

INFORME TÉCNICO

PROGRAMA FORMACION PARA LA PARTICIPACION

MODIFICACIÓN

CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre

"Estudio Biotecnológico del Desarrollo los Compuestos Fenólicos (antocianas, taninos y flavonoides) de la baya de *Vitis vinifera* en Relación con el Estado Hídrico del Viñedo"

Código

FP-V-2003-1- A -005

Entidad Responsable o Postulante Individual

Entidad Responsable: Ecole Nationale Superieure Agronomique Montpellier (ENSAM)

Postulante Individual: Irma Cristina Páez Quintero

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad)

País : Francia

Ciudad : Montpellier

Tipo o modalidad de Formación

Pasantía

Fecha de realización

02/05/03 -19/09/03

Participantes: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Nombre	Institución/Empresa	Cargo/Actividad	Tipo Productor (si corresponde)
Irma Cristina Páez Q	Viña Santa Rita	Asesora agricola	



1. Problema a Resolver

Determinar la manera en que el riego deficitario controlado influencia el desarrollo de los compuestos fenólicos de la baya de la uva vinífera, utilizando herramientas biotecnológicas.

2. Antecedentes Generales

La pasantía realizada en la Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (ENSAM), Francia, permitió a la participante alcanzar los objetivos propuestos para tal actividad, esto es, el descubrimiento de las nuevas técnicas biotecnológicas que se están desarrollando para el análisis de los compuestos fenólicos en la uva vinífera; la comprensión de la relación entre el riego deficitario, como estrategia para aumentar la calidad de los vinos, y el desarrollo de los fenoles.

Las experiencias logradas a lo largo de esta pasantía fueron las necesarias como para cumplir con los objetivos propuestos y alcanzar los resultados esperados.

Se analizó la influencia del riego sobre la fisiología de la baya *Vitis vinifera*, concentrándose especialmente en la relación entre el estado hídrico de las plantas y la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos en las bayas.

Se aprendieron técnicas de análisis biotecnológico de polifenoles utilizadas en viñedos franceses comerciales, desde hace aproximadamente 3 años, desarrolladas por escuelas de investigación especializadas tales como ENSAM.

3. Itinerario Realizado

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar
05/2003	Visita a los viñedos experimentales del ENSAM	Familiarizarse con los ensayos de riego deficitario controlado, aplicados para la temporada en las vides	Estación experimental. Pech Rouge, Gruissan, Narbone, Francia
18/05/2003	Recorrido laboratorios del Agro-Montpellier	Conocer los laboratorios para lograr la habituación necesaria para el trabajo posterior que se desarrollará en ellos	Agro-Montpellier



19/05/ 2003 a 09/09/ 2003	Viñedos experimentales	Aprendizaje del uso de la cámara de presión de Scholander como instrumento para cuantificar el grado de estrés en las plantas, sometidas a los diferentes tratamientos de riego deficitario	Agro-Montpellier
19/05/ 2003 a 09/09/ 2003	Tanto en terreno (viñedos) como en laboratorio	Análisis de la biosíntesis de compuestos fenólicos y del crecimiento de las bayas de <i>Vitis vinifera</i> de plantas sometidas a situaciones de estrés hídrico	Agro-Montpellier
11/09/ 2003 a 15/09/ 2003	Recorrido por los laboratorios de biotecnología de la U. De Montpellier	Conocer otros proyectos relacionados con el tema, en una sede distinta a la de la pasantía	Universidad de Montpellier
16/09/ 2003 a 19/09/ 2003	Recorrido por viñedos franceses con procedimientos biotecnológicos incorporados en la producción de vinos finos	Conocer en situaciones prácticas, la biotecnología aplicada en el sector productivo vitivinícola francés	Montpellier y alrededores

4. Resultados Obtenidos

1. El primer resultado obtenido durante la pasantía es el del aprendizaje de técnicas biotecnológicas para analizar el desarrollo de los compuestos fenólicos de la cutícula de *Vitis vinifera*, ya que estos compuestos son muy importantes en la producción de vino de calidad. Son responsables del color y la astringencia, antocianinas y taninos respectivamente, entre otras muchas cualidades de este producto. Logré aprender estas técnicas utilizadas en varias bodegas de vino francesas con el fin de traspasar este conocimiento a los viñedos comerciales chilenos, y de esta manera lograr que las empresas nacionales puedan tener una estrategia de cuantificación y análisis de estos compuestos desde la baya y así poder determinar con anticipación la calidad del vino proveniente de tal fruta. La descripción del protocolo para el análisis de estos compuestos hace parte de la tesis de doctorado en ENSAM del Sr.



Hernán Ojeda, publicada en el artículo de nombre: "Influence of Pre- and Postveraison Water déficit on Synthesis and Concentration of Skin Phenolic Compounds during Berry Growth of vitis vinifera cv. Shiraz" en la American Journal of Enology and Viticulture, número 53: 4 del año 2002.

A continuación una descripción detallada de la técnica aprendida:

- a. Muestreo de bayas: 100 bayas son elegidas al azar para luego ser pesadas individualmente y clasificadas en grupos. Posteriormente cada clase es caracterizada de acuerdo con su frecuencia. 10 bayas pertenecientes a la clase de mayor frecuencia son utilizadas para separar su cutícula y su pulpa para medir por la técnica de refractometría su contenido de sólidos solubles (en grados brix). La cutícula es guardada (-20°C) para los posteriores análisis de compuestos fenólicos.
- b. Extracción de los compuestos fenólicos: Los compuestos fenólicos fueron extraídos a una solución de acetona en agua 80% (v/v) en una concentración de 2.5% en tubos de centrifuga de 10 ml. Los tubos son agitados en un vortex por 5 minutos. Posteriormente los tubos son sonicados y centrifugados a 8000g por 10 minutos.
- c. Los taninos totales (TT) son cuantificados colorimétricamente con dimetilamino-cinmaldehído (DMAC). 200 µl de cada extracto (diluidos 1 en 6) se mezclan con 1 ml DMAC (0.1% DMAC en metanol-HCl 9:1, v/v) y se mide absorbancia a 640 nm con un espectrofotómetro (Unicam) después de 10 minutos del desarrollo del color a temperatura ambiente. La concentración de TT se expresa en mg (+) de catequina.
- d. Las proantocianidinas (taninos polimerizados) se determinan a partir del extracto de acetona por hidrólisis de proantocianidinas a antocianinas. Una alícuota de 100 µl de extracto (diluida 1 en 10) se mezcla con 900 µl de solución hidrolizante (50 mg $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 90 ml butanol; 10 ml HCl 12 N) y esta mezcla se mantiene en ebullición por 20 minutos. Una vez frías, las proantocianidinas son determinadas por absorbancia a 550 nm y expresadas en mg de cianidina clorada equivalentes.
- e. Para la extracción de las antocianinas 100 µl del extracto se mezclan con 900 µl de acetona en agua (80%). Las antocianinas son cuantificadas por su absorbancia a 547 nm y expresadas en equivalentes de malvidina cloradas.

عقود
عقود



- f. El grado de polimerización se calcula a partir de la fórmula: $[(PA/TT) + 1]$. Un incremento en el índice significa un aumento en el grado de polimerización de los taninos.

Los resultados de los análisis de compuestos fenólicos están incluidos en el anexo adjunto a las actividades de difusión en formato power point. Esta presentación fue dada a conocer durante el último congreso de viticultura y enología latinoamericano realizada en Santiago en Noviembre del año pasado.

2. El segundo resultado obtenido es la comprensión de la influencia del riego sobre el desarrollo de los compuestos fenólicos de *Vitis vinifera*. De los tratamientos de riego realizados durante la temporada 2003 en Francia, se pueden extraer como conclusiones que:
 - a. Todos los tratamientos de riego deficitario que incluían un estrés hídrico redujeron el peso de la baya (al comparar con bayas control provenientes de plantas no sometidas a estrés hídrico a lo largo de toda la temporada), aumentando de esta forma la relación cutícula / pulpa, y favoreciendo además un aumento en la concentración de antocianinas, taninos totales y taninos polimerizados de la cutícula.
 - b. Los tratamientos de riego más exitosos al evaluar la calidad de la baya (esto es, al analizarlas de acuerdo con su concentración de compuestos fenólicos por la técnica ya expuesta) incluían un estrés hídrico provocado en la planta de rango medio, entre las etapas fenológicas de floración y pinta, y un estrés hídrico de nivel fuerte post-pinta y mantenido hasta la cosecha.
 - c. Las estrategias de riego deficitario que incluían un nivel de estrés hídrico fuerte entre las etapas fenológicas de floración y pinta bloquearon la síntesis de compuestos fenólicos de la baya, afectando la calidad global de ella.

De tal forma, es posible modificar la calidad de un vino, a través de la elección de estrategias de riego adecuadas. De acuerdo con la propuesta aceptada por FIA, el resultado esperado correspondiente enunciaba: "Colaborar con los productores nacionales para encontrar estrategias de riego óptimas para la obtención de vinos de alta calidad...". De acuerdo con lo anterior debo mencionar que he sido contratada 1 mes después de mi arribo de Francia por 2 viñedos comerciales (viña Santa Rita S.A. y viña Luis Felipe Edwards) para implementar en sus empresas ensayos de riego deficitario para aplicar lo aprendido durante esta experiencia y así cumplir con el objetivo planteado a FIA.

3. El tercer resultado obtenido está relacionado con el aprendizaje de la manipulación de la bomba de presión de Scholander como instrumento de

apoyo para cuantificar el grado de estrés hídrico en el cual se quiere mantener las plantas, de acuerdo con un determinado régimen de riego deficitario. Este instrumento fue utilizado en los viñedos experimentales de ENSAM, Francia, para cuantificar el nivel de estrés aplicado a las vides de acuerdo a los diferentes tratamientos de riego deficitario planificados.

La bomba de Scholander tiene como objetivo ser un instrumento capaz de cuantificar el estado hídrico de las plantas a través de la medición del potencial hídrico foliar. De esta forma, a menor potencial (más negativo) mayor estrés hídrico presentará la planta. La bomba está conectada a un balón que contiene nitrógeno gaseoso que ejercerá presión sobre la hoja para hacer salir por su peciolo una gota de agua: a mayor presión necesaria ejercida para que salga la primera gota de agua del peciolo, más estresada estará la planta. Así, el estrés hídrico puede ser cuantificado, regulado y reproducido.

Una breve descripción de la utilización de la bomba de Scholander es la siguiente:

Seleccionar los cuarteles donde van a realizarse los ensayos, marcándolos debidamente en el terreno para hacer fácil su identificación.

En la bomba chequear que la bombona pequeña tenga el suficiente gas (nitrógeno) para trabajar (al abrir la llave de la bombona), esto es, mínimo 100 libras de presión (cuando se llegue a este valor debe recargarse haciendo uso de un transvasijador).

En la bomba, regular la cantidad de gas se deja salir hacia la cámara con la llave dispuesta para ello, la presión debe estar entre las 250 y 300 libras.

Muestreos: elegir plantas al azar seleccionando hojas de tamaño mediano de las partes centrales de la espaldera y cercanas al racimo. **UNA VEZ CORTADA LA HOJA DE LA PLANTA SE CUENTA CON 2 MINUTOS COMO MÁXIMO PARA REALIZAR LA MEDICIÓN.**

Con una navaja seccionar un trozo del extremo del peciolo de la hoja. Colocar la hoja dentro de la cámara destinada para ello, dejando salir de ella 2 centímetros de peciolo aproximadamente. Cerrar bien la cámara. Haciendo uso de una linterna y una lupa colocada unos centímetros sobre el peciolo, preparase para medir el potencial hídrico.

Abrir la llave que permite el paso del nitrógeno hacia la cámara muy lentamente, a una velocidad no mayor de 1 bar por segundo. Al aparecer la primera gota de agua por el peciolo de la hoja, anotar el valor y cerrar la llave de paso del nitrógeno hacia la cámara (tener especial cuidado con anotar inmediatamente ya que la aguja que marca la presión tiende a bajar con el tiempo y puede llevar a errores en la medición).



Una vez realizada la medición, debe abrirse la llave que permite la salida del gas hacia el exterior. La aguja del manómetro localizada en la cámara debe marcar 0 bares. Abrir la cámara y desechar la hoja utilizada. Se está listo para la segunda medición

Una vez finalizadas las mediciones, debe cerrarse la llave de salida de nitrógeno desde la bombona. La aguja seguirá marcando presión debido a que hay nitrógeno en la manguera que conecta la bombona con la cámara. Para liberar el gas deben abrirse las 2 llaves de la cámara, allí todos los manómetros deben marcar cero. Puede entonces guardarse la cámara.

NOTA: se recomienda hacer las mediciones entre las 4 a.m. y 6 a.m. ANTES DE LA SALIDA DEL SOL

5. Aplicabilidad:

En Chile la industria vitivinícola está en pleno expansión conquistando cada vez más el mercado tanto nacional como internacional. Sin embargo, Chile a pesar de ser el sexto país exportador de vino (fuente:) aun no invierte los suficientes recursos en investigación y tecnología, como sí lo hacen países como Australia y Nueva Zelanda, países productores del nuevo mundo, los competidores directos de Chile en el mercado. Francia en cambio, es un país ya consolidado en el mercado del vino, abalado siempre por sus años de tradición como país productor. No obstante, Francia es consciente de que la competencia es cada vez mayor con la incorporación de nuevos países productores, y es por esta razón que ha desarrollado alta tecnología en la producción de sus productos. Por otro lado, los empresarios también destinan gran parte de sus ganancias en investigación.

La **incorporación** de los conocimientos adquiridos en ENSAM, Francia **ya está en marcha**. Las Viñas Santa Rita S.A. y Luis Felipe Edwards, ambas del Valle de Colchagua, han iniciado sus ensayos de riego deficitario en sus terrenos, contratándose como asesora, y han realizado la implementación de sus laboratorios para incorporar las técnicas necesarias para el análisis de compuestos fenólicos. Cada viña ha invertido aproximadamente 8 millones de pesos para el estudio, dinero que ha sido obtenido a partir de sus propios recursos particulares, entendiendo que Chile debe incorporar tecnología en su industria.

En cuanto a la bomba de Scolander, la viña Santa Rita S.A. cuenta con 4 de ellas, las cuales se encuentran siendo utilizadas en 4 de sus 6 campos como

herramienta de apoyo para las decisiones de riego. La Viña Montes, Undurraga, casa Lapostolle, Viu manent y muchas otras del valle de Colchagua también cuentan con por lo menos un ejemplar. Sin embargo, el grado de estrés óptimo en las plantas y el momento en el cual darlo sigue siendo un punto de discusión y de búsqueda para los viticultores chilenos. Mi trabajo actual en las viñas Luis Felipe Edwards y Santa Rita consiste en la realización de ensayos de riego, que incluyen las técnicas ya probadas en Francia, para intentar dilucidar una estrategia de riego que permita lograr una buena calidad de baya y que tales características se traduzcan en el vino. Para lograr tal objetivo, hago uso de la bomba de Scholander, cuya manipulación aprendí durante mi pasantía. También he realizado varias capacitaciones para enseñar la utilización de tal instrumento, el cual sin duda, se convertirá en un punto de partida para diseñar las estrategias de riego de la mayoría de las viñas chilenas.

6. Contactos Establecidos: presentación de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
ENSAM	Alain Deloire	Profesor viticultura		2 Place Viala (34060), Montpellier, Cedex 2, Francia	deloire@ensam.inra.fr
ENSAM-INRA	Alain carbonneau	Profesor viticultura. Presidente de la sociedad Mundial de viticultura		2 Place Viala (34060), Montpellier, Cedex 2, Francia	carbonne@ensam.inra.fr
ENSAM, Gruissan (Pech rouge)	Hernán Ojeda	Investigador		11430 Gruissan, Francia	ojeda@ensam.inra.fr

7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar

El aporte principal de esta pasantía es poder incorporar tanto como las técnicas de análisis de los compuestos fenólicos a los viñedos comerciales chilenos, como la implementación de ensayos de riego deficitario controlado que permitan encontrar para



cada región-terroir, la estrategia que entregue la mayor cantidad y calidad de compuestos fenólicos que logren un mejor vino.

Se podrían realizar charlas y entrenamientos a productores nacionales masivos para incorporarlos dentro de los aportes de esta pasantía. Por el momento como ya se mencionó anteriormente estoy desarrollando 2 asesorías a viñas comerciales para implementar lo aprendido en Francia.

8. Resultados adicionales

Aparte de aprender las técnicas de análisis de compuestos fenólicos tanto en las bayas como en el vino y comprender como el riego influencia su biosíntesis, logré aprender a utilizar un instrumento denominado: "cámara de presión de Scholander" que es ampliamente utilizado por los viticultores para determinar a través de mediciones en hojas de vides, el estado hídrico de las plantas. Con esta cámara es posible cuantificar el estrés hídrico sufrido por las parras y monitorear las plantas para mantenerlas en un nivel hídrico específico. Hoy en día muchas viñas comerciales chilenas han comprendido la utilidad del instrumento y lo han adquirido para utilizarlo en la toma de decisiones de riego. Viñedos como Undurraga, Montes, Morandé, Santa Rita y Luis Felipe Edwards ya realizan mediciones diarias, y muchas otras están en vías de incorporarla.

9. Aspectos Administrativos

9.1 Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo

muy difícilosa sin problemas algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

b. Apoyo de la Entidad Responsable

bueno regular malo

(Justificar)

c. Información recibida durante la actividad de formación

amplia y detallada aceptable deficiente



d. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

 x bueno regular malo

e. Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

9.2. Organización durante la actividad (indicar con cruces)

Ítem	Bueno	Regular	Malo
Recepción en país o región de destino	x		
Transporte aeropuerto/hotel y viceversa			
Reserva en hoteles			
Cumplimiento del programa y horarios	x		

10. Conclusiones Finales

La pasantía realizada en ENSAM, cumplió con sus principales objetivos de aprender los usos biotecnológicos aplicados por la industria del vino en naciones que los han incorporado en su producción, en este caso Francia, ya que el participante incorporó en su conocimiento las técnicas de análisis de compuestos fenólicos tanto en bayas, como en el vino; También se comprendió como las estrategias de riego pueden modificar la fisiología de la vid, pudiendo aprovechar este conocimiento para lograr vinos de calidad. Esta pasantía ha logrado que el participante alcance un mayor conocimiento en el área vitivinícola, y que por esta razón empresas particulares estén interesadas en invertir en la innovación tecnológica del rubro.

Fecha: 18/03/2004

Nombre y Firma coordinador de la ejecución: _____