

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 Supérieure 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 agrícola	

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, Narbonne, 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	Establecimiento de los distintos tratamientos de riego para la temporada. Aprendizaje y 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 del uso de la cámara de Scholander para monitorear el estado hídrico de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de déficit hídricos.

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.

Existen distintas maneras de cuantificar el estado hídrico de las plantas a través de mediciones con la bomba de Scholander. Entre ellas, existe el potencial hídrico foliar, el potencial xilemático y el potencial hídrico base. Este último se diferencia de los otros dos principalmente por la hora en la que es medido: antes de la salida del sol, periodo que coincide con la mínima evapotranspiración de la planta. Durante esta pasantía se midió el potencial hídrico base de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos de riego.

2. Los diferentes tratamientos hídricos aplicados en la variedad syrah fueron los siguientes: cuatro tratamientos de riego deficitario mas un control (C), con tres repeticiones cada uno. Los tratamientos consistieron de 2 niveles de déficit hídrico temprano entre floración y pinta (T1 = fuerte, T2 = medio), un déficit hídrico fuerte tardío entre pinta y cosecha (T3) y un tratamiento

Combinado: déficit medio entre floración y pinta, y déficit fuerte entre pinta y cosecha (T4).

La aplicación de agua a cada régimen hídrico fue determinada como un porcentaje del total de agua aplicada al control. El riego del control fue estimado de acuerdo con su evapotranspiración (Tabla 1).

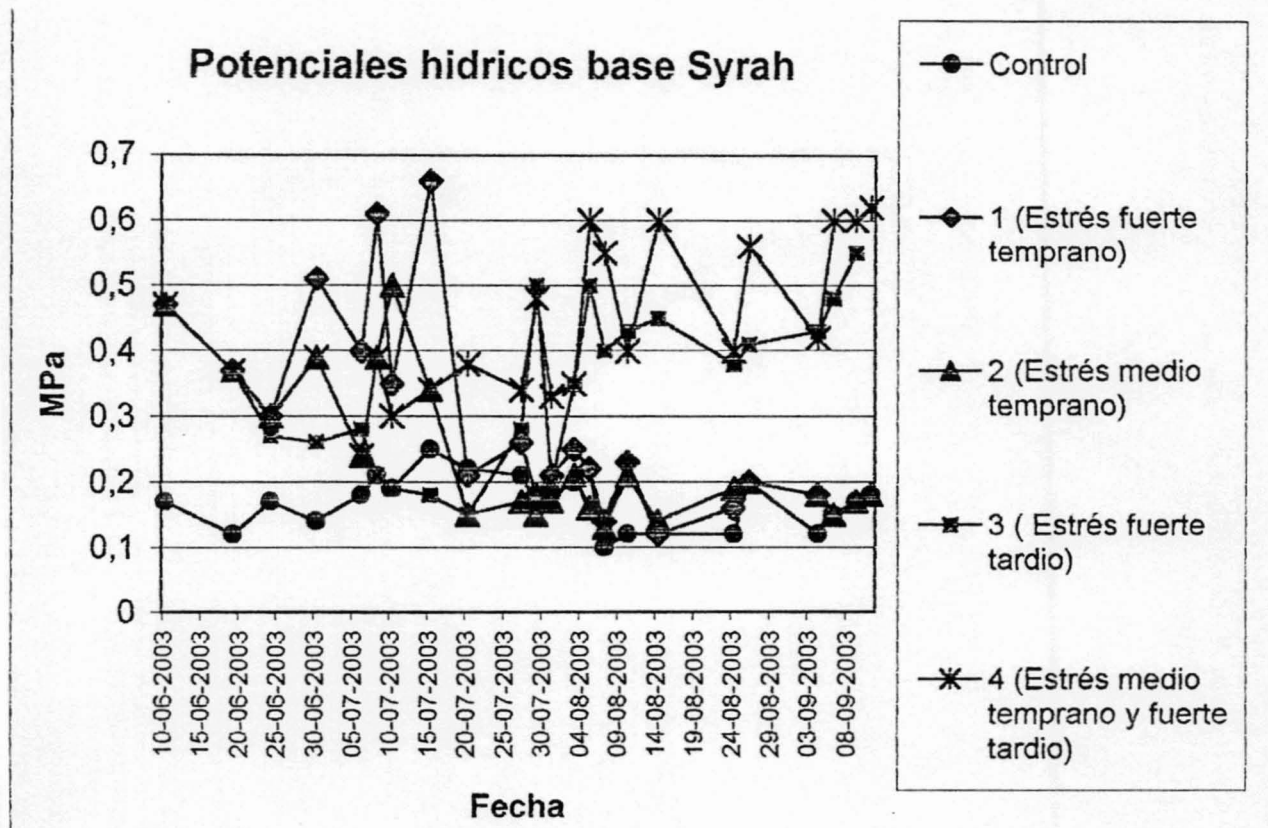
Tabla 1 Programas de riego correspondientes a los diferentes tratamientos de déficit hídrico para el cv. syrah

Tratamiento ^a	Periodo				Ψ_b
	Yemación – floración	Floración – pinta	Pinta – cosecha		
C	100 ^b	100	100	0 a -0.2 Mpa	
T1	100	30	100	-0,4 a -0,6 Mpa / 0 a -0,2 Mpa	
T2	100	50	100	-0,2 a -0,4 Mpa / 0 a -0,2 Mpa	
T3	100	100	30	0 a -0.2 Mpa / -0,4 a -0,6 Mpa	
T4	100	50	30	-0,2 a -0,4 Mpa / -0,4 a -0,6 Mpa	

^aC = Control; T1 = Déficit fuerte temprano entre floración y pinta; T2 = Déficit medio temprano entre floración y pinta; T3 = Déficit fuerte tardío entre pinta y cosecha; T4 = Déficit combinado: medio entre floración y pinta y fuerte entre pinta y cosecha.

^bPorcentaje de agua aplicada en relación a la evapotranspiración real de C.

3. Las mediciones de potencial hídrico base asociadas a los distintos tratamientos de riego a lo largo de la temporada se muestran en el siguiente gráfico:



4. Para analizar la influencia del riego deficitario sobre el desarrollo fisiológico de la baya de *vitis vinífera* cv. syrah, se realizaron muestreos de bayas periódicos (cada 10 días aproximadamente). Estos muestreos eran realizados completamente al azar. 100 bayas para cada repetición de cada tratamiento, eran pesadas en cada fecha de muestreo. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Peso de baya individual

	Control	T1	T2	T3	T4
Fecha	Peso baya (g)	Peso baya (g)	Peso baya (g)	Peso baya (g)	Peso baya (g)
22-07-2003	1,51a	1,17b	1,22b	1,61a	1,07b
31-07-2003	1,63a	1,27b	1,27b	1,70a	1,15b
09-08-2003	1,60b	1,35d	1,52c	1,77a	1,25e
19-08-2003	1,51b	1,27d	1,41c	1,68a	1,32d
28-08-2003	1,33b	1,23c	1,26c	1,45a	1,25c
12-09-2003	1,26b	1,23b	1,24b	1,44a	1,18b

Como puede observarse en la tabla 2, el menor peso máximo de baya fue alcanzado por el tratamiento 4 correspondiente a un estrés hídrico temprano medio y uno fuerte tardío (post-pinta). Los pesos máximos de baya correspondieron al control y al tratamiento 3. Este último no incluía ningún estrés hídrico antes de pinta (temprano).

5. La relación existente entre el desarrollo de los compuestos fenólicos de la cutícula de *Vitis vinífera* cv. syrah y el riego deficitario controlado, fue analizado en esta pasantía. Los compuestos fenólicos son muy importantes en la producción de vino de calidad. Son responsables del color y la astringencia, antocianas y taninos respectivamente, entre otras muchas cualidades de este producto. 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 vinífera* 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

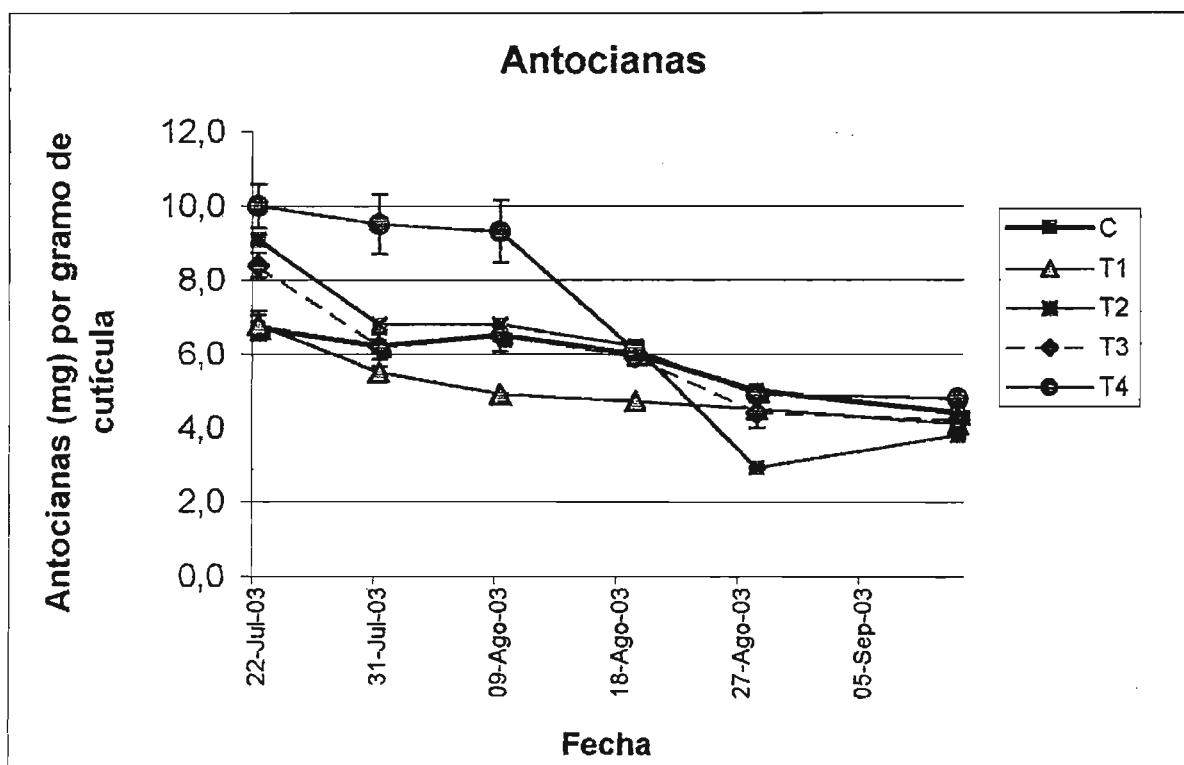
cada clase es caracterizada de acuerdo con su frecuencia. 10 bayas pertenecientes a la clase de mayor frecuencia son utilizadas para separar su cutícula y su pulpa para medir por la técnica de refractometría su contenido de sólidos solubles (en grados brix). La cutícula es guardada (-20°C) para los posteriores 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. 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.
- d. Los taninos totales (TT) son cuantificados colorimétricamente con dimetilamino-cinmaldehído (DMAC). 200 µl de cada extracto (diluidos 1 en 5) 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.
- e. 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.

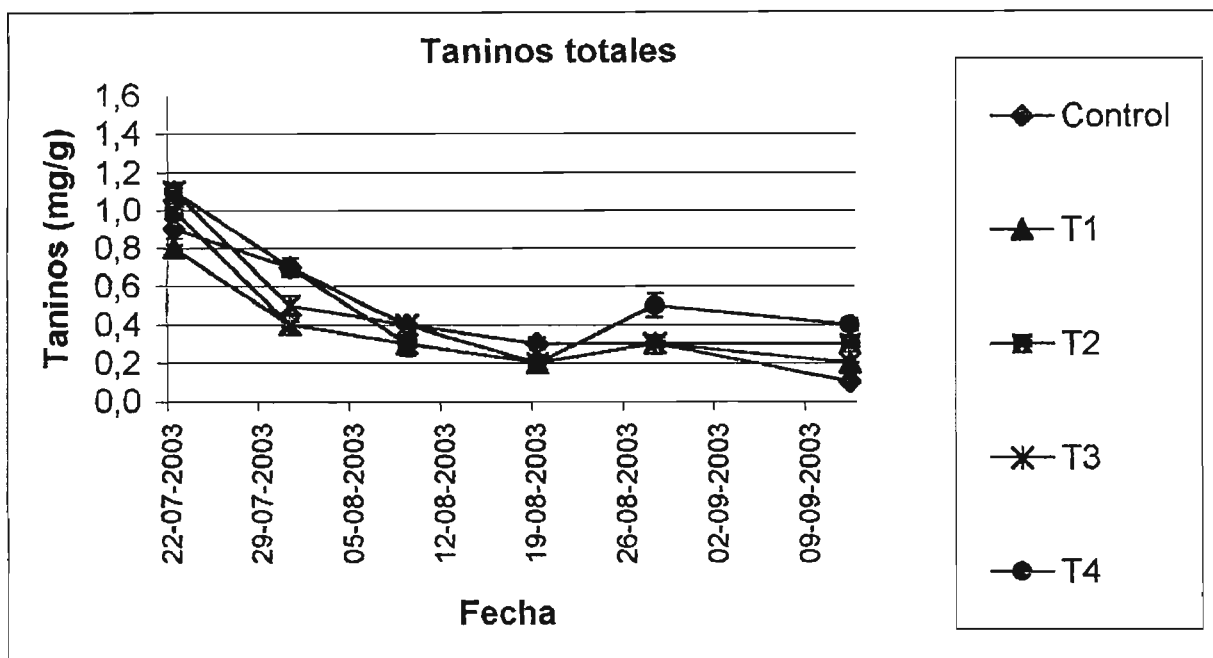
Los resultados de los análisis de compuestos fenólicos se muestran a continuación:

i) Desarrollo de antocianinas:



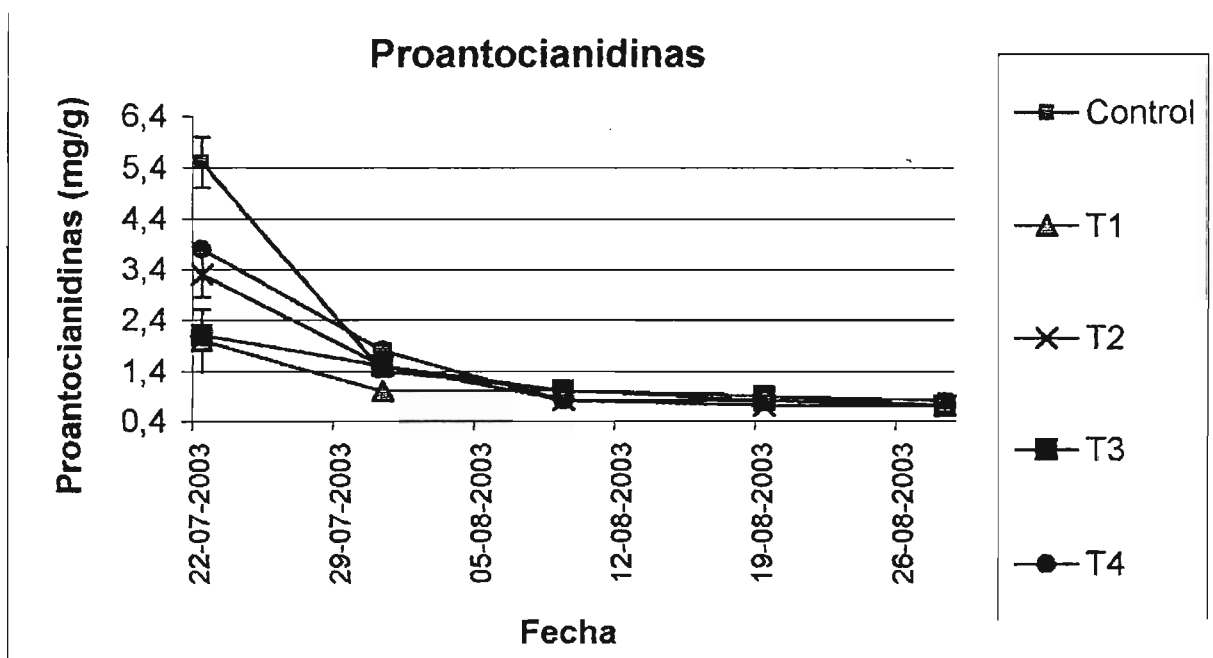
En el gráfico se observa que en todos los tratamientos de riego la concentración de antocianinas en la cutícula disminuyó con el tiempo. La mayor concentración de este compuesto fue alcanzada por las bayas del tratamiento 4 (estrés temprano medio y fuerte tardío). Sin embargo, al final del experimento, y con la deshidratación de la baya (pérdida de peso) los tratamientos fueron haciéndose cada vez más similares hasta llegar a no tener diferencias significativas.

ii) Desarrollo de taninos totales:



Los taninos totales fueron disminuyendo con el desarrollo de la baya sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos.

iii) Desarrollo de proantocianidinas (taninos polimerizados):



Las proantocianidinas, al igual que los taninos totales, disminuyeron con el desarrollo de la baya sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos al final de la temporada.

5. Conclusiones

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 temprano, es decir, antes de pinta, 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 en la baya.
- 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 (tratamiento 4).
- 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.

6. 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: www.chilevid.cl) 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, la 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 Scholander, 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.

7. 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

8. 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.

9. Aspectos Administrativos

9.1 Organización previa a la actividad de formación

a. Conformación del grupo

_____ muy difícil _____ sin problemas _____ algunas dificultades

(Indicar los motivos en caso de dificultades)

b. Apoyo de la Entidad Responsable

 x bueno _____ regular _____ malo

(Justificar)

c. Información recibida durante la actividad de formación

 x 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 la participante incorporó en su conocimiento las técnicas de análisis de compuestos fenólicos en la baya de *Vitis vinifera* como una medida que permite predecir la calidad del vino resultante de forma anticipada; 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: 15/06/2004

Nombre y Firma coordinador de la ejecución:



AÑO 2004