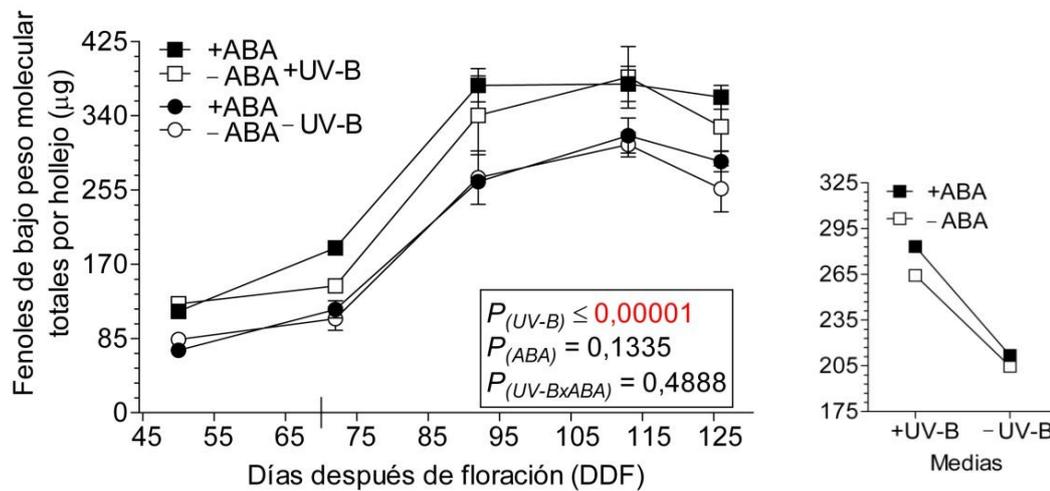


Figura 4.9 Fenoles de bajo peso molecular totales por hollejo (μg), a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del envero se indica con una línea a los 70 DDF. La figura a la derecha es la media general de los tratamientos.

Tabla 4.3 Fenoles de bajo peso molecular por hollejo (μg) y abundancia relativa de flavonoles (%), a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA y -ABA. $P_{(\text{UV-B})}$: efecto del factor UV-B; $P_{(\text{ABA})}$: efecto del factor ABA; $P_{(\text{UV-B}\times\text{ABA})}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM.

Compuestos	DDF	+UV-B		-UV-B		$P_{(\text{UV-B})}$	$P_{(\text{ABA})}$	$P_{(\text{UV-B}\times\text{ABA})}$
		+ABA	-ABA	+ABA	-ABA			
Flavonoles	50	50,0 \pm 6,7	54,6 \pm 3,3	31,6 \pm 3,6	26,0 \pm 1,1			
	72	120,8 \pm 3,2	84,9 \pm 3,3	68,6 \pm 7,9	62,9 \pm 10,5			
	92	233,4 \pm 17,5	203,2 \pm 37,2	146,9 \pm 8,3	159,5 \pm 25,9	0,00001	0,0789	0,3883
	113	202,2 \pm 11,5	214,0 \pm 25,0	162,6 \pm 13,3	148,8 \pm 16,1			
	126	207,7 \pm 9,8	165,3 \pm 19,0	139,6 \pm 12,3	120,1 \pm 18,4			
Dihidroflavonoles	50	13,0 \pm 1,1	16,2 \pm 1,5	11,5 \pm 1,0	11,5 \pm 0,8			
	72	42,4 \pm 1,7	34,5 \pm 1,2	25,9 \pm 1,0	24,1 \pm 3,4			
	92	89,9 \pm 2,0	81,6 \pm 4,6	68,2 \pm 6,2	64,5 \pm 2,9	0,00001	0,5450	0,6208
	113	109,7 \pm 3,4	109,5 \pm 6,3	95,7 \pm 8,0	95,9 \pm 2,3			
	126	95,7 \pm 1,7	107,8 \pm 5,2	95,0 \pm 6,4	89,4 \pm 6,9			
Flavonoles	50	42,8 \pm 7,6	40,0 \pm 12,5	21,4 \pm 4,3	36,4 \pm 3,7			
	72	17,1 \pm 1,8	19,3 \pm 1,5	17,7 \pm 2,7	15,7 \pm 0,9			
	92	32,7 \pm 4,1	37,4 \pm 4,9	34,2 \pm 1,7	30,2 \pm 2,6	0,0160	0,8728	0,6798
	113	40,5 \pm 6,2	40,7 \pm 4,6	35,9 \pm 2,2	41,4 \pm 2,5			
	126	39,8 \pm 2,1	32,8 \pm 5,9	32,5 \pm 4,3	24,2 \pm 1,3			
Ácidos Hidroxicinámicos	50	9,9 \pm 0,3	13,5 \pm 0,3	6,6 \pm 0,1	9,7 \pm 0,9			
	72	3,8 \pm 0,1	3,0 \pm 0,6	2,7 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3			
	92	9,7 \pm 0,9	9,0 \pm 0,1	8,0 \pm 1,4	7,6 \pm 1,0	0,0978	0,4396	0,8618
	113	12,3 \pm 0,3	10,8 \pm 0,7	12,8 \pm 1,2	10,8 \pm 1,5			
	126	9,2 \pm 0,6	11,2 \pm 1,7	11,0 \pm 1,6	12,3 \pm 1,5			
Ácidos Hidroxi benzoicos	50	0,3 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1			
	72	4,4 \pm 0,3	3,4 \pm 0,4	3,4 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2			
	92	9,1 \pm 0,7	9,2 \pm 0,5	7,3 \pm 0,9	7,3 \pm 0,6	0,0571	0,4466	0,6907
	113	11,4 \pm 0,2	9,1 \pm 0,5	10,2 \pm 0,9	9,9 \pm 0,3			
	126	8,7 \pm 0,6	10,3 \pm 0,3	9,6 \pm 0,8	10,2 \pm 0,9			
Flavonoles abundancia relativa	50	43.1 \pm 5.2	44.4 \pm 5.7	44.5 \pm 4.0	31.2 \pm 1.5			
	72	64.1 \pm 0.7	58.5 \pm 1.1	57.7 \pm 2.0	57.8 \pm 2.2			
	92	62.1 \pm 1.6	59.0 \pm 3.1	55.5 \pm 2.7	58.5 \pm 3.6	0,0005	0,0370	0,8673
	113	53.7 \pm 0.2	55.5 \pm 1.5	51.2 \pm 1.7	48.2 \pm 3.1			
	126	57.5 \pm 0.7	50.2 \pm 1.6	48.4 \pm 2.9	46.4 \pm 2.7			

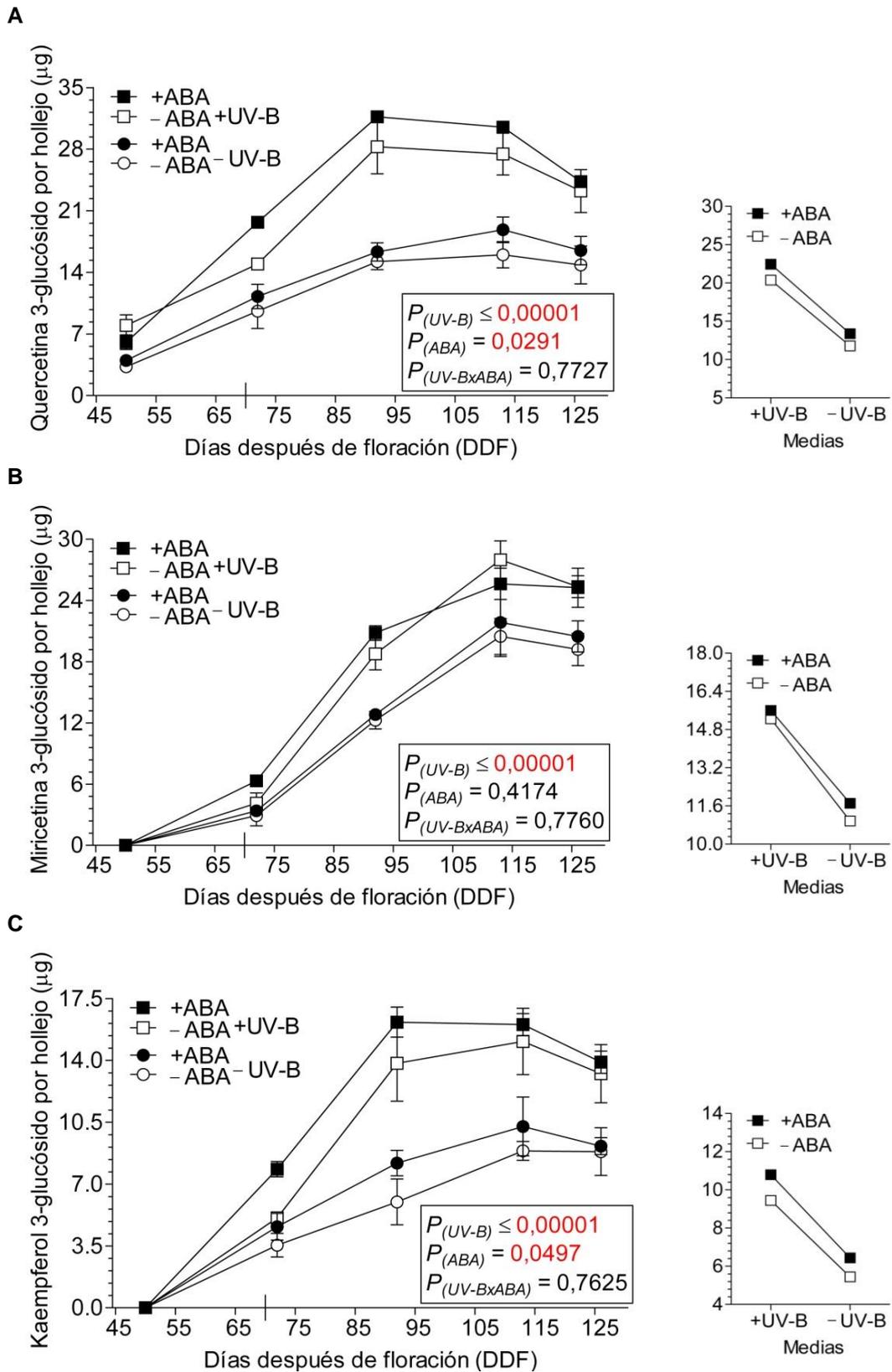


Figura 4.10 Flavonoles: glucósidos de quercetina (A), miricetina (B) y kaempferol (C) en μg por hollejo, a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del envero se indica con una línea a los 70 DDF. Las figuras a la derecha son las medias generales de los tratamientos.

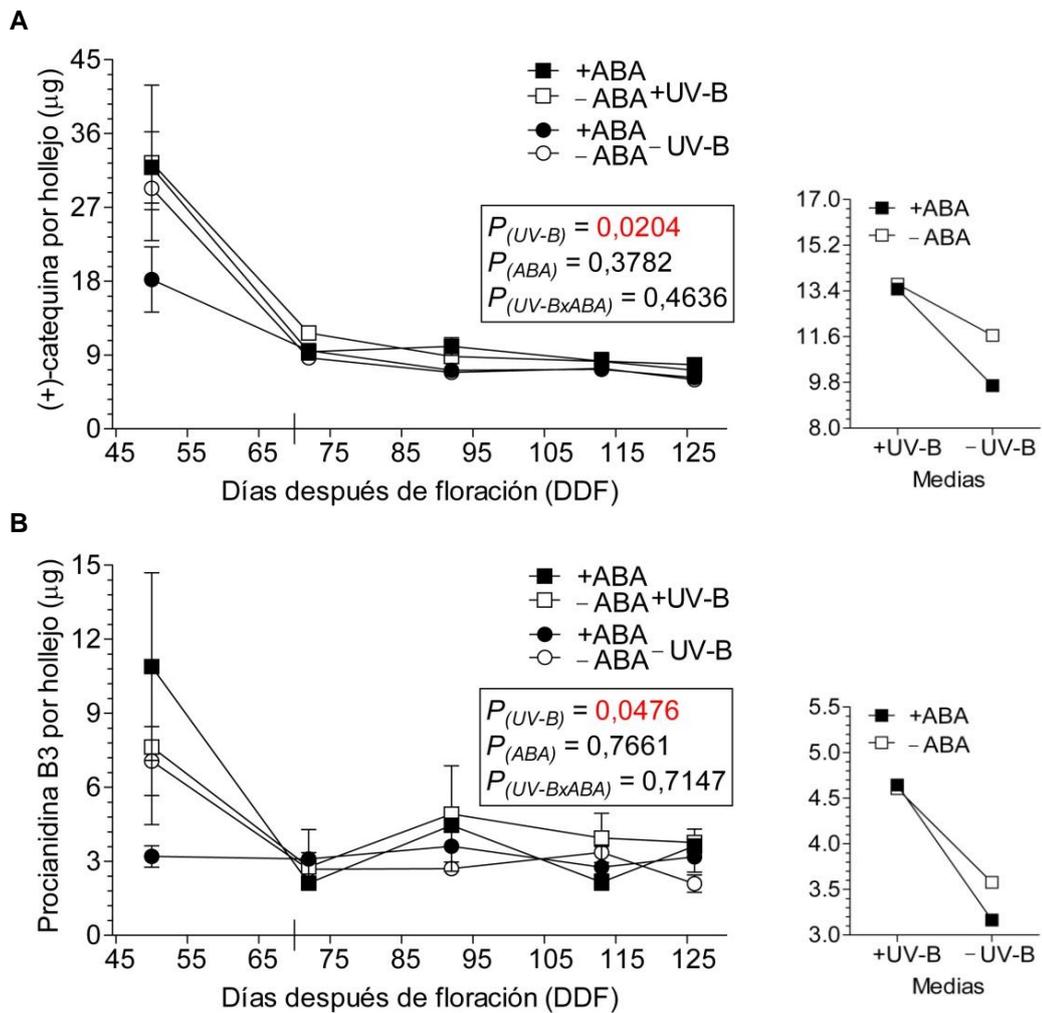


Figura 4.11 Flavanoles: (+)-catequina (**A**) y procianidina B3 (**B**) en μg por hollejo, a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del invierno se indica con una línea a los 70 DDF. Las figuras a la derecha son las medias generales de los tratamientos.

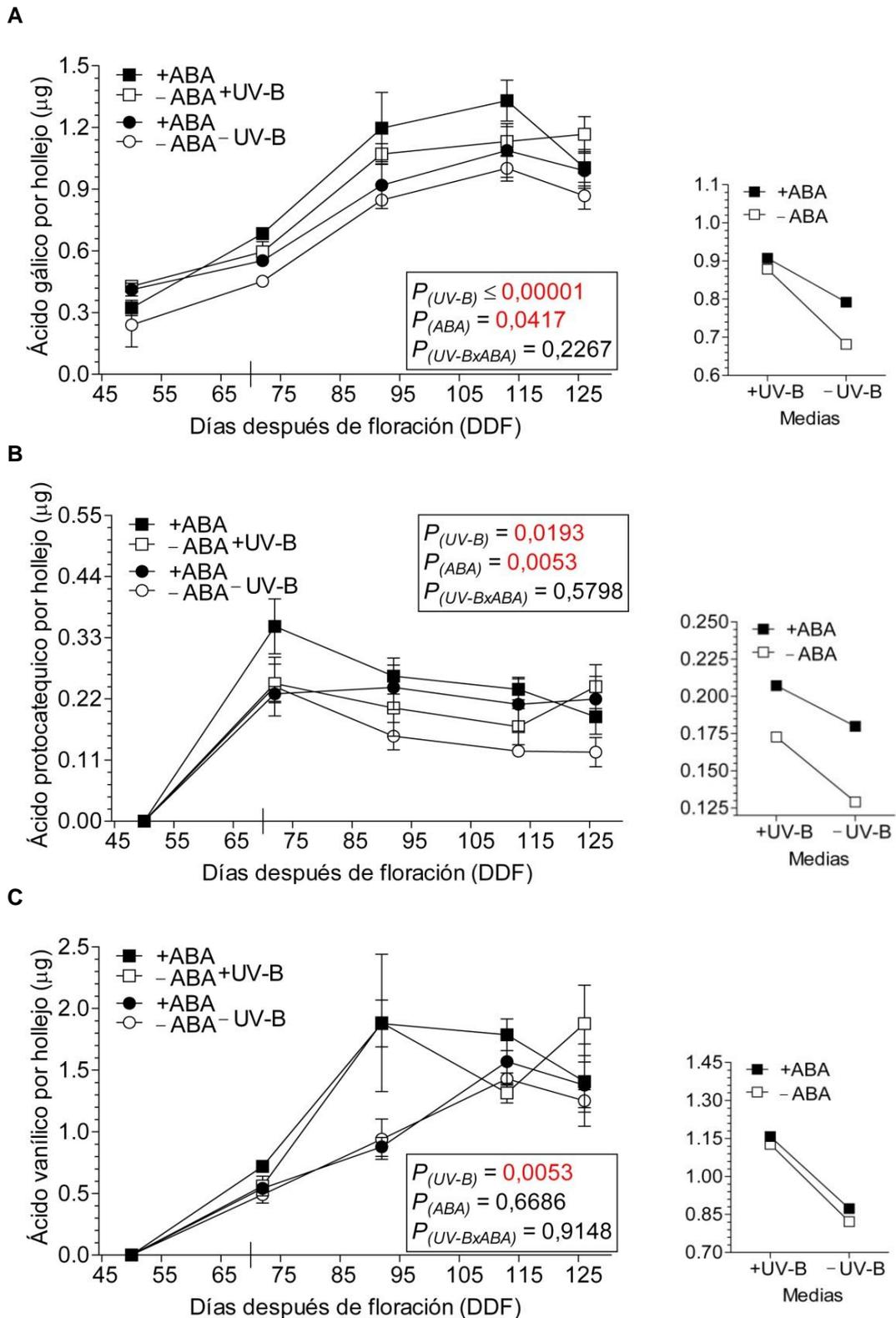


Figura 4.12 Ácidos hidroxibenzoicos: gálico (**A**), protocatequico (**B**) y vanílico (**C**) en μg por hollejo, a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del invierno se indica con una línea a los 70 DDF. Las figuras a la derecha son las medias generales de los tratamientos.

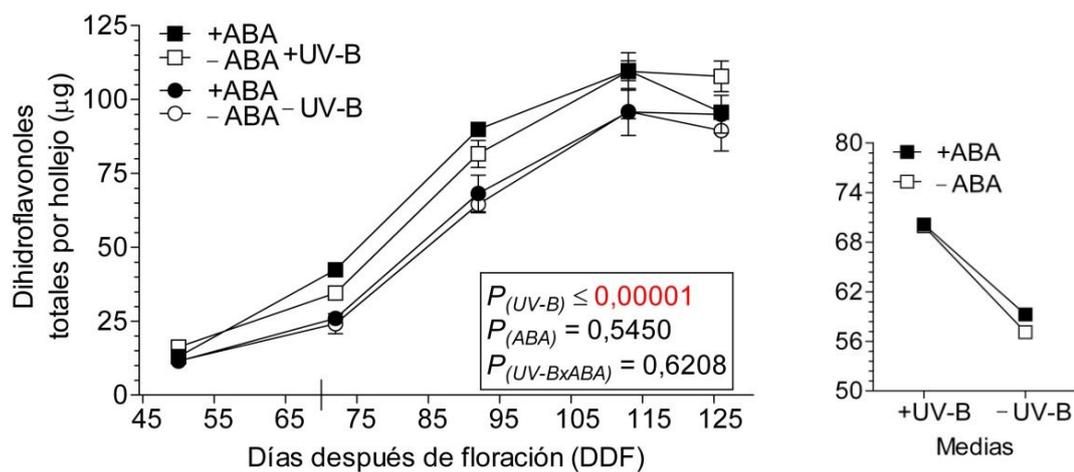


Figura 4.13 Dihidroflavonoles totales por hollejo (μg), a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del envero se indica con una línea a los 70 DDF. La figura a la derecha es la media general de los tratamientos.

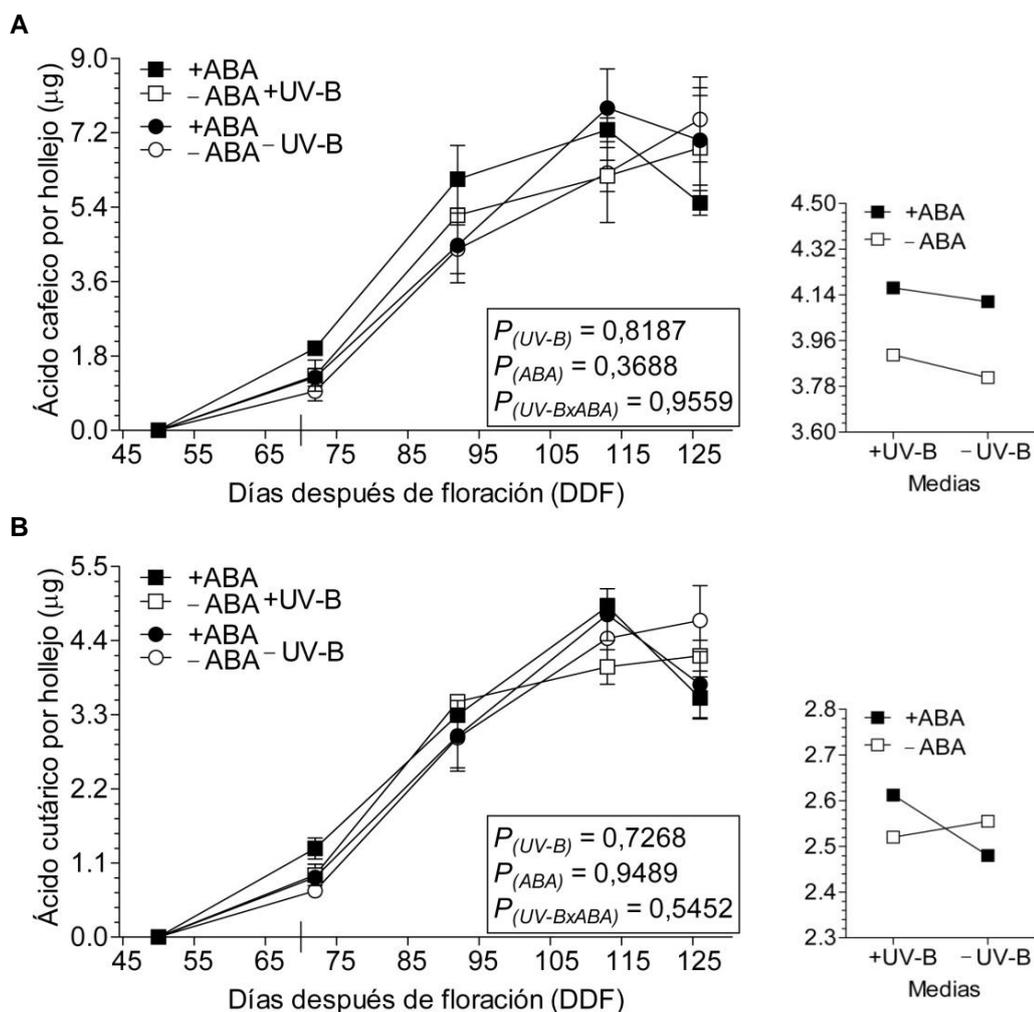


Figura 4.14 Ácidos hidroxicinámicos y sus derivados: cafeico (A) y cutárico (B) en μg por hollejo, a los 50, 72, 92, 113 y 126 DDF. Los tratamientos +UV-B (cuadrados) y -UV-B (círculos) se iniciaron 15 días antes de floración, mientras que +ABA (negro) y -ABA (blanco) se iniciaron a los 45 DDF. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-B x ABA. Los valores representan la media \pm SEM y el inicio del envero se indica con una línea a los 70 DDF. Las figuras a la derecha son las medias generales de los tratamientos.

4.5. Discusión

El tratamiento con la combinación +UV-B/+ABA, incrementó la carga de azúcar en las bayas hasta envero y afectó tanto los valores absolutos como los de concentración. En un ensayo previo de nuestro grupo de trabajo con plantas de vid cv. Malbec cultivadas en macetas +ABA también aumentó los monosacáridos (glucosa y fructosa) en las bayas y en las raíces en envero (Moreno *et al.*, 2010). A cosecha, los valores de azúcar por baya disminuyeron por una posible reducción en la carga de azúcar en las bayas, pero la concentración no se afectó debido a una reducción en el tamaño de las bayas. +UV-B/+ABA anticipó el inicio de la maduración, pero disminuyó el flujo de carbohidratos hacia las bayas y el crecimiento de las bayas después de 92 DDF. Algunos estudios han señalado que las aplicaciones de ABA pueden incrementar la acumulación de azúcar en las bayas (Hale y Coombe, 1974; Düring *et al.*, 1978; Matsushima *et al.*, 1989) promoviendo el crecimiento de las bayas (Peppi *et al.*,

2008; Wheeler *et al.*, 2009), debido a que ABA puede estimular la actividad de las invertasas ácidas (Pan *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 2010), la expresión de algunos transportadores de hexosas en vid (Çakir *et al.*, 2003; Conde *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2010) y la de las enzimas que modifican la pared celular (Koyama *et al.*, 2010). Otros autores han reportado que la maduración (Owen *et al.*, 2009) o el crecimiento de las bayas (Gagné *et al.*, 2006) no se ve afectado por +ABA. Las diferencias entre los diferentes estudios pueden deberse al momento de las aplicaciones con respecto al envero, un factor crítico en la determinación de sus efectos, y a las variedades utilizadas, ya que pueden haber diferencias genéticas en la sensibilidad a la fitohormona. Otros factores como las concentraciones, el número de aplicaciones utilizadas y el estadio fenológico considerado envero (por ejemplo, 50, 80 o 100% de bayas coloreadas) también podrían modificar los resultados y la interpretación de los mismos.

Las reducciones de crecimiento en las bayas, después de los 92 DDF en +UV-B/+ABA, pueden estar relacionadas con disminuciones en la elasticidad de las bayas. Gambetta *et al.* (2010) encontraron que los tratamientos +ABA en bayas de vid cultivadas *in vitro* disminuyeron la elasticidad de las paredes celulares y su crecimiento. Las bayas de +UV-B/+ABA podrían haber alcanzado este límite más temprano debido al adelanto de la maduración inducido por el ABA (el hecho que a los 72 DDF los contenidos sean mayores en este tratamiento posiblemente se deba a un adelantamiento del inicio del envero). Giribaldi *et al.* (2010) reportaron que +ABA puede promover una mayor degradación de las invertasas vacuolares, que juegan un papel fundamental en la acumulación de hexosas en las bayas. Esto también podría estar ocurriendo y explicaría la reducción de crecimiento y la menor acumulación de azúcar obtenidas después de los 92 DDF. Los flavonoides quercetina y kaempferol también podrían estar influyendo en los niveles de auxinas en las bayas, ya que actúan como inhibidores de su transporte (Jacobs y Rubery, 1988). Una de las funciones de las auxinas es aumentar la extensibilidad de las paredes celulares (Lüthen *et al.*, 1990), y los mayores contenidos de flavonoles en el tratamiento +UV-B/+ABA podrían estar interfiriendo con el movimiento de auxinas, extensibilidad de las paredes celulares y crecimiento de bayas.

A pesar de que el ingreso del ABA a las bayas a través de una cutícula cerosa parece ser un proceso ineficiente ya que actúa como una barrera estructural efectiva (Casado y Heredia, 1999), y que el ABA puede ser rápidamente metabolizado por las enzimas de los tejidos vegetativos (Feurtado *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2008), los niveles de ABA fueron incrementados en los hollejos de +ABA.

A diferencia de la hipótesis planteada en este trabajo, +UV-B no afectó los niveles de ABA en los hollejos de las bayas, aunque +UV-B/+ABA produjo los mayores contenidos de ABA durante todo el desarrollo de las bayas. En el experimento previo con las hojas de Malbec de las plantas cultivadas en macetas descrito en el **Capítulo 3**, los niveles de ABA se

incrementaron 2,7 veces por +UV-B y 12,5 veces en +UV-B/+ABA (Berli *et al.*, 2010), indicando que las hojas posiblemente son más sensibles (incrementando los niveles de ABA) que los hollejos de las bayas frente al UV-B. También se podría pensar que las intensidades y dosis de UV-B en las bayas fueron menores por dos motivos: las bayas tienen menos exposición solar que las hojas, y son probablemente menos transparentes al UV-B debido a la gran acumulación de compuestos que absorben UV-B.

El ABA aumentó gradualmente antes del inicio del envero y rápidamente una vez que empezó la maduración hasta los 92 DDF y, posteriormente, disminuyó hacia cosecha hasta valores comparativamente bajos, indicando posiblemente que juega un papel en el control de la maduración de las bayas. En otro experimento con plantas de Cabernet Sauvignon a campo, los niveles de ABA también se incrementaron durante el envero, alcanzando los niveles máximos aproximadamente dos semanas después del inicio de la maduración y luego el ABA también declinó a niveles bajos (Wheeler *et al.*, 2009). Muchos autores han demostrado que los niveles de ABA en las bayas de vid incrementan alrededor de envero, aunque el momento de estos aumentos en relación con este estadio a veces varía (Coombe y Hale, 1973; Hale y Coombe, 1974; Inaba *et al.*, 1976; Scienza *et al.*, 1978; Cawthon y Morris, 1982; Kataoka *et al.*, 1982; Davies *et al.*, 1997; Kondo y Kawai, 1998; Baigorri *et al.*, 2001; Antolín *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Okamoto *et al.*, 2004; Gagné *et al.*, 2006; Lacampagne *et al.*, 2010).

La mayoría del conocimiento sobre el inicio de los procesos de maduración proviene de trabajos con frutos climatéricos donde el control es predominantemente llevado a cabo por la fitohormona etileno. Sin embargo, muchos frutos como la vid no son climatéricos y los procesos que controlan el inicio de la maduración todavía son poco comprendidos (Gambetta *et al.*, 2010). No se conoce si el aumento del ABA es una consecuencia del inicio de la maduración debido al estrés causado por el rápido incremento en los niveles de azúcar en las bayas (aumenta mucho la presión osmótica y disminuye el potencial agua), o si es parte de los mecanismos esenciales para controlar su inicio. Sin embargo, el ABA parece ser uno de los disparadores de la maduración ya que +ABA en preenvero posiblemente produjo un adelantamiento de la misma (los contenidos son mayores a los 72 DDF). Deluc *et al.* (2009) encontraron que la abundancia de transcritos de la dioxigenasa 9-*cis*-epoxicarotenoide (NCED1) fue incrementada significativamente una semana después del inicio del envero en bayas de Cabernet Sauvignon y propusieron que la biosíntesis de ABA en las bayas es regulada primariamente por este gen y no por el ABA transportado a las bayas desde otros tejidos como las hojas y las raíces.

Los antocianos juegan un papel importante en la reproducción de las plantas, atrayendo polinizadores y dispersores de semillas (Saito y Harborne, 1992; Harborne y Williams, 2000; Grotewold, 2006), produciendo un alto contraste entre los frutos y el follaje (Burns y Dalen, 2002), además de proveer protección contra la radiación UV-B solar junto con otros

flavonoides (Solovchenko y Schmitz-Eiberger, 2003). Los resultados muestran un efecto positivo de los tratamientos +UV-B y +ABA en la acumulación de antocianos, incrementando los contenidos y manteniendo las diferencias hasta cosecha. El efecto con +ABA también fue obtenido por muchos autores (Hale y Coombe, 1974; Pirie y Mullins, 1976; Düring *et al.*, 1978; Kataoka *et al.*, 1982; Matsushima *et al.*, 1989; Yakushiji *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2005; Gagné *et al.*, 2006; Cantín *et al.*, 2007; Peppi *et al.*, 2007; Peppi y Fidelibus, 2008; Owen *et al.*, 2009) y puede ser explicado por una activación de las enzimas que participan en rutas biosintéticas de los fenilpropanoides y de los flavonoides (**Figura 1.4**; Ban *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004), con un pico de actividad durante envero (Hiratsuka *et al.*, 2001). También se han encontrado que +ABA aumenta la expresión de los genes involucrados en la acilación y el transporte de antocianos a las vacuolas de las células de los hollejos (Fujita *et al.*, 2007; Koyama *et al.*, 2010). +UV-B también aumenta la expresión de las enzimas CHS y PAL en hojas de vid (Schultz *et al.*, 1998; Pontin *et al.*, 2010). Otros autores reportaron mayores concentraciones de antocianos totales en bayas de Syrah expuestas al sol, al compararlas con frutas sombreadas, pero esas diferencias se produjeron y mantuvieron durante poco tiempo después de envero y desaparecieron hacia cosecha (Haselgrove *et al.*, 2000). Esto último puede ser causado por la elevación de la temperatura que se produce por las altas intensidades de luz, limitando la acumulación de antocianos, posiblemente por una disminución de la biosíntesis y/o un aumento en la degradación (Spayd *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2007). En el experimento realizado sin embargo, la temperatura no tuvo efecto en los tratamientos ya que los efectos se restringieron a UV-B, y los efectos sobre los fenoles se mantuvieron hasta cosecha.

Durante todo el período de maduración, los antocianos no acilados fueron el grupo más abundante al compararlo con las formas aciladas, y la malvidina fue la antocianidina más abundante, al igual que en otras variedades de vid (Castellarin y Di Gaspero, 2007). El predominio de los antocianos trihidroxilados está asociado con una mayor relación de transcritos de la enzima flavonoide 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H), comparados con los de la enzima flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H). También se observó mayor actividad y niveles de transcritos de la enzima O-metiltransferasa (OMT) en bayas que acumulan predominantemente formas de antocianos metoxilados (Castellarin y Di Gaspero, 2007; Castellarin *et al.*, 2007).

Los antocianos aparecieron aproximadamente hace 120 millones de años (Stafford, 1991) y muchas especies, incluyendo a la vid, adquirieron posteriormente la capacidad de sintetizar los pigmentos antocianos azulados con un mayor número de grupos substituidos y grupos metoxilados en el núcleo flavano. De acuerdo con este punto de vista, el gen que codifica para F3'H, la enzima que conduce a la formación de antocianos rojos es más antiguo que el gen que codifica para F3'5'H, la enzima que convierte a los antocianos rojos en azules. Si los niveles de UV-B que recibía la vegetación en ese momento eran considerablemente

superiores a los que se reciben en la actualidad, es esperable que los mecanismos de protección y sus correspondientes rutas de señalización hayan evolucionado y por lo tanto deben estar presentes en todas las plantas terrestres.

Aunque el perfil de antocianos es una característica principalmente genética y las proporciones de las cinco antocianidinas parecen ser propias de cada variedad (Castellarin *et al.*, 2006), en el experimento, +UV-B y +ABA redujeron aditivamente la proporción de antocianos trihidroxilados, y +ABA también redujo la proporción de antocianos metoxilados. Se propone que F3'H fue relativamente más activo en +UV-B y +ABA que F3'5'H, mientras que la actividad de OMT fue reducida en +ABA. Otros investigadores también demostraron cambios adaptativos en la composición de los perfiles de antocianos, por ejemplo, los frutos expuestos al sol redujeron la proporción de antocianos trihidroxilados al compararlos con los frutos a la sombra (Spayd *et al.*, 2002; Downey *et al.*, 2004; Ristic *et al.*, 2007; Tarara *et al.*, 2008). Además, Bindon *et al.* (2008) demostraron que el grado de hidroxilación y de metoxilación de las antocianinas en las bayas de vid también puede ser alterado por cambios en el estado hídrico de las plantas.

La hidroxilación, la metoxilación y la glicosilación de las antocianinas modula sus propiedades antioxidantes. Las antocianinas trihidroxiladas y metoxiladas son más estables a la oxidación y tienen menos capacidad antioxidante (Sroka, 2005). Wang *et al.* (1997) analizaron la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, oxygen radical absorbance capacity) de las distintas antocianidinas y encontraron que el glucósido de cianidina tenía la mayor capacidad, mientras que el de la malvidina tenía la menor. En este experimento, los antocianos totales fueron incrementados aditivamente por +UV-B y +ABA, pero la cianidina fue la que más aumentó con la combinación de estos tratamientos. Bindon *et al.* (2008) encontraron un incremento en delphinidina, cianidina, petunidina y peonidina; y una reducción de la proporción de antocianinas metoxiladas en respuesta al desecamiento parcial de raíces (PRD, partial root drying). El PRD es una práctica de manejo que mantiene relativamente altos niveles de ABA en el flujo xilemático (Stoll *et al.*, 2000).

La radiación solar UV-B incrementó los fenoles de bajo peso molecular, manteniendo las diferencias hasta cosecha, mientras que las aplicaciones de ABA afectaron específicamente algunos compuestos, principalmente flavonoles ($P=0,08$) y ácidos hidroxibenzoicos como el protocatequico y vanílico. La abundancia relativa de los flavonoles fue incrementada por +UV-B y +ABA, posiblemente porque la enzima flavonol sintasa (FLS) fue relativamente más activa ante estas condiciones que otras enzimas de ruta biosintética de los flavonoides (**Figura 1.4**).

En el trabajo previo con hojas de vid cv. Malbec (**Capítulo 3**), la quercetina y el kaempferol también fueron incrementados por +UV-B y +ABA más que los otros fenoles. Otros autores también encontraron un aumento en la síntesis de quercetina y kaempferol en hojas de vid (Kolb *et al.*, 2001) y de flavonoides totales en bayas de vid (Schultz, 2000) expuestas a UV-

B. Los flavonoides tienen una estructura polifenólica, contienen numerosos dobles enlaces y grupos hidroxilo que pueden donar electrones mediante resonancia para estabilizar los radicales libres, y por lo tanto actúan como poderosos antioxidantes protegiendo contra el estrés oxidativo (Machlin y Bendich, 1987). Iacopini *et al.* (2008) encontraron que la quercetina es el fenol con mayor capacidad antioxidante.

Los flavonoles fueron el grupo más abundante durante las diferentes etapas de la maduración de las bayas, mientras que en otro experimento con vinos del cv. Malbec, el grupo más abundante lo constituyeron los flavanoles (Fanzone *et al.*, 2010). El hecho de que en este experimento con hollejos los flavanoles representaron solamente el 10,4% del total a cosecha, puede deberse a que los flavanoles estuvieron mayoritariamente polimerizados y no fueron extraídos y/o detectados por la técnica utilizada. Lacampagne *et al.* (2010) encontraron que los monómeros de catequina presentes en los hollejos son hasta 250 veces menos abundantes que las formas polimerizadas (por ejemplo taninos) y que la epicatequina también se encuentra mayoritariamente polimerizada (Xie *et al.*, 2004).

Los flavanoles se acumulan principalmente antes de envero y posteriormente sus contenidos disminuyen hacia cosecha, principalmente por polimerización y reducción de su extractabilidad (Czochanska *et al.*, 1979; Cheynier *et al.*, 1997; Saint-Cricq De Gaulejac *et al.*, 1997; De Freitas y Glories, 1999; Kennedy *et al.*, 2001; Downey *et al.*, 2003). +UV-B produjo los mayores contenidos de flavanoles y +ABA no afectó la disminución de estos compuestos durante la maduración, en correspondencia con lo que encontraron Koyama *et al.* (2010).

Los dihidroflavonoles son precursores directos de los flavonoles (Bogs *et al.*, 2005) y sus concentraciones relativas elevadas en el cv. Malbec pueden estar relacionadas con una menor actividad de la enzima FLS en esta variedad, como fue propuesto por Fanzone *et al.* (2010). Posiblemente su actividad sea relativamente baja en Malbec (las concentraciones de dihidroflavonoles en esta variedad son altas), independientemente de los efectos observados producidos por UV-B y ABA. Un dihidroflavonol fue el compuesto más abundante, como en otros experimentos con vinos del cv. Malbec (Fanzone *et al.*, 2010) y con hollejos de variedades blancas (Masa y Vilanova, 2008). En este experimento, los dihidroflavonoles no pudieron ser caracterizados por falta de estándares.

No se identificaron estilbenos, posiblemente porque no se extrajeron y/o detectaron con la técnica utilizada en este ensayo, y este resultado fue inesperado porque en un trabajo previo con determinaciones utilizando electroforesis capilar de zona (CZE, capillary zone electrophoresis) en los extractos de los hollejos, se encontró que el resveratrol fue incrementado por +UV-B (Berli *et al.*, 2008).

4.6. Conclusiones

Confrontado los resultados con las hipótesis iniciales, se encontró que la radiación solar UV-B en el viñedo de altura a 1.450 m de altitud no incrementó los niveles de ABA en los hollejos de las bayas del cv. Malbec, pero aumentó la biosíntesis de compuestos fenólicos como mecanismo de defensa, modificando el perfil de antocianos y de fenoles de bajo peso molecular. También el ABA afectó el crecimiento y la maduración de las bayas, posiblemente regulando el inicio de la acumulación de azúcar y de la biosíntesis de compuestos fenólicos (principalmente antocianos y flavonoles). Los contenidos de ABA en los hollejos de las bayas aumentaron desde el inicio del envero (50% de bayas coloreadas) hasta 20 días después (100% bayas coloreadas) y posteriormente disminuyeron hacia cosecha. Finalmente, las aplicaciones de ABA no produjeron el mismo efecto que +UV-B, posiblemente porque la señalización de UV-B no está solamente mediada por ABA y otros factores están involucrados.

Los tratamientos +UV-B y +ABA aumentaron la acumulación de azúcar y compuestos fenólicos en envero (posiblemente anticiparon el inicio de la maduración) y posteriormente disminuyeron el crecimiento de las bayas y los contenidos de azúcar por baya, sin afectar la concentración a cosecha. La mayoría de los compuestos fenólicos en los hollejos de las bayas fueron incrementados por +UV-B, con un aumento adicional cuando se combinó con aplicaciones de ABA y las diferencias se mantuvieron hasta cosecha. +UV-B y +ABA modificaron los perfiles de antocianos y de fenoles de bajo peso molecular, aumentando la proporción de aquellos con mayor capacidad antioxidante.

Con los resultados de este capítulo se escribió un artículo que ha sido publicado en el *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Berli *et al.*, 2011).

5. **CAPÍTULO 5: Efectos de UV-B, ABA, su interacción, la temporada y el momento de desarrollo de las bayas sobre la calidad enológica del cv. Malbec**

5.1. **Hipótesis**

Algunas de las variables que afectan el crecimiento, desarrollo y calidad enológica del cv. Malbec se ven afectadas por la radiación UV-B que perciben a 1.450 m de altitud en Mendoza, y por las aplicaciones de ABA. Estos efectos dependen de las diferentes temporadas de cultivo y de los momentos del desarrollo de las bayas. Las plantas frente a las señales de estrés desencadenan respuestas fisiológicas y bioquímicas que afectan el crecimiento de las bayas (rendimiento cuantitativo), pero mejoran la calidad enológica de las bayas. El ABA es la fitohormona que señala y media las respuestas de la planta a UV-B, y con aplicaciones de ABA se pueden obtener efectos similares a los que se obtienen con altos niveles de UV-B solar, actuando como señal para acumular compuestos fenólicos.

5.2. **Objetivos específicos**

Estudiar los efectos de la radiación UV-B que reciben las plantas de vid cv. Malbec a 1.450 m de altitud en Mendoza, del ABA, de su interacción, de las diferentes temporadas de cultivo y momentos del desarrollo de las bayas, sobre:

-el crecimiento de las bayas.

-la acumulación de azúcar en las bayas.

-el contenido de compuestos fenólicos (antocianos y polifenoles) en los hollejos.

Estudiar cómo las temperaturas medias, máximas y mínimas, la amplitud térmica, y la humedad atmosférica durante las diferentes temporadas se correlacionan con el crecimiento, desarrollo y calidad enológica de las bayas del cv. Malbec.

5.3. **Materiales y métodos**

5.3.1. **Material vegetal y diseño experimental**

El experimento se llevó a cabo durante las temporadas 2006-2007 (2007), 2007-2008 (2008), 2008-2009 (2009) y 2009-2010 (2010) utilizando el mismo viñedo, plantas, diseño y unidad experimental descriptos en el **Capítulo 4**.

5.3.2. **Tratamientos**

Se establecieron dos regímenes de radiación (+UV-B y -UV-B) desde 30 DDF hasta cosecha (2007 y 2008) y desde 15 días antes de floración hasta cosecha (2009 y 2010), combinados con dos tratamientos hormonales (+ABA y -ABA) desde 45 DDF hasta cosecha (2007, 2008, 2009 y 2010), utilizando el mismo sistema experimental descrito en el **Capítulo 4**.

El adelanto, y por lo tanto la extensión del periodo durante el cual las plantas fueron ensayadas durante 2009 y 2010, tuvo como objetivo afectar aspectos relacionados al desarrollo y maduración de las bayas desde un momento fenológico más temprano.

5.3.3. Muestreo de bayas y determinaciones de peso, contenido de azúcar, antocianos y polifenoles

Se muestrearon las bayas en cinco momentos del desarrollo de las mismas (72, 82, 92, 113 y 126 DDF) y se determinó su PF y contenido de azúcar en valores absolutos y de concentración (n=5), para diferenciar los efectos sobre el transporte y la acumulación, de los efectos indirectos que se pueden producir por los cambios en el tamaño de las bayas. Se utilizó la misma metodología descrita en el **Capítulo 4**. Estos momentos de muestreo no fueron exactos en todas las temporadas (± 5 días).

Se realizó la extracción de los compuestos fenólicos de los hollejos, utilizando una solución hidroalcohólica siguiendo la técnica descrita en el **Capítulo 4**. Con el extracto de hollejos se determinó espectrofotométricamente el contenido de antocianos y de polifenoles totales (n=5), siguiendo el método de (Riou y Asselin, 1996), con un equipo UV-Visible modelo Cary 50 (Varian Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.).

Para determinar el contenido de antocianos totales, la solución de extracción de hollejos se descongeló, se diluyó 1: 50 con H₂O bidestilada y acidificada (1% HCl), y se midió la absorbancia a 520 nm de longitud de onda, contra un blanco de reactivo con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Para determinar el contenido de polifenoles totales, la solución de extracción se diluyó 1: 100 con H₂O bidestilada (pH 7,0) y se midió la absorbancia a 280 nm de longitud de onda, contra un blanco de reactivo con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

La **Figura A.10** (Ver anexo) muestra el espectro de absorbancia de los compuestos fenólicos extraídos con la solución hidroalcohólica con el máximo de absorbancia a 280 nm y 520 nm de longitud de onda, para calcular el contenido de polifenoles totales y de antocianos, respectivamente.

Los contenidos de antocianos y polifenoles totales (índice de polifenoles totales; IPT) fueron calculados en valores absolutos (absol) y de concentración (conc), teniendo en cuenta los contenidos por hollejo y por PF de bayas, respectivamente. Esto se realizó para diferenciar los efectos sobre la biosíntesis y la acumulación, de los efectos indirectos que se pueden producir por los cambios en el tamaño de las bayas (**Ecuación A.6**; Ver anexo).

5.3.4. Datos meteorológicos

Se recolectaron los datos meteorológicos de las temporadas 2007, 2008, 2009 y 2010, durante los meses de noviembre-abril. Se analizaron las medias diarias de las temperaturas (medias, máximas y mínimas) y de la humedad atmosférica, registradas por una estación meteorológica automática (iMetos ag, modelo IMT 300, Pessl Instruments, Weiz, Austria), ubicada en Gualtallary (33°24'S, 69°16'O) a una distancia aproximada de 1.000 m del lugar de experimentación. La temperatura media del aire (T med), máxima (T máx), mínima (T

mín), la amplitud térmica (T amplitud), y la humedad relativa (HR), se midieron con los sensores Hygroclip 2 y PT100 Class A (Rotronic Instrument Corp., NY, EE.UU.).

5.3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo como bloques completos al azar con un arreglo factorial de tratamientos 2 x 2. Los efectos de UV-B (P_{UV-B}), de ABA (P_{ABA}), de su interacción ($P_{UV-B \times ABA}$), de la temporada ($P_{TEMPORADA}$) y del momento de desarrollo (P_{DDF}) se determinaron a través de ANOVA multifactorial y las diferencias entre las medias se analizaron con la prueba múltiple de Fisher y un nivel de significancia de $P \leq 0,10$; utilizando el software Statgraphics Centurion XV versión 15.0.10 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, EE.UU.). Se realizaron análisis multivariados de componentes principales (ACP) y gráficos *biplot*, utilizando como criterios de clasificación los tratamientos y las temporadas, con el software InfoStat versión 2009 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Los datos meteorológicos también se analizaron determinando los efectos de la temporada ($P_{TEMPORADA}$) y del mes de cultivo (P_{MES}) a través de ANOVA multifactorial y la prueba múltiple de Fisher ($P \leq 0,10$). También se realizaron ACP y gráficos *biplot*, teniendo como criterios de clasificación las temporadas y los meses de cultivo. Se utilizaron los mismos programas informáticos que se citan en el párrafo anterior.

5.4. Resultados

La **Tabla 5.1** muestra los efectos de la radiación UV-B, del ABA, de su interacción, de las diferentes temporadas de cultivo y de los diferentes momentos del desarrollo de las baya, sobre algunas de las variables que afectan la calidad enológica de las bayas. +UV-B afectó la mayoría de las variables analizadas, produciendo una disminución del tamaño de las bayas (5,2%) y del contenido de azúcar en valores absolutos (4,8%). +UV-B aumentó el contenido de antocianos y polifenoles totales en valores absolutos (8,6 y 6,7%) y en valores de concentración (16,4 y 16,3%), aumentando la concentración de azúcar ($P=0,06$). +ABA afectó el contenido de antocianos y polifenoles totales, produciendo un aumento en valores absolutos (7,6 y 4,5%) y de concentración (8,6 y 8,7%). También aumentó la concentración de azúcar ($P=0,09$). La interacción entre UV-B y ABA fue significativa para el contenido de antocianos totales (valores absolutos y de concentración) y para los polifenoles totales en concentración. +UV-B/+ABA fue 16,3, 25,4 y 25,4% mayor que -UV-B/-ABA para el contenido de antocianos en valores absolutos y de concentración, y para el contenido de polifenoles totales en valores de concentración, respectivamente. Un ejemplo de los racimos de los distintos tratamientos a los 113 DDF en 2009 se muestra en la **Figura 5.1 A, B, C y D**.

Las diferencias entre las temporadas fueron significativas para todas las variables. La temporada 2008 produjo las bayas más grandes y los menores contenidos de azúcar en

concentración por efecto de dilución al aumentar el tamaño de las bayas. También en 2008 se obtuvieron los menores contenidos de antocianos y polifenoles totales en valores de concentración. En la temporada 2009 se obtuvieron las bayas más pequeñas y los mayores contenidos de azúcar, antocianos y polifenoles totales (valores absolutos y de concentración).

Las diferencias entre los momentos de desarrollo fueron significativas para todas las variables, aumentando todas desde los 72 hasta los 126 DDF, excepto para el tamaño de bayas donde el máximo se alcanzó a los 113 DDF. Además, se observó que los antocianos y polifenoles totales en valores absolutos no son diferentes estadísticamente entre los 113 y 126 DDF.

El ACP y los gráficos *biplot* facilitan la interpretación de los efectos producidos por los distintos tratamientos y permiten observar cuáles variables están correlacionadas positiva o negativamente. La **Figura 5.2 A** muestra el ACP utilizando como criterio de clasificación los tratamientos. El componente principal (CP) 1 separa azúcar absol y PF bayas del resto de las variables, por lo tanto la mayor variabilidad (86,9%) entre los tratamientos se explica con estas variables. El CP 2 provee nueva información sobre variabilidad respecto a la provista por el CP1, es decir explica la variabilidad entre los tratamientos no explicada por el CP 1. En este caso la variabilidad explicada por el CP 2 es solamente del 12,6% (con el CP 1 y 2 se explica el 99,5% de la variabilidad). El tratamiento +UV-B/+ABA está más asociado al contenido de antocianos y polifenoles (absol y conc) y azúcar conc, mientras que los tratamientos con exclusión de UV-B (-UV-B) se asocian con azúcar absol y PF bayas. También se observa una alta correlación entre azúcar absol y PF bayas ($r^2=0,99$), y de azúcar conc con los antocianos y polifenoles (absol y conc) ($r^2\geq 0,98$).

La **Figura 5.2 B** muestra el ACP utilizando como criterio de clasificación las temporadas de cultivo. El CP 1 separa PF bayas del resto de las variables, explicando el 91,4% de la variabilidad entre las temporadas. El CP 2 separa PF bayas y azúcar absol del resto de las variables (7,9% de la variabilidad). Con el CP 1 y 2 se explica el 99,3% de la variabilidad. La temporada 2009 está más asociada al contenido de antocianos y polifenoles (absol y conc) y azúcar conc, mientras que la temporada 2008 se asocia con PF bayas. También se observa una alta correlación entre azúcar conc con los antocianos y polifenoles (absol y conc) ($r^2\geq 0,98$).

La **Tabla 5.2** muestra los datos meteorológicos de HR y temperaturas (medias, máximas, mínimas y amplitud térmica) para las distintas temporadas y meses de cultivo. Se observa que los efectos de la temporada y del mes de cultivo fueron significativos para todas las variables. La temporada 2009 tuvo la menor HR y las mayores temperaturas (T med, T máx, T mín y T amplitud), mientras que la temporada 2008 tuvo la mayor HR y las menores temperaturas. El mes más caluroso es enero, seguido por los meses diciembre y febrero, mientras que noviembre tiene las mayores amplitudes térmicas y marzo la mayor HR.

La **Figura 5.3 A** muestra el ACP utilizando como criterio de clasificación las temporadas. El CP 1 separa HR del resto de las variables (temperaturas), explicando el 95,5% de la variabilidad. El CP 2 explica solamente del 4,4% de la variabilidad (con el CP 1 y 2 se explica el 99,9% de la variabilidad). La temporada 2009 está más asociada con a las temperaturas (T med, T máx, T mín y T amplitud), mientras que la temporada 2008 está más asociada a la HR. También se observa una alta correlación entre T med y T máx ($r^2=0,99$).

La **Figura 5.3 B** muestra el ACP utilizando como criterio de clasificación los meses de cultivo. El CP 1 separa HR y T amplitud del resto de las variables (T med, T máx y T mín), explicando el 62,3% de la variabilidad entre los meses. El CP 2 separa HR de las T med, T máx y T mín, y a estas de la T amplitud (37,1% de la variabilidad). Con el CP 1 y 2 se explica el 99,4% de la variabilidad. Los meses de Enero, Diciembre y Febrero están asociados a las T max, Tmed y T mín; mientras que el mes de Noviembre se asocia a T amplitud y Marzo a HR.. También se observa una alta correlación entre T med, T máx y T mín ($r^2\geq 0,98$).

Tabla 5.1 Peso de las bayas, contenido de azúcar, antocianos y polifenoles en valores absolutos (absol) y de concentración (conc), a los 72, 82, 92, 113 y 126 DDF, en las temporadas 2007, 2008, 2009 y 2010. Los tratamientos +UV-B y -UV-B, combinados con +ABA y -ABA. $P_{(UV-B)}$: efecto del factor UV-B; $P_{(ABA)}$: efecto del factor ABA; $P_{(UV-B \times ABA)}$: efecto de la interacción UV-BxABA; $P_{(TEMPORADA)}$: efecto del factor temporada; $P_{(DDF)}$: efecto del factor momento de desarrollo. Los valores representan la media y letras diferentes indican diferencias significativas con un $P \leq 0,10$.

	PF bayas		Azúcar absol		Azúcar conc		Antocianos absol		Antocianos conc		Polifenoles absol		Polifenoles conc	
UV-B														
+UV-B	148,32	b	288,30	b	18,90		1042,16	a	67,85	a	69,79	a	67,83	a
-UV-B	156,46	a	302,93	a	18,65		960,04	b	58,31	b	65,38	b	58,31	b
ABA														
+ABA	152,98		296,47		18,89		1037,95	a	65,69	a	69,07	a	65,69	a
-ABA	151,80		294,76		18,66		964,25	b	60,47	b	66,09	b	60,45	b
Temporada														
2007	156,34	b	280,84	b	17,44	c	866,99	c	52,59	c	58,45	b	52,55	c
2008	166,12	a	299,35	a	16,79	d	847,01	c	45,85	d	58,00	b	45,85	d
2009	142,46	c	305,70	a	21,21	a	1215,90	a	84,03	a	78,44	a	84,03	a
2010	144,64	c	296,57	a	19,67	b	1074,51	b	69,84	b	75,44	a	69,84	b
DDF														
72	113,29	d	112,81	e	9,83	e	149,53	d	13,04	e	35,61	d	12,99	e
82	146,92	c	223,69	d	15,54	d	572,12	c	40,76	d	53,08	c	40,77	d
92	163,93	b	335,58	c	20,53	c	1166,54	b	72,01	c	73,32	b	72,01	c
113	169,06	a	393,35	b	23,36	b	1523,89	a	91,68	b	86,36	a	91,68	b
126	168,75	a	412,65	a	24,62	a	1593,42	a	97,90	a	89,56	a	97,90	a
UV-BxABA														
+UV-B/+ABA	148,49		289,28		19,09		1111,42		72,87		72,07		72,87	
+UV-B/-ABA	148,16		287,31		18,72		972,89		62,83		67,51		62,78	
-UV-B/+ABA	157,47		303,65		18,69		964,48		58,51		66,08		58,51	
-UV-B/-ABA	155,45		302,21		18,60		955,60		58,12		64,67		58,12	
ANOVA														
$P_{(UV-B)}$	0,00001		0,0002		0,0590		0,0005		0,00001		0,0007		0,00001	
$P_{(ABA)}$	0,4567		0,6673		0,0916		0,0019		0,0009		0,0214		0,0009	
$P_{(UV-B \times ABA)}$	0,5901		0,9462		0,3153		0,0062		0,0021		0,2233		0,0020	
$P_{(TEMPORADA)}$	0,00001		0,0002		0,0002		0,00001		0,00001		0,00001		0,00001	
$P_{(DDF)}$	0,00001		0,00001		0,00001		0,00001		0,00001		0,00001		0,00001	

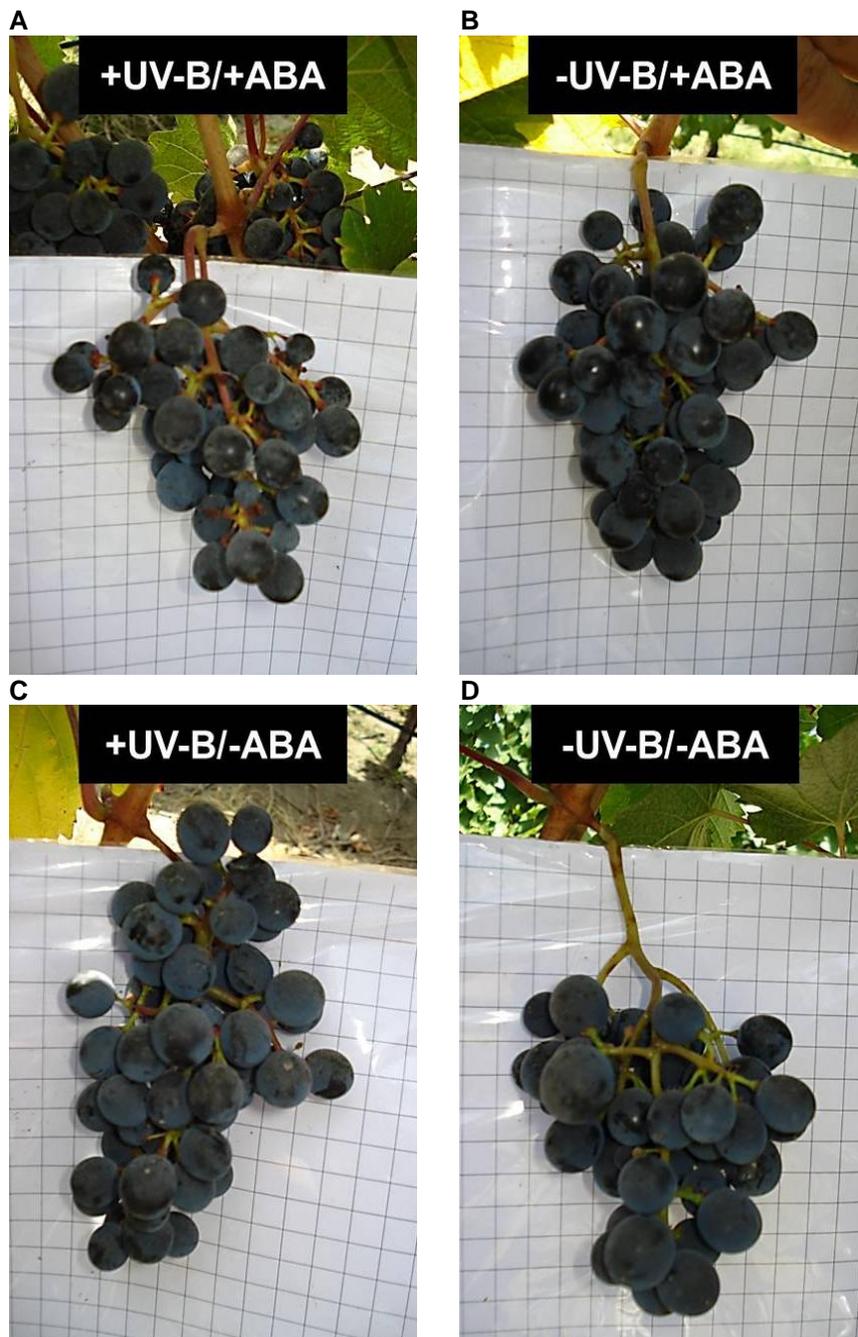


Figura 5.1 Racimos de los diferentes tratamientos a los 113 DDF en la temporada 2009: +UV-B/+ABA (A), -UV-B/+ABA (B), +UV-B/-ABA (C) y -UV-B/-ABA (D).

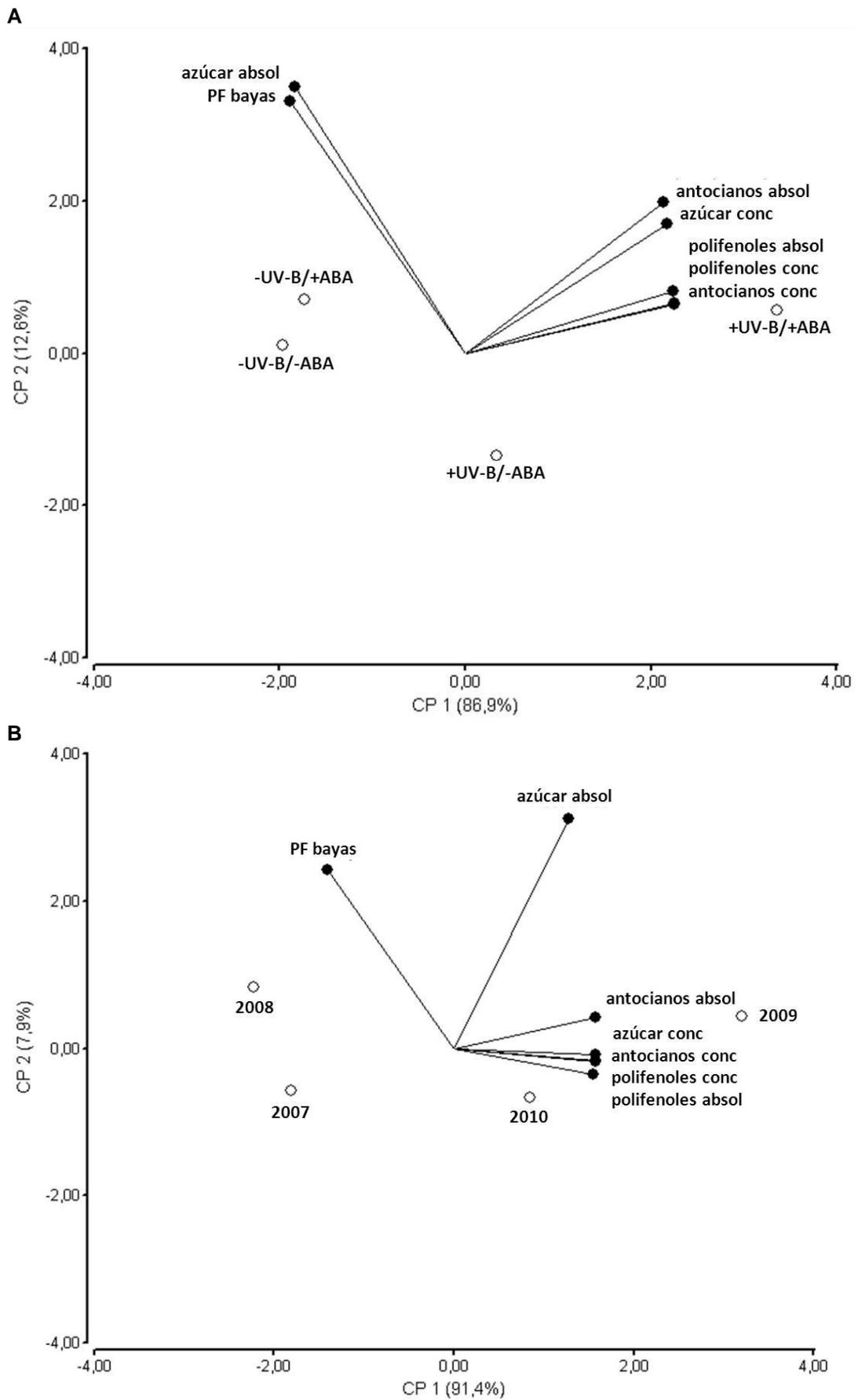


Figura 5.2 Gráficos *biplot* del análisis multivariado de componentes principales (ACP), utilizando como criterio de clasificación los tratamientos (**A**) y las temporadas de cultivo (**B**), sobre algunas de las variables que afectan la calidad enológica de las bayas.

Tabla 5.2 Datos meteorológicos: humedad relativa (HR), temperatura media (T med), temperatura máxima (T máx), temperatura mínima (T mín) y amplitud térmica (T amplitud), registrados en Gualtallary (33°24'S, 69°16'O) durante los meses de noviembre-abril, de las temporadas 2007, 2008, 2009 y 2010. $P_{(TEMPORADA)}$: efecto del factor temporada; $P_{(MES)}$: efecto del factor mes. Los valores representan la media y letras diferentes indican diferencias significativas con un $P \leq 0,10$.

	RH		T med		T máx		T mín		T amplitud	
Temporada										
2007	51,37	ab	17,74	bc	24,62	bc	10,81	b	13,81	ab
2008	53,47	a	17,20	c	23,91	c	10,50	b	13,41	b
2009	48,23	c	18,82	a	25,99	a	11,63	a	14,36	a
2010	48,70	bc	17,95	b	24,87	b	10,88	b	13,98	ab
Mes										
Nov	40,48	d	17,22	c	24,39	c	9,44	d	14,95	a
Dic	47,33	c	19,49	b	26,23	b	12,42	b	13,81	bc
Ene	48,25	c	20,74	a	27,69	a	13,69	a	14,00	b
Feb	52,05	b	19,46	b	26,35	b	12,82	b	13,53	bc
Mar	58,61	a	17,79	c	24,40	c	11,37	c	13,03	c
Abr	55,94	a	12,87	d	20,01	d	5,98	e	14,02	b
ANOVA										
$P_{(TEMPORADA)}$	0,0006		0,00001		0,00001		0,0038		0,0040	
$P_{(MES)}$	0,00001		0,00001		0,00001		0,00001		0,0005	

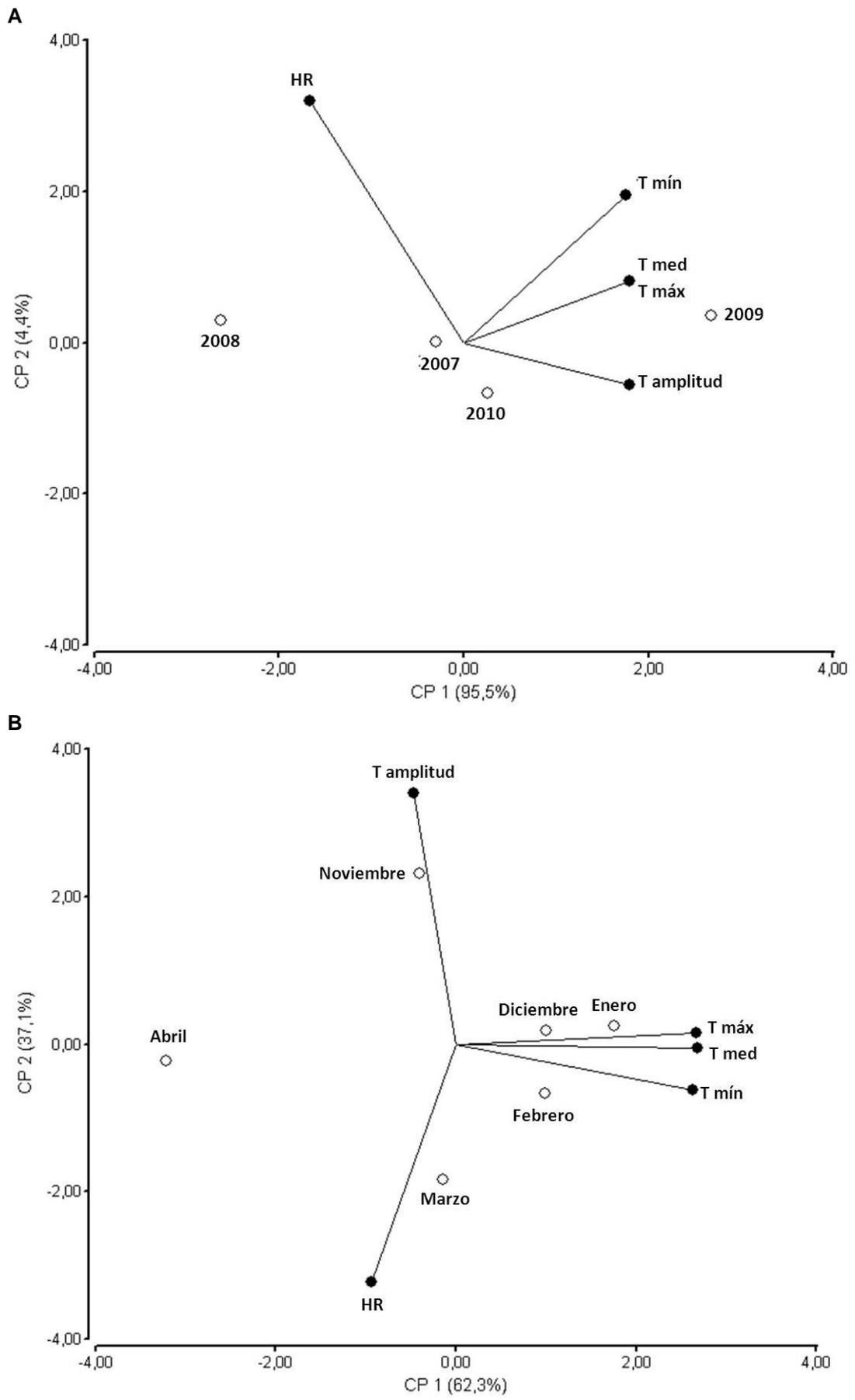


Figura 5.3 Gráficos *biplot* del análisis multivariado de componentes principales (ACP), utilizando como criterio de clasificación las temporadas (A) y los meses (B) de cultivo, sobre algunas variables meteorológicas.

5.5. Discusión

Cuando se analizaron las cuatro temporadas se utilizó un método de determinación de fenoles totales por espectrofotometría UV-Visible con mediciones a 280 nm (polifenoles totales) y a 520 nm (antocianos totales). Este método permite conocer solamente los contenidos totales de estos compuestos. En el **Capítulo 4** las determinaciones para la temporada 2009 se realizaron con un método de HPLC-DAD que permitió conocer cuáles son los compuestos que conforman los totales.

Los efectos de la radiación UV-B y de las aplicaciones de ABA, considerando las cuatro temporadas, fueron consistentes con los resultados obtenidos para la temporada 2009 (**Capítulo 4**). La radiación solar UV-B en el viñedo de altura y las aspersiones de ABA en vides cv. Malbec incrementaron la acumulación de azúcar y compuestos fenólicos totales desde enero (posiblemente adelantando el inicio de la maduración) y posteriormente, disminuyeron el crecimiento de las bayas y los contenidos de azúcar por baya sin afectar la concentración a cosecha. Los antocianos y polifenoles totales en los hollejos de las bayas fueron incrementados por +UV-B, con un incremento adicional cuando se combinó con aplicaciones de ABA, y las diferencias se mantuvieron hasta cosecha. Incluso se produjo una interacción entre UV-B y ABA para el contenido de antocianos totales y para los polifenoles totales, produciendo los máximos cuando se combinó +UV-B/+ABA.

Para el análisis del efecto entre las diferentes temporadas hay que tener en cuenta que los dos regímenes de radiación (+UV-B y -UV-B) se establecieron desde 30 DDF hasta cosecha (2007 y 2008) y desde 15 días antes de floración hasta cosecha (2009 y 2010), lo que significó 45 días más de tratamientos en las últimas dos temporadas. Estas diferencias experimentales no permiten hacer un análisis profundo respecto de su correlación con las características meteorológicas de cada temporada. Sin embargo, podemos comparar las diferencias observadas entre las temporadas 2009 y 2010. En 2009 se obtuvieron las bayas más chicas y los mayores contenidos de azúcar, antocianos y polifenoles totales, tanto en valores absolutos como de concentración. Estos resultados se corresponden con la temporada en que la HR fue menor y las temperaturas fueron mayores, condiciones meteorológicas que posiblemente aumentaron la situación de estrés general en las plantas. La temporada 2009 fue una de las mejores de los últimos años respecto a la calidad de los vinos tintos obtenidos (comunicación personal de Alejandro Vigil, Enólogo Jefe de la Bodega Catena Zapata, a FB).

Las temperaturas son más altas en los meses de diciembre-febrero, y en forma similar a lo que ocurre con los niveles de UV-B (**Capítulo 2**) coinciden con etapas fenológicas importantes en el desarrollo de las semillas y con el inicio de la maduración.

Las plantas del cv. Malbec en el viñedo de Gualtallary brotan en el mes de octubre y florecen a mediados de noviembre. Posteriormente los frutos cuajan, crecen y se desarrollan (división y expansión celular), manteniéndose verdes hasta febrero donde ocurre el envero (aparición

de color en las bayas, ablandamiento de las paredes celulares y el inicio de acumulación de azúcar). En este estadio fenológico las semillas ya están desarrolladas y aptas para germinar (madurez fisiológica). A partir de este momento, los hollejos y las pulpas crecen por expansión celular y continúan evolucionando durante varias semanas por un proceso de maduración similar a la senescencia (alteración de la pared celular y acumulación de metabolitos secundarios) hasta la cosecha (madurez comercial) a inicios de abril.

Es común que los tres parámetros climáticos principales (radiación, temperatura y humedad) varíen entre las diferentes temporadas de cultivo. Estos factores influyen en los procesos de maduración y por lo tanto se obtienen diferentes composiciones en las uvas, dependiendo de los años. Las correlaciones obtenidas entre las variables meteorológicas estudiadas y el crecimiento, desarrollo y calidad enológica del cv. Malbec, constituyen una fase preliminar para desarrollar modelos de predicción de calidad de cosecha. Por ejemplo, en temporadas donde se espere que la HR sea baja y las temperaturas sean mayores, posiblemente se obtengan bayas más chicas con altos contenidos de azúcar, antocianos y polifenoles totales, tanto en valores absolutos como de concentración.

5.6. Conclusiones

Confrontando los resultados obtenidos con las hipótesis iniciales la radiación solar UV-B en el viñedo de altura a 1.450 m de altitud incrementó los contenidos (valores absolutos y de concentración) de compuestos fenólicos en los hollejos de las bayas del cv. Malbec. Los tratamientos +UV-B y +ABA aumentaron la acumulación de azúcar y compuestos fenólicos totales desde el envero (posiblemente anticipando el inicio de la maduración) y posteriormente disminuyeron el crecimiento de las bayas y los contenidos de azúcar por baya, sin afectar la concentración a cosecha. Los antocianos y polifenoles totales en los hollejos de las bayas fueron incrementados por +UV-B, con un incremento adicional cuando se combinó con aplicaciones de ABA, y las diferencias se mantuvieron hasta cosecha. El ABA estaría involucrado en el control del crecimiento y de la maduración de las bayas, regulando el inicio de la acumulación de azúcar y de la biosíntesis de compuestos fenólicos, pero las aplicaciones de ABA no produjeron el mismo efecto que +UV-B, posiblemente porque la señalización de UV-B no está solamente mediada por ABA y otros factores están involucrados.

Los efectos dependen de las diferentes temporadas de cultivo, ya que variables meteorológicas son diferentes entre las temporadas, y de los momentos del desarrollo de las bayas. Las plantas frente a las señales de estrés desencadenan respuestas fisiológicas y bioquímicas que disminuyen el crecimiento (afectan el rendimiento cuantitativo), pero pueden mejorar la calidad de las bayas (principalmente por un aumento en el contenido de compuestos fenólicos). Sobre la base a este tipo de estudios se abre la posibilidad de desarrollar modelos de predicción de calidad de cosecha.

6. CONCLUSIONES FINALES

Confrontando los resultados con la hipótesis general, se observa que los niveles de UV-B solar que perciben las plantas en los viñedos de altura de Mendoza en verano al mediodía son relativamente altos, incrementan el contenido de MDA en hojas, lo que refleja que ocurre daño oxidativo, pero no se afecta la integridad de la membrana plasmática, ni se oxidan los pigmentos fotosintéticos en vides cv. Malbec. Las hojas y los hollejos responden a esta señal elevando los niveles de flavonoles y antocianos, compuestos fenólicos que tienen alta capacidad para filtrar parte de la radiación UV-B incidente, y de actuar como antioxidantes. En las hojas los niveles de ABA aumentan por UV-B y esta fitohormona está involucrada en las respuestas de protección a UV-B, activando los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En los hollejos el ABA estaría involucrado en el control del crecimiento y de la maduración de las bayas, regulando la acumulación de azúcar y la biosíntesis y acumulación de compuestos fenólicos (antocianos y no antocianos). Las aplicaciones de ABA no producen el mismo efecto que UV-B, posiblemente porque la señalización de UV-B no está solamente mediada por ABA y otros factores están involucrados. Los tratamientos +UV-B y +ABA incrementaron la acumulación de compuestos fenólicos en los hollejos desde enero (posiblemente anticipando el inicio de la maduración), y posteriormente disminuyen el crecimiento de las bayas y los contenidos de azúcar por baya, sin afectar la concentración a cosecha.

El objetivo general de caracterizar la radiación UV-B solar que reciben las plantas en los viñedos de altura de Mendoza en distintos meses y horas del día, estudiando los efectos de la radiación UV-B, del ABA y de su interacción, sobre aspectos fisiológicos y bioquímicos que afectan el rendimiento cuantitativo y la calidad de plantas de vid cv. Malbec, fue completado. También, a partir de los resultados obtenidos se conocen los niveles de UV-B solar que perciben las plantas en los viñedos de altura en Mendoza y las características de las reacciones de la planta frente a cada uno de los factores y a la interacción de los mismos en diferentes temporadas de estudio, lo que sienta algunas bases científicas para desarrollar estrategias de manejo del cultivo con el objetivo de obtener uvas de alta calidad enológica. Por ejemplo: -selección del sitio de implantación en base a los niveles de UV-B que se registren; -desbrotes y deshojes para controlar la densidad de la canopia y aumentar la exposición de los racimos a la UV-B; -restricciones hídricas para aumentar los niveles de ABA en las plantas; -aplicaciones de ABA para aumentar los niveles de ABA en las plantas; - colocación de coberturas vegetales, minerales o plásticas en el suelo para modificar el ambiente lumínico por reflexión de las mismas.

También, las correlaciones obtenidas entre las variables meteorológicas estudiadas y el crecimiento, desarrollo y la calidad enológica constituyen una fase preliminar para desarrollar modelos de predicción de calidad de cosecha. Por ejemplo, en temporadas donde se espere que la HR sea baja y las temperaturas sean mayores (situaciones que posiblemente

aumenten la situación general de estrés en las plantas), posiblemente se obtengan bayas más chicas con mayores contenidos de azúcar, antocianos y polifenoles totales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24: 1337-1344
- Allen DJ, Nogue S, Baker NR (1998) Ozone depletion and increased UV-B radiation: Is there a real threat to photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 49: 1775-1788
- Antolín MC, Baigorri H, De Luis I, Aguirrezábal F, Geny L, Broquedis M, Sánchez-Díaz 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
- Asen S, Stewart RN, Norris KH (1972) Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* 11: 1139-1144
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104: 280-292
- Baigorri H, Antolin C, De Luis I, Geny L, Broquedis M, Aguirrezábal F, Sánchez-Díaz M (2001) Influence of training system on the reproductive development and hormonal levels of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 357-363
- Ballaré CL (1999) Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends in Plant Science* 4: 97-102
- Ballaré CL, Barnes PW, Flint SD, Price S (1995) Inhibition of hypocotyl elongation by ultraviolet-B radiation in de-etiolating tomato seedlings. II. Time-course, comparison with flavonoid responses and adaptive significance. *Physiologia Plantarum* 93: 593-601
- Ballaré CL, Scopel AL, Stapleton AE, Yanovsky MJ (1996) Solar ultraviolet-B radiation affects seedling emergence, DNA Integrity, plant morphology, growth rate, and attractiveness to herbivore Insects in *Datura ferox*. *Plant Physiology* 112: 161-170
- 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* 78: 586-589
- Barceló AR, Pomar F, López-Serrano M, Pedreño MA (2003) Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology* 30: 577-591
- Barka EA (2001) Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 785-791
- Beligni MV, Lamattina L (2002) Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* 25: 737-748
- Berli F (2007) Respuesta de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec a UV-B. Tesis Maestría de Viticultura y Enología, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo y la Estación Experimental Agropecuaria Mendoza del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- Berli F, D'Angelo J, Cavagnaro B, Bottini R, Wuilloud R, Silva MF (2008) Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) ripened with different solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2892-2898
- Berli F, Moreno D, Piccoli P, Hespanhol-Viana L, Silva MF, Bressan-Smith R, Cavagnaro JB, Bottini R (2010) Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet- absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell and Environment* 33: 1-10
- Berli F, Fanzone M, Piccoli P, Bottini R (2011) Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* DOI: 10.1021/jf200040z
- Bilger W, Johnsen T, Schreiber U (2001) UV-excited chlorophyll fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2007-2014
- Bindon K, Dry P, Loveys B (2008) Influence of partial rootzone drying on the composition and accumulation of anthocyanins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14: 91-103

- Björn LO (1996) Effects of ozone depletion and increased UV-B on terrestrial ecosystems. *International Journal of Environmental Studies* 51: 217-243
- Björn LO, Widell S, Wang T (2002) Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Advances in Space Research* 30: 1557-1562
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review. *Annals of Botany* 91: 179-194
- Boccalandro HE, Mazza CA, Mazzella MA, Casal JJ, Ballaré CL (2001) Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in Arabidopsis. *Plant Physiology* 126: 780-788
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP (2005) Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* 139: 652-663
- Bornman CH, Jansson E (1980) *Nicotiana tabacum* callus studies. X. ABA increases resistance to cold damage. *Plant Physiology* 48: 491-498
- Bornman JF, Reuber S, Cen YP, Weissenböck G (1997) Ultraviolet radiation as a stress factor and the role of protective pigments. In *Plants and UV-B: Responses to Environmental Change*, Lumsden J ed. Cambridge University Press, Cambridge, NY, pp. 157-168
- Boss PK, Davies C, Robinson SP (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
- 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
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brosché M, Schuler MA, Kalbina I, Connor L, Strid A (2002) Gene regulation by low level UV-B radiation: identification by DNA array analysis. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 656-664
- Brosché M, Strid A (2003) Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiologia Plantarum* 117: 1-10
- Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18225-18230
- Burger J, Edwards GE (1996) Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant and Cell Physiology* 37: 395-399
- Burns KC, Dalen JL (2002) Foliage color contrasts and adaptive fruit color variation in a bird-dispersed plant community. *Oikos* 96: 463-469
- Çakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 2165-2180
- Caldwell MM (1971) Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. *Photophysiology* 6: 131-177
- Caldwell MM, Ballaré CL, Bornman JF, Flint SD, Björn LO, Teramura AH, Kulandaiveli G, Tevini M (2003) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation and interactions with other climatic change factors. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2: 29-38
- Caldwell MM, Flint SD (1997) Uses of biological spectral weighting functions and the need of scaling for the ozone reduction problem. *Plant Ecology* 128: 66-76
- Caldwell MM, Robberecht R, Flint SD (1983) Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum* 58: 445-450
- Cantín CM, Fidelibus MW, Crisosto CH (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
- Casado CG, Heredia A (1999) Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany* 50: 175-182
- Casati P, Stapleton AE, Blum JE, Walbot V (2006) Genome-wide analysis of high-altitude maize and gene knockdown stocks implicates chromatin remodeling proteins in response to UV-B. *Plant Journal* 46: 613-627

- Casati P, Walbot V (2003) Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiology* 132: 1739-1754
- Casati P, Walbot V (2004) Rapid transcriptome responses of maize (*Zea mays*) to UV-B in irradiated and shielded tissues. *Genome Biology* 5: R16
- Castellarin S, Di Gaspero G, Marconi R, Nonis A, Peterlunger E, Paillard S, Adam-Blondon A, Testolin R (2006) Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics* 7: 12
- Castellarin SD, Di Gaspero G (2007) Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology* 7: 46
- Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G (2007) Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment* 30: 1381-1399
- Cawthon DL, Morris JR (1982) Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormonal changes, and uneven ripening of 'Concord' (*Vitis labrusca* L.) grapes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107: 1097-1104
- Cochard H, Ridolfi M, Dreyer E (1996) Water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koveana tvichocavpa* cv. Peace): response. *New Phytologist* 134: 455-461
- Cockell CS, Knowland J (1999) Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews* 74: 311-345
- Conde C, Agasse A, Glissant D, Tavares R, Geros H, Delrot S (2006) Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiology* 141: 1563-1577
- Coombe BG, Hale CR (1973) The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology* 51: 629-634
- Coombe BJ (1995) Growth stages of the grapevine: adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 104-110
- Correia CM, Pereira JMM, Coutinho JF, Björn LO, Torres-Pereira JMG (2005) Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: a Mediterranean field study. *European Journal of Agronomy* 22: 337-347
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan B, Grissem W, Jones R, eds., American Society of Plant Biologists, Rockville, MD., pp. 1250-1268
- Czochanska Z, Foo LY, Porter LJ (1979) Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* 18: 1819-1822
- Chappelle EW, Kim MS, McMurtrey Iii JE (1992) Ratio analysis of reflectance spectra (RARS): An algorithm for the remote estimation of the concentrations of chlorophyll A, chlorophyll B, and carotenoids in soybean leaves. *Remote Sensing of Environment* 39: 239-247
- Cheyrier V (2005) Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 223-229
- Cheyrier V, Prieur C, Guyot S, Rigaud J, Moutounet M (1997) The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins. In *Proceedings of ACS Symposium Series, Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*, Vol 661, pp. 81-93
- Dai Q, Yan B, Huang S, Liu X, Peng S, Miranda MLL, Chavez AQ, Vergara BS, Olszyk DM (1997) Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* 101: 301-308
- Davies C, Boss PK, Robinson SP (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiology* 115: 1155-1161
- Day TA, Howells BW, Ruhland CT (1996) Changes in growth and pigment concentrations with leaf age in pea under modulated UV-B radiation field treatments. *Plant, Cell and Environment* 19: 101-108
- Day TA, Vogelmann TC, DeLucia EH (1992) Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? *Oecologia* 92: 513-519

- De Freitas VAP, Glories Y (1999) Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1601-1606
- Deluc LG, Quilici DR, Decendit A, Grimplet J, Wheatley MD, Schlauch KA, Mérillon JM, Cushman JC, Cramer GR (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* 10: 212-245
- Deytieux-Belleau C, Gagne S, L'Hyvernay A, Donèche B, Geny L (2007) Possible roles of both abscisic acid and indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 41: 141-148
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 257-268
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP (2003) Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: 15-27
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP (2004) The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 55-73
- Drilias P, Karabourniotis G, Levizou E, Nikolopoulos D, Petropoulou Y, Manetas Y (1997) The effects of enhanced UV-B radiation on the Mediterranean evergreen sclerophyll *Nerium oleander* depend on the extent of summer precipitation. *Journal of Plant Physiology* 24: 301-306
- Dry PR, Loveys BR, Düring H (2000) Partial drying of the rootzone of grape. I. Transient changes in shoot growth and gas exchange. *Vitis* 39: 3-7
- Duan B, Xuan Z, Zhang X, Korpelainen H, Li C (2008) Interactions between drought, ABA application and supplemental UV-B in *Populus yunnanensis*. *Physiologia Plantarum* 134: 257-269
- Düring H, Alleweldt G, Koch R (1978) Studies on hormonal control of ripening in berries of grape vines. *Acta Horticulturae* 80: 397-405
- Fanzone M, Peña-Neira A, Jofré V, Assof M, Zamora F (2010) Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2388-2397
- Feurtado JA, Ambrose SJ, Cutler AJ, Ross ARS, Abrams SR, Kermode AR (2004) Dormancy termination of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds is associated with changes in abscisic acid metabolism. *Planta* 218: 630-639
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717
- Frohnmeier H, Loyall L, Blatt MR, Grabov A (1999) Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca²⁺ and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant Journal* 20: 109-117
- Frohnmeier H, Staiger D (2003) Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology* 133: 1420-1428
- Fujita A, Soma N, Goto-Yamamoto N, Mizuno A, Kiso K, Hashizume K (2007) Effect of shading on proanthocyanidin biosynthesis in the grape berry. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 76: 112-119
- Gagné S, Estève K, Deytieux C, Saucier C, Geny L (2006) Influence of abscisic acid in triggering véraison in grape berry skins of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 40: 1-14
- Gambetta G, Matthews M, Shaghasi T, McElrone A, Castellarin S (2010) Sugar and abscisic acid signaling orthologs are activated at the onset of ripening in grape. *Planta* 232: 219-234
- Giribaldi M, Geny L, Delrot S, Schubert A (2010) Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *Journal of Experimental Botany* 61: 2447-2458
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57: 761-780
- Gruber H, Heijde M, Heller W, Albert A, Seidlitz HK, Ulm R (2010) Negative feedback regulation of UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 20132-20137

- Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 347-369
- Hale CR, Coombe BG (1974) Abscisic acid. An effect on the ripening of grapes. *The Royal Society of New Zealand Bulletin* 12: 831-836
- Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504
- Hartmann M-A (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends in Plant Science* 3: 170-175
- Haselgrove L, Botting D, Van Heeswijck R, Hoj PB, Dry PR, Ford C, Iland PG (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
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB (2010) Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* 153: 211-221
- 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
- Hofmann RW, Campbell BD, Fountain DF (2003) Sensitivity of white clover to UV-B radiation depends on water availability, plant productivity and duration of stress. *Global Change Biology* 9: 473-477
- Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* 59: 2991-3007
- Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L (2008) Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 589-598
- Inaba A, Ishida M, Sobajima Y (1976) Changes in endogenous hormone concentrations during berry development in relation to the ripening of Delaware grapes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 45: 245-252
- INV (2009) Instituto Nacional de Vitivinicultura, Registro de superficie y viñedos
- Izaguirre MM, Scopel AL, Baldwin IT, Ballaré CL (2003) Convergent responses to stress. Solar ultraviolet-B radiation and *Manduca sexta* herbivory elicit overlapping transcriptional responses in field-grown plants of *Nicotiana longiflora*. *Plant Physiology* 132: 1755-1767
- Jacobs M, Rubery P (1988) Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346-349
- Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM (1998) Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3: 131-135
- Jansen MAK, Van den Noort RE, Adillah Tan MY, Prinsen E, Lagrimini LM, Thorneley RNF (2001) Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiology* 126: 1012-1023
- Jenkins GI (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology* 60: 407-431
- Jenkins GI, Fuglevand G, Christie JM (1997) UV-B perception and signal transduction. *In* Plants and UV-B: Responses to Environmental Change, Lumsden ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 135-156
- Jenkins GI, Long JC, Wade HK, Shenton MR, Bibikova TN (2001) UV and blue light signalling: Pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 151: 121-131
- Jeong ST, 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
- Jiang M, Zhang J (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* 42: 1265-1273
- Jiang M, Zhang J (2002) Role of abscisic acid in water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Research* 36: 1001-1015

- Jordan BR (2002) Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Functional Plant Biology* 29: 909-916
- Jordan BR, He J, Chow WS, Anderson JM (1992) Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant, Cell and Environment* 15: 91-98
- Kakani VG, Reddy KR, Zhao D, Sailaja K (2003) Field crop responses to ultraviolet-B radiation: A review. *Agricultural and Forest Meteorology* 120: 191-218
- Karabal E, Yücel M, Öktem HA (2003) Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science* 164: 925-933
- 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: 325-332
- Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal S, Waters EJ, Jones GP (2001) Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5348-5355
- Kim BC, Tennessen DJ, Last R (1998) UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 15: 667-674
- Kolb CA, Käser MA, Kopecký J, Zotz G, Riederer M, Pfündel EE (2001) Effects of natural intensities of visible and ultraviolet radiation on epidermal ultraviolet screening and photosynthesis in grape leaves. *Plant Physiology* 127: 863-875
- Kollist T, Moldau H, Rasulov B, Oja V, Rämme H, Hüve K, Jaspers P, Kangasjärvi J, Kollist H (2007) A novel device detects a rapid ozone-induced transient stomatal closure in intact *Arabidopsis* and its absence in *abi2* mutant. *Physiologia Plantarum* 129: 796-803
- Kondo S, Kawai M (1998) Relationship between free and conjugated ABA levels in seeded and gibberellin-treated seedless, maturing 'Pione' grape berries. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 750-754
- 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
- Krupa SV, Kickert RN, Jäger HJ (1998) Elevated UV-B radiation and crops. In *Elevated Ultraviolet (UV)-B Radiation and Agriculture*, Krupa SV, Kickert RN, Jäger HJ eds., Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 105-132
- Lacampagne S, Gagné S, Gény L (2010) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 81-90
- Landry LG, Chapple CC, Last RL (1995) *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiology* 109: 1159-1166
- Li J, Ou-Lee TM, Raba R, Amundson RG, Last RL (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179
- Li C, Puhakainen T, Welling A, Viherä-Aarnio A, Ernstsén A, Junttila O, Heino P, Palva ET (2002) Cold acclimation in silver birch (*Betula pendula*) development of freezing tolerance in different tissues and climatic ecotypes. *Physiologia Plantarum* 116: 478-488
- Li C, Yin C, Liu S (2004) Different responses of two contrasting *Populus davidiana* populations to exogenous abscisic acid application. *Environmental and Experimental Botany* 51: 237-246
- Liakoura V, Bornman JF, Karabourniotis G (2003) The ability of abaxial and adaxial epidermis of sun and shade leaves to attenuate UV-A and UV-B radiation in relation to the UV absorbing capacity of the whole leaf methanolic extracts. *Physiologia Plantarum* 117: 33-43
- Lois R, Buchanan BB (1994) Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* 194: 504-509
- Lüthen H, Bigdon M, Böttger M (1990) Reexamination of the acid growth theory of auxin action. *Plant Physiology* 93: 931-939
- Machlin LJ, Bendich A (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1: 441-445

- Madronich S, McKenzie RL, Caldwell MM, Bjorn LO (1995) Changes in ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Ambio* 24: 143-152
- Manetas Y (2003) The importance of being hairy: The adverse effects of hair removal on stem photosynthesis of *Verbascum speciosum* are due to solar UV-B radiation. *New Phytologist* 158: 503-508
- Mantyla E, Lang V, Palva EP (1995) Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 107: 141-148
- Masa A, Vilanova M (2008) Flavonoid and aromatic characterisation of cv. Albarín blanco (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry* 107: 273-281
- Matsushima J, Hiratsuka S, Taniguchi N, Wada R, Suzuki 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
- Mazza CA, Battista D, Zima AM, Szwarcberg-Bracchitta M, Giordano CV, Acevedo A, Scopel AL, Ballaré CL (1999) The effects of solar ultraviolet-B radiation on the growth and yield of barley are accompanied by increased DNA damage and antioxidant responses. *Plant, Cell and Environment* 22: 61-70
- Mazza CA, Boccacandro HE, Giordano CV, Battista D, Scopel AL, Ballaré CL (2000) Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* 122: 117-125
- McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Björn LO, Ilyas M (2007) Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6: 218-231
- McKenzie RL, Björn LO, Bais A, Ilyas M (2003) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2: 5-15
- Merzlyak MN, Chivkunova OB, Solovchenko AE, Naqvi KR (2008) Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves. *Journal of Experimental Botany* 59: 3903-3911
- Milborrow BV (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1145-1164
- Minuti L, Pellegrino RM, Tesei I (2006) Simple extraction method and gas chromatography-mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. *Journal of Chromatography A* 1114: 263-268
- Moreno D, Berli F, Piccoli P, Bottini R (2010) Gibberellins and abscisic acid promote carbon allocation in roots and berries of grapevines. *Journal of Plant Growth Regulation* in press
- Mori K, Goto-Yamamoto N, Kitayama M, Hashizume K (2007) Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany* 58: 1935-1945
- Mori K, Saito H, 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
- Nagata T, Todoriki S, Masumizu T, Suda I, Furuta S, Du Z, Kikuchi S (2003) Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2992-2999
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56: 165-185
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Hashimoto M, Iba K (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-486
- Nomura T, Kitasaka Y, Takatsuto S, Reid JB, Fukami M, Yokota T (1999) Brassinosteroid/sterol synthesis and plant growth as affected by lka and lkb mutations of pea. *Plant Physiology* 119: 1517-1526
- Núñez-Olivera E, Martínez-Abaigar J, Tomas R, Otero S, Arróniz-Crespo M (2006) Physiological effects of solar ultraviolet-B exclusion on two cultivars of *Vitis vinifera* L. from La Rioja, Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 441-448

- 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
- Olsson LC, Veit M, Weissenböck G, Bornman JF (1998) Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49: 1021-1028
- Ong ASH, Tee ES (1992) Natural sources of carotenoids from plants and oils. *Methods in Enzymology* 213: 142-167
- Ort DR (2001) When there is too much light. *Plant Physiology* 125: 29-32
- Owen SJ, Lafond MD, Bowen P, Bogdanoff C, Usher K, Abrams SR (2009) Profiles of abscisic acid and its catabolites in developing Merlot grape (*Vitis vinifera*) berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 277-284
- Pan QH, Li MJ, Peng CC, Zhang N, Zou X, Zou KQ, Wang XL, Yu XC, Wang XF, Zhang DP (2005) Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiologia Plantarum* 125: 157-170
- Pastori GM, Foyer CH (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129: 460-468
- Paul ND, Gwynn-Jones D (2003) Ecological roles of solar UV radiation: Towards an integrated approach. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 48-55
- Peña-Neira A, Cáceres A, Pastenes C (2007) Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Science and Technology International* 13: 153-158
- Peña-Neira A, Hernández T, García-Vallejo C, Estrella I, Suarez JA (2000) A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology* 210: 445-448
- Peppi MC, Fidelibus MW (2008) Effects of forchlorfenuron and abscisic acid on the quality of 'Flame Seedless' grapes. *HortScience* 43: 173-176
- Peppi MC, Fidelibus MW, Dokoozlian N (2006) Abscisic acid application timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of 'Flame Seedless' grapes. *HortScience* 41: 1440-1445
- Peppi MC, Fidelibus MW, Dokoozlian NK (2007) Application timing and concentration of abscisic acid affect the quality of 'Redglobe' grapes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82: 304-310
- Peppi MC, Walker MA, Fidelibus MW (2008) Application of abscisic acid rapidly upregulated UFGT gene expression and improved color of grape berries. *Vitis* 47: 11-14
- Pfündel EE (2003) Action of UV and visible radiation on chlorophyll fluorescence from dark-adapted grape leaves (*Vitis vinifera* L.). *Photosynthesis Research* 75: 29-39
- Pinto ME, Casati P, Hsu T-P, Ku MSB, Edwards GE (1999) Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 48: 200-209
- Pirie A, Mullins MG (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
- Pontin M, Piccoli P, Francisco R, Bottini R, Martínez Zapater JM, Lijavetzky D (2010) Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation. *BMC Plant Biology* 10: 224
- Price SF, Breen PJ, Valladao M, Watson BT (1995) Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 46: 187-194
- Pyle JA (1997) Global ozone depletion: Observations and theory. In *Plants and UV-B, Responses to Environmental Change*, Lumsden PJ ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 3-11
- Quiroga AM, Berli F, Moreno D, Cavagnaro JB, Bottini R (2009) Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard-grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 28-35

- Rakitin VY, Karyagin VV, Rakitina TY, Prudnikova ON, Vlasov PV (2008) UV-B stress-induced ABA production in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in ethylene signal transduction pathway. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 854-856
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (2006) Phenolic compounds. In Handbook of enology: The chemistry of wine stabilization and treatments 2nd ed., Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu eds., John Wiley and Son Inc., Chinchester, England, pp. 141-204
- Riou V, Asselin C (1996) Potentiel polyphénolique disponible du raisin. Estimation rapide par extraction partielle à chaud. *Progrès Agricole et Viticole* 113: 382-384
- Ristic R, Downey MO, Iland PG, Bindon K, Francis IL, Herderich M, Robinson SP (2007) Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 13: 53-65
- Ros J, Tevini M (1995) Interaction of UV-radiation and IAA during growth of seedlings and hypocotyl segments of sunflower. *Journal of Plant Physiology* 146: 295-302
- Rozema J, Van De Staaij J, Björn LO, Caldwell M (1997) UV-B as an environmental factor in plant life: Stress and regulation. *Trends in Ecology and Evolution* 12: 22-28
- Saint-Cricq De Gaulejac N, Augustin M, Vivas N, Glories Y (1997) A biochemical approach to the evolution of procyanidins in grape seeds during the ripening of red grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Merlot Noir). *Journal of Wine Research* 8: 159-167
- Saito N, Harborne JB (1992) Correlations between anthocyanin type, pollinator and flower colour in the labiatae. *Phytochemistry* 31: 3009-3015
- Sakamoto H, Matsuda O, Iba K (2008) ITN1, a novel gene encoding an ankyrin-repeat protein that affects the ABA-mediated production of reactive oxygen species and is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56: 411-422
- Sansberro PA, Mroginski LA, Bottini R (2004) Foliar sprays with ABA promote growth of *Ilex paraguariensis* by alleviating diurnal water stress. *Plant Growth Regulation* 42: 105-111
- Savenstrand H, Brosché M, Strid A (2004) Ultraviolet-B signalling: Arabidopsis brassinosteroid mutants are defective in UV-B regulated defence gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 687-694
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12
- Scienza A, Miravalle R, Visai C, Fregoni M (1978) Relationship between seed number, gibberellin and abscisic acid levels and ripening in Cabernet Sauvignon grape berries. *Vitis* 17: 361-368
- Scheffeldt P, Hrazdina G (1978) Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *Journal of Food Science* 43: 517-520
- Schmitz-Eiberger M, Noga G (2001) Quantification and reduction of UV-B induced plant damage in *Phaseolus vulgaris* leaves and *Malus domestica* fruits. *Journal of Applied Botany* 75: 53-58
- Schultz HR (2000) Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 2-12
- Schultz HR, Löhnertz O, Bettner W, Bálo B, Linsenmeier A, Jähnisch A, Müller M, Gaubatz B, Váradi G (1998) Is grape composition affected by current levels of UV-B radiation? *Vitis* 37: 191-192
- Schwartz SH, Zeevaart JAD (2004) Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!, Davies PJ, ed., Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 137-155
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression pattern of around 7,000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional and Integrative Genomics* 2: 282-291
- Semerdjieva SI, Phoenix GK, Hares D, Gwynn-Jones D, Callaghan TV, Sheffield E (2003) Surface morphology, leaf and cuticle thickness of four dwarf shrubs from a sub-Arctic heath following long-term exposure to enhanced levels of UV-B. *Physiologia Plantarum* 117: 289-294
- Shinkle JR, Atkins AK, Humphrey EE, Rodgers CW, Wheeler SL, Barnes PW (2004) Growth and morphological responses to different UV wavebands in cucumber (*Cucumis sativum*) and other dicotyledonous seedlings. *Physiologia Plantarum* 120: 240-248
- Shinkle JR, Derickson DL, Barnes PW (2005) Comparative photobiology of growth responses to two UV-B wavebands and UV-C in dim-red-light- and white-light-grown cucumber (*Cucumis*

- sativus*) seedlings: physiological evidence for photoreactivation. *Photochemistry and Photobiology* 81: 1069-1074
- Solovchenko A, Schmitz-Eiberger M (2003) Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *Journal of Experimental Botany* 54: 1977-1984
- Somers TC (1976) Pigment development during ripening of the grape. *Vitis* 14: 269-277
- Spayd SE, Tarara JM, Mee DL, Ferguson JC (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
- Sroka Z (2005) Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift fur Naturforschung C* 60: 833-843
- Stafford HA (1991) Flavonoid evolution: An enzymic approach. *Plant Physiology* 96: 680-685
- Stapleton AE, Walbot V (1994) Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology* 105: 881-889
- Stoll M, Loveys B, Dry P (2000) Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* 51: 1627-1634
- Stratmann J (2003) Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends in Plant Science* 8: 526-533
- Taiz L, Zeiger E (2002) Abscisic acid: a seed maturation and antistress signal. In *Plant Physiology* 3rd ed. Taiz L, Zeiger E eds., Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, pp. 539-558
- Tarara JM, Lee J, Spayd SE, Scagel CF (2008) Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 59: 235-247
- Tevini M, Teramura AH (1989) UV-B effects on terrestrial plants. *Photochemistry and Photobiology* 50: 479-487
- Travaglia C, Cohen A, Reinoso H, Castillo C, Bottini R (2007) Exogenous abscisic acid increases carbohydrate accumulation and redistribution to the grains in wheat grown under field conditions of soil water restriction. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 285-289
- Trousdale EK, Singleton VL (1983) Astilbin engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry* 22: 619-620
- Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Ádám É, Oakeley EJ, Schäfer E, Nagy F (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1397-1402
- Ulm R, Nagy F (2005) Signalling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 477-482
- Vahisalu T, Kollist H, Wang Y-F, Nishimura N, Chan W-Y, Valerio G, Lamminmaki A, Brosche M, Moldau H, Desikan R, Schroeder JI, Kangasjarvi J (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452: 487-491
- Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Vieira da Silva JB (1990) Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in Phaseolus and Vigna Species. *Journal of Experimental Botany* 41: 827-832
- Wang H, Cao G, Prior RL (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 304-309
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313
- 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
- Wolf L, Rizzini L, Stracke R, Ulm R, Rensing SA (2010) The molecular and physiological responses of *Physcomitrella patens* to Ultraviolet-B Radiation. *Plant Physiology* 153: 1123-1134
- Xie DY, Sharma SB, Dixon RA (2004) Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422: 91-102
- 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 for Horticultural Science* 70: 185-190

- Young AJ (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum* 83: 702-708
- Zhang J, Kirkham MB (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology* 35: 785-791
- Zhang X, Luo G, Wang R, Wang J, Himelrick DG (2003) Growth and developmental responses of seeded and seedless grape berries to shoot girdling. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 316-323
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-273

8. ANEXO

Ecuación A.1 Cálculo de la dosis de UV-B a partir de mediciones de intensidad de UV-B en unidades de energía.

$$\begin{aligned}\mu\text{W cm}^{-2} &= (\text{W m}^{-2}) \times 100 \\ \text{W m}^{-2} &= \text{J m}^{-2} \text{s}^{-1} \\ 8,5 \text{ h} &= 30.600 \text{ s} \\ \text{KJ m}^{-2} &= \frac{(\text{J m}^{-2} \text{s}^{-1}) \times (30.600 \text{ s})}{1.000} \\ \text{dosis (KJ m}^{-2}) &= \frac{\text{intensidad } (\mu\text{W cm}^{-2})}{100} \times 30.600 \text{ s} \times 0,001\end{aligned}$$

Ecuación A.2 Cálculo de los contenidos de clorofilas y carotenoides en base a Wellburn (1994).

$$\begin{aligned}\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= 12,19 \text{ OD}_{665} - 3,45 \text{ OD}_{649} \\ \text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= 21,99 \text{ OD}_{649} - 5,32 \text{ OD}_{665} \\ \text{carotenoides } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= \left(\frac{1.000 \text{ OD}_{480} - 2,14 \text{ Chl } a - 70,16 \text{ Chl } b}{220} \right) \\ \text{Chl Totales } (\mu\text{g mL}^{-1}) &= \text{Chl } a + \text{Chl } b\end{aligned}$$

Ecuación A.3 Cálculo de la integridad de la membrana celular en base Vasquez-Tello *et al.* (1990).

$$\text{integridad de la membrana celular relativa (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{CE libre}}{\text{CE total}} \right) \right] \times 100$$

Ecuación A.4 Cálculo del contenido de MDA.

$$\text{contenido de MDA (nM g}^{-1} \text{ de PF de hoja)} = \frac{\text{OD}_{535}}{156.000} \times \frac{1,5}{0,075} \times 1.000.000$$

Ecuación A.5 Cálculo de los contenidos de azúcar en valores absolutos (absol) y de concentración (conc).

$$\begin{aligned}\text{azúcar conc (g / 100 g PF bayas)} &= \text{°Brix} \\ \text{azúcar absol (mg / baya)} &= \frac{\text{°Brix}}{100} \times \frac{\text{PF 100 bayas}}{100} \times 1.000\end{aligned}$$

Ecuación A.6 Cálculo de los contenidos de azúcar, de antocianos y polifenoles totales (Riou y Asselin, 1996) en valores absolutos (absol) y de concentración (conc).

$$\begin{aligned}\text{azúcar conc (g / 100 g PF bayas)} &= \text{°Brix} \\ \text{azúcar absol (mg / baya)} &= \frac{\text{°Brix}}{100} \times \frac{\text{PF 100 bayas}}{100} \times 1.000 \\ \text{antocianos absol } (\mu\text{g / hollejo de baya)} &= (22,76 \times \text{OD}_{520} \times 50) + 0,05 \\ \text{antocianos conc (mg / 100 g PF bayas)} &= \frac{(\text{antocianos absol} \times 50)}{10 \times (\text{PF 1 baya} / 2)} \\ \text{polifenoles absol (IPT)} &= \text{OD}_{280} \times 100 \\ \text{polifenoles conc (IPT / 100 g PF bayas)} &= \frac{(\text{IPT} \times 50)}{10 \times (\text{PF 1 baya} / 2)}\end{aligned}$$

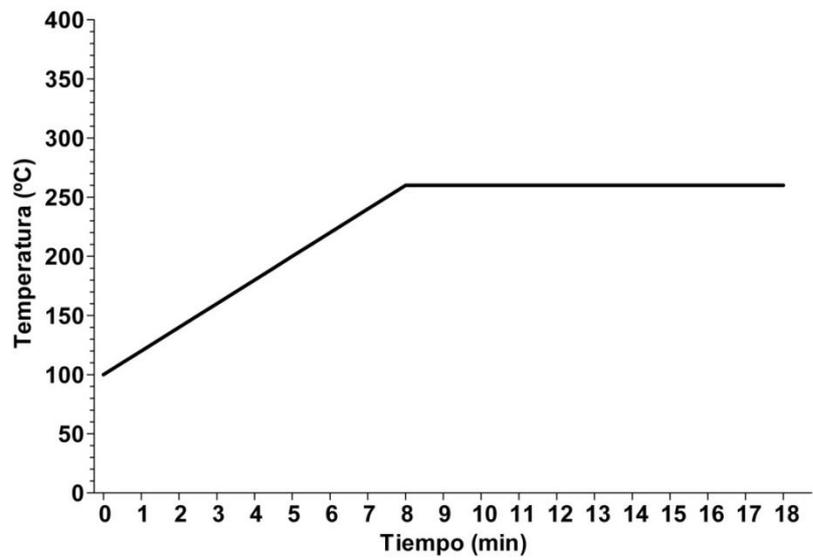


Figura A.1 Programa de temperaturas del horno del GC-EIMS utilizado para las determinaciones de ABA en hojas.

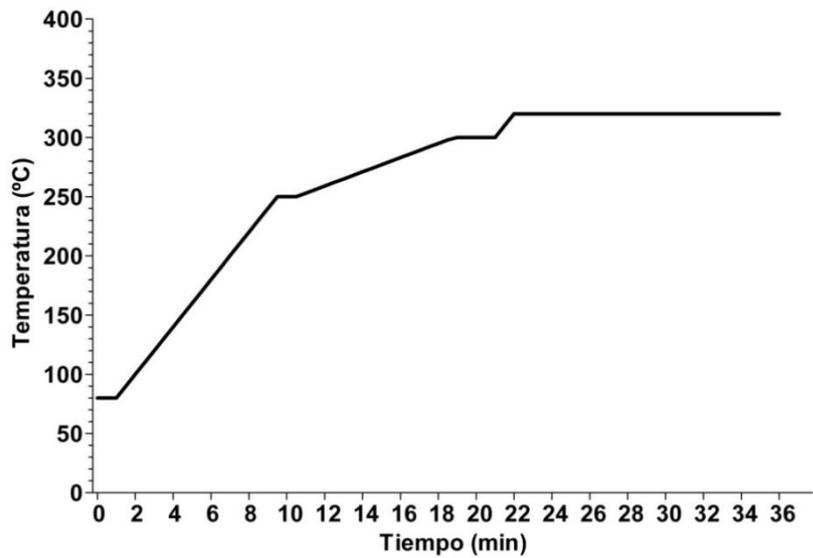


Figura A.2 Programa de temperaturas del horno del GC-EIMS utilizado para las determinaciones de compuestos fenólicos y esteroides de membrana en hojas.

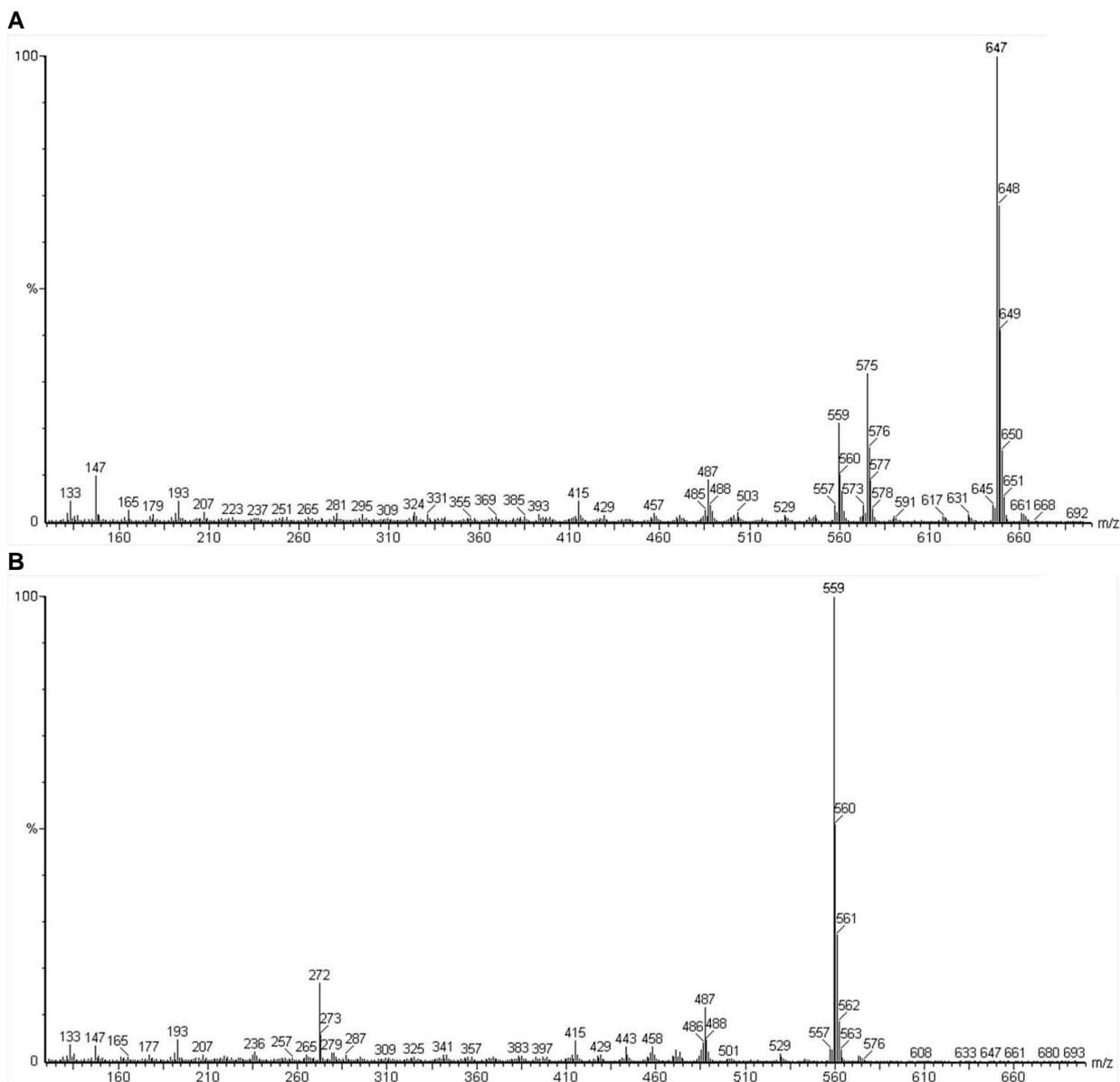


Figura A.3 Espectros de masa de los flavonoles: quercetina (**A**) y kaempferol (**B**), derivatizados (trimetilsililados) con BSTFA, presentes en los extractos de las hojas de vid cv. Malbec y determinados por GC-EIMS.

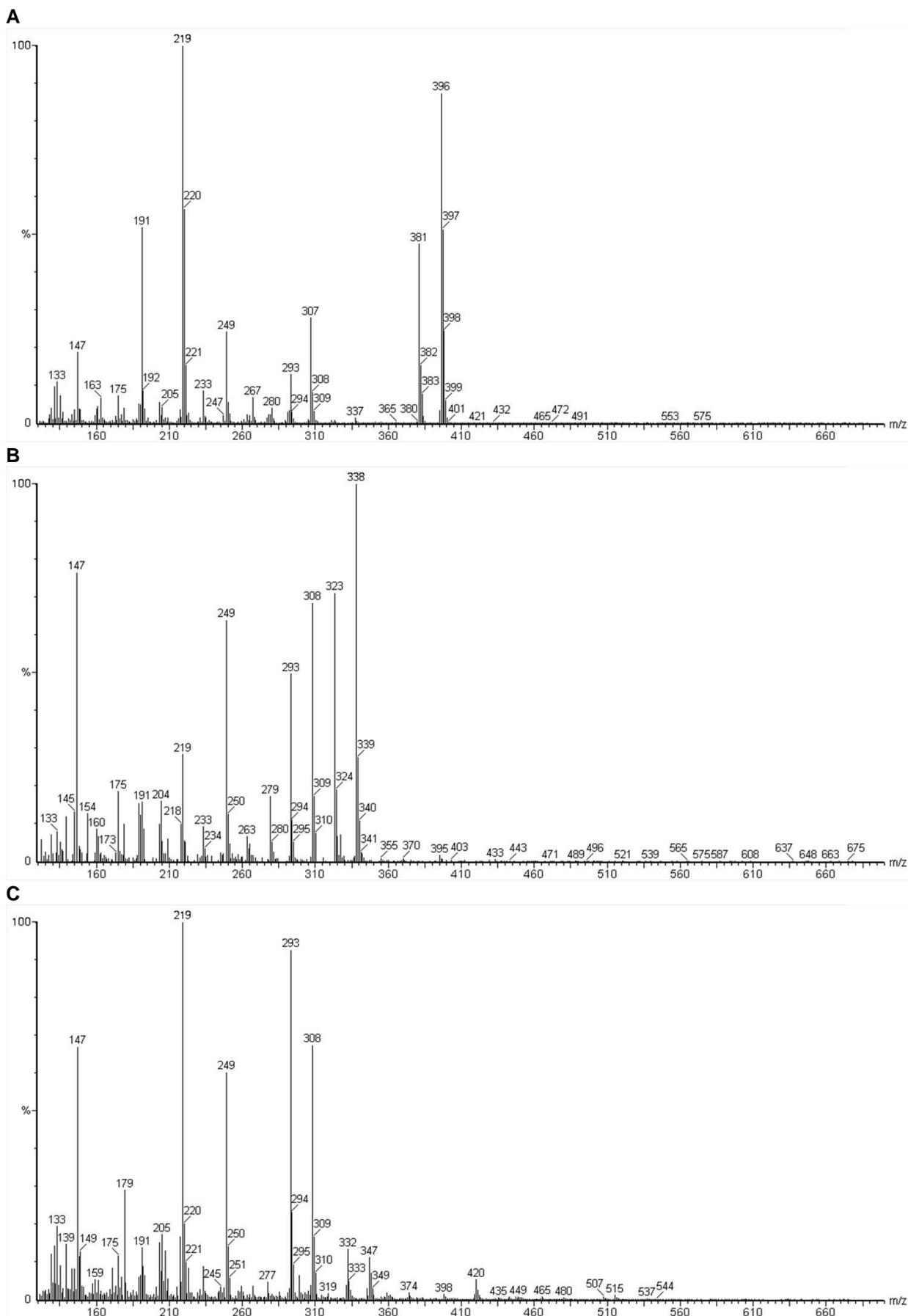


Figura A.4 Espectros de masa de los ácidos hidroxicinámicos: cafeico (A), ferúlico (B) y *p*-cumárico (C), derivatizados (trimetilsililados) con BSTFA, presentes en los extractos de las hojas de vid cv. Malbec y determinados por GC-EIMS.

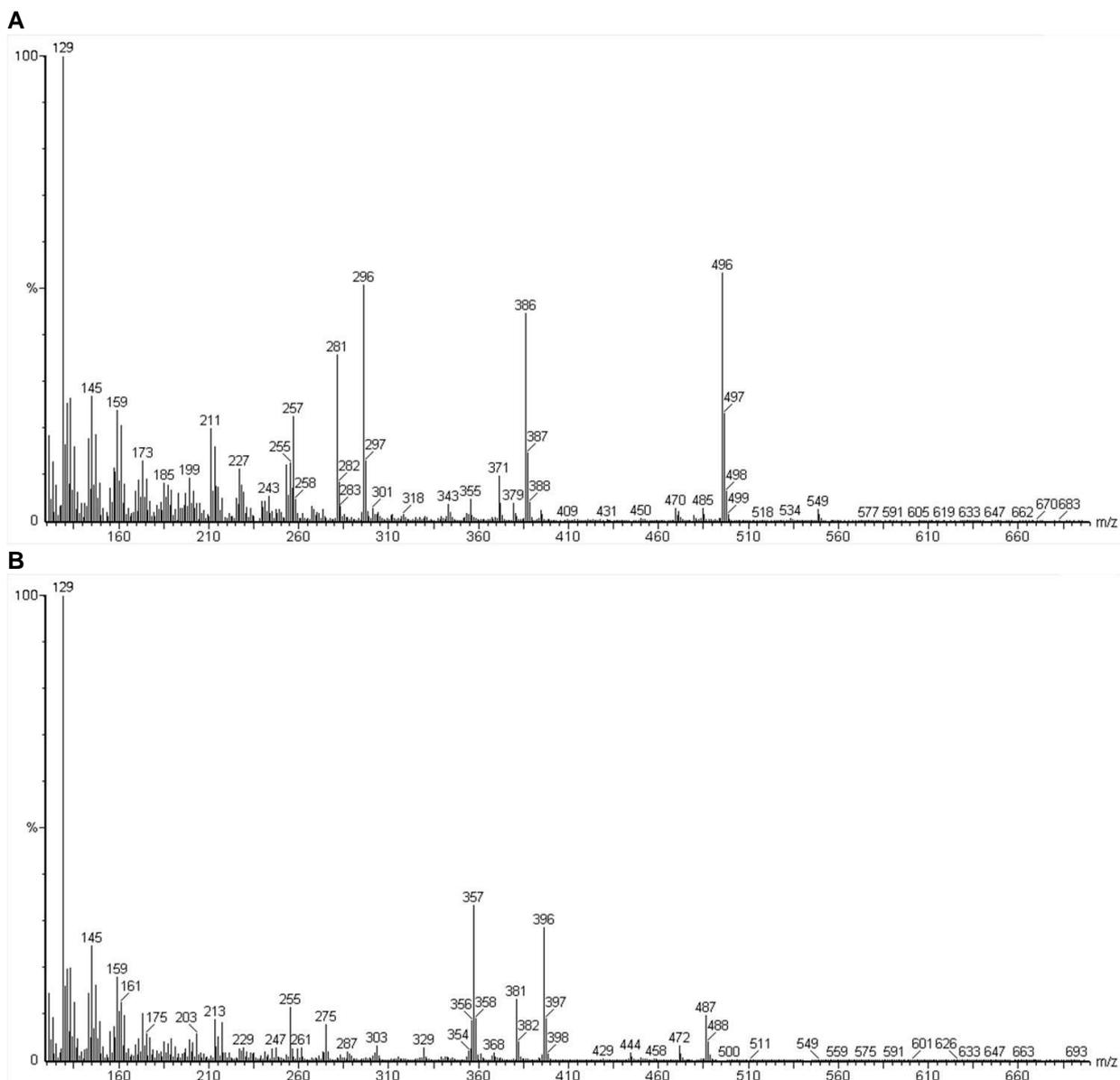


Figura A.5 Espectros de masa de los esteroides: estigmasterol (**A**) y β -sitosterol (**B**), derivatizados (trimetilsililados) con BSTFA, presentes en los extractos de las hojas de vid cv. Malbec y determinados por GC-EIMS.

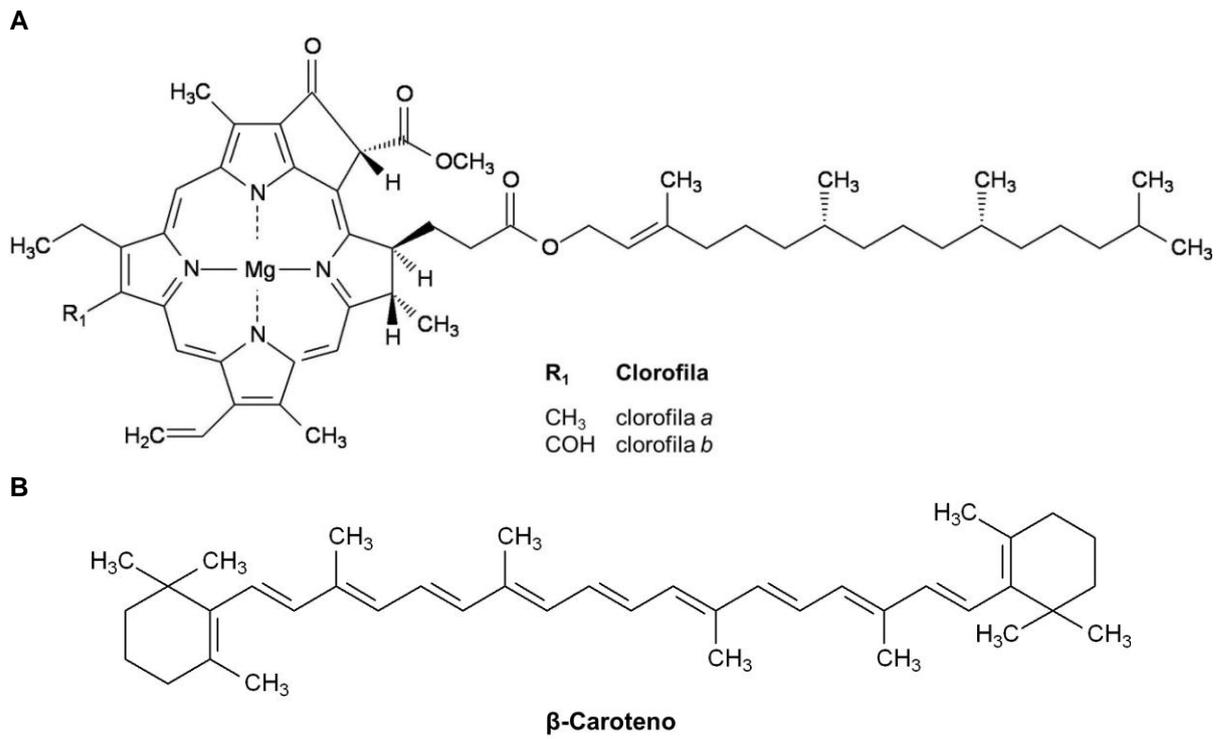


Figura A.6 Estructuras químicas de los pigmentos fotosintéticos: clorofila *a* y *b* (A) y β-caroteno (B).

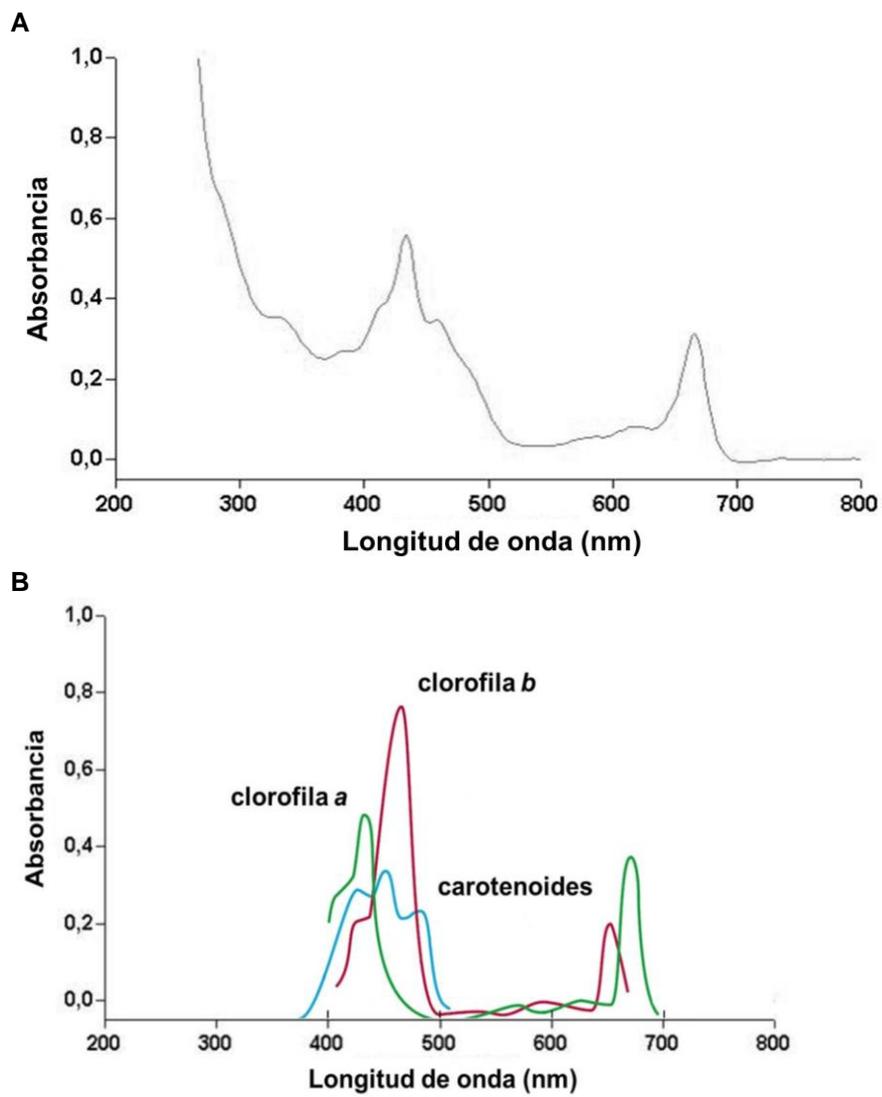


Figura A.7 Espectros de absorbancia de los pigmentos fotosintéticos extraídos con DMSO (**A**) y los de cada pigmento en particular (en base a Taiz y Zeiger, 2002; **B**).

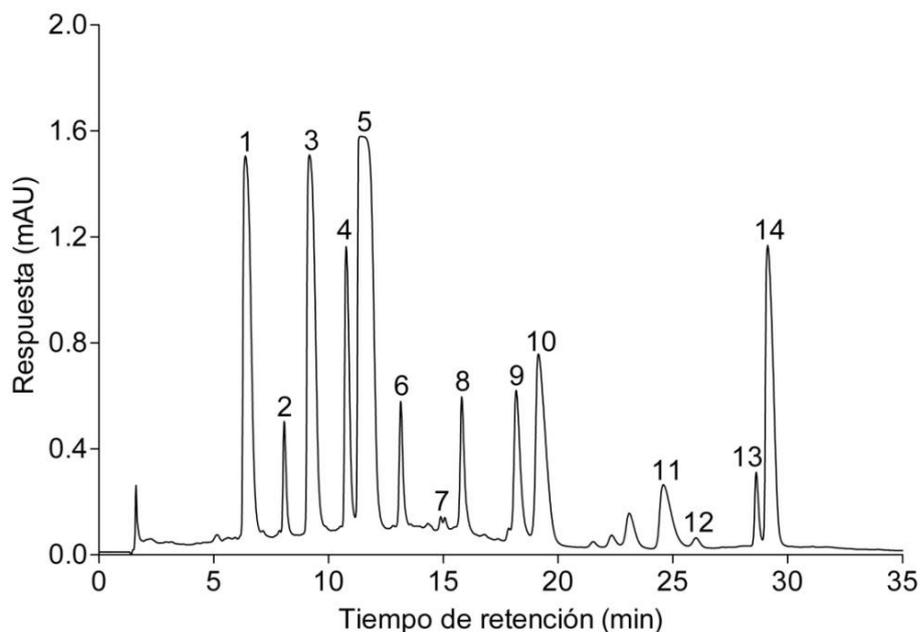


Figura A.8 Cromatograma característico de HPLC-DAD con los antocianos en hollejos a cosecha. No acilados: glucósidos de delphinidina (1); cianidina (2); petunidina (3); peonidina (4) y malvidina (5). Acetilados: glucósidos de delphinidina (6); cianidina (7); petunidina (8); peonidina (9) y malvidina (10). *P*-cumarilados: glucósidos de delphinidina (11); petunidina (12); peonidina (13) y malvidina (14).

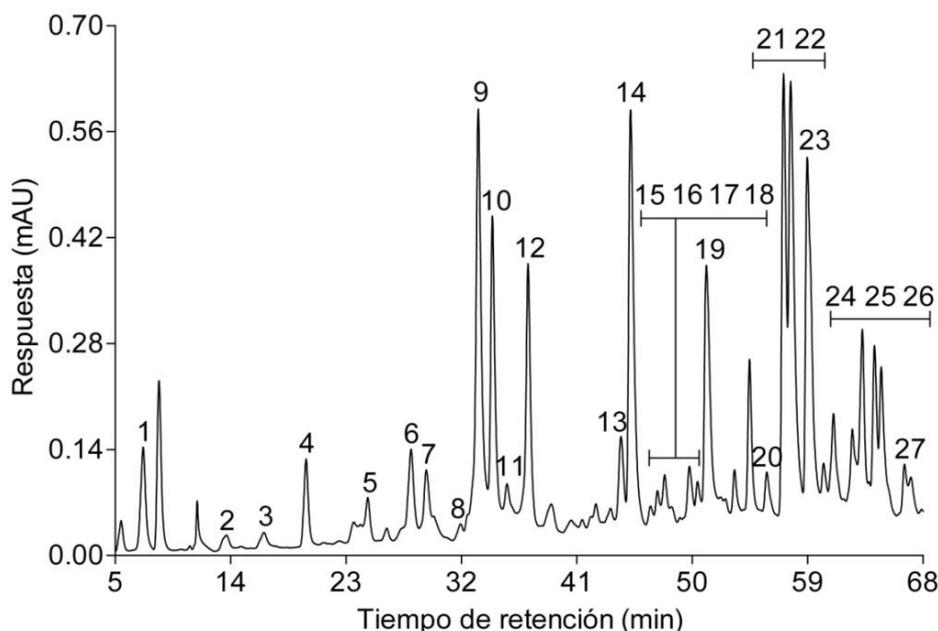


Figura A.9 Cromatograma característico de HPLC-DAD con los fenoles de bajo peso molecular en hollejos extraídos con éter dietílico y acetato de etilo. Ácidos hidroxibenzoicos y sus derivados: gálico (1); protocatequico (2); vanílico (7); siríngico (10) y metil galato (4). Ácidos hidroxicinámicos y sus derivados: cafeico (9); caftárico (3) y cutárico (12). Flavanoles: procianidina B3 (5); (+)-catequina (6) y otras procianidinas desconocidas (8, 11 y 15). Flavonoles: miricetina (27); miricetina 3-glucósido (17); miricetina 3-galactosido (18); miricetina 3- glucósido (19); kaempferol 3-galactosido (20); kaempferol 3- glucósido (26); quercetina 3-galactosido (22); quercetina 3-glucósido (23) y quercetina 3- rhamnosido (25). Dihidroflavonoles desconocidos: (13, 14, 16, 21 y 24).

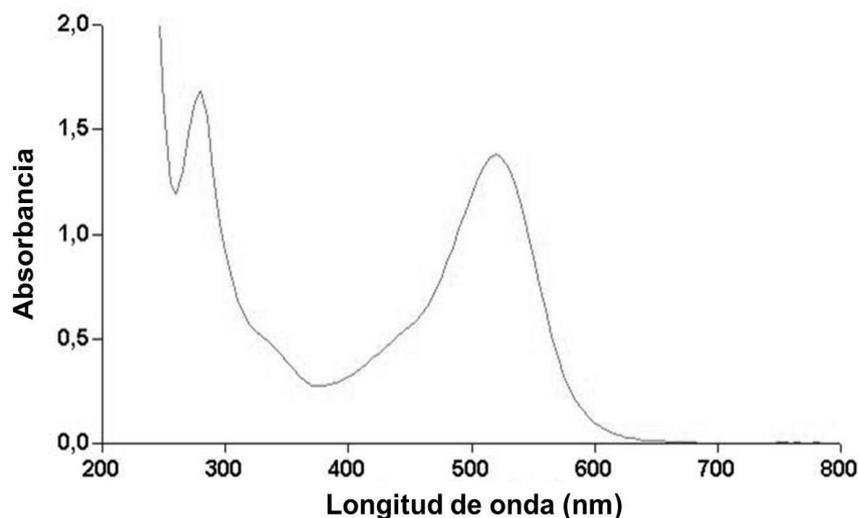


Figura A.10 Espectro de absorbancia de los compuestos fenólicos extraídos con la solución hidroalcohólica. El máximo de absorbancia a 280 nm corresponde a los polifenoles totales y a 520 nm a los antocianos.

Tabla A.1 Programa de elución utilizado en el HPLC-DAD para determinar el contenido y perfil de antocianos en hollejos.

Etapa	Tiempo (min)	Tasa de flujo (mL min ⁻¹)	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Solvente C (%)
0	0,5	1,1	96	4	0
1	12	1,1	85	15	0
2	10	1,1	85	15	0
3	13	1,5	70	30	0
4	1	1	0	0	100
5	4	1	0	0	100
6	1	1,1	96	4	0
7	4	1,1	96	4	0

Tabla A.2 Programa de elución utilizado en el HPLC-DAD para determinar el contenido y perfil de fenoles de bajo peso molecular en hollejos.

Etapa	Tiempo (min)	Tasa de flujo (mL min ⁻¹)	Solvente D (%)	Solvente E (%)	Solvente F (%)
0	0,5	0,8	100	0	0
1	55	0,9	20	80	0
2	2	1	10	90	0
3	13	1	10	90	0
4	10	1	0	100	0
5	45	1	0	100	0
6	1	0,8	0	0	100
7	4	0,8	0	0	100
8	2	0,6	100	0	0
9	8	0,6	100	0	0