



Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y
del Medio Natural

**Estudio de la composición polifenólica de pepitas de
uvas de la variedad Monastrell, sometidas a
distintas condiciones de riego**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso académico: 2017-2018

ALUMNO: Javier Mengod Bautista

TUTORA: Victoria Lizama Abad

Valencia, 9 de julio de 2018

Resumen

Distintas estrategias de riego llevadas a cabo durante el periodo de maduración sobre uvas de la variedad Monastrell han sido evaluadas a fin de encontrar los efectos que provocan diferentes niveles de agua suministrada y diferentes composiciones de sales minerales sobre la composición polifenólica de las pepitas y las características del grano. Posteriormente a la vendimia, se realizaron diferentes determinaciones en las bayas y los extractos de sus pepitas y se analizaron estadísticamente, obteniéndose el peso de las 100 bayas, el peso de las pepitas de las 100 bayas, la concentración de taninos condensados totales, la concentración de catequinas y el índice de polifenoles totales. Además, mediante técnicas HPLC se llevó a cabo el análisis y cuantificación del grado medio de polimerización de taninos condensados. Todo ello para establecer la influencia de las estrategias sobre la composición polifenólica de las pepitas.

Palabras clave: pepitas, taninos, catequinas, riego, Monastrell, HPLC

Resum

Distintes estratègies de reg portades a terme durant el període de maduració sobre raïm de la varietat Monastrell han sigut evaluades a fi de trobar els efectes que provoquen diferents nivells d'aigua suministrada i diferents composicions de sals minerals sobre la composició polifenòlica de les llavors i de les característiques del gra. Posteriorment a la verema, es realitzaren diferents determinacions en les baies i els extractes de les llavors i s'analitzaren estadísticament, obtenint-se el pes de les 100 baies, el pes de les llavors i la concentració de tanins condensats totals, la concentració de catequines i l'índex de polifenols totals. Además, mitjançant tècniques HPLC es va portar a terme l'anàlisi i quantificació del grau mitjà de polimerització de tanins condensats. Tot això per tal d'establir la influència de les estratègies sobre la composició polifenòlica de les llavors.

Paraules clau: llavors, tanins, catequines, reg, Monastrell, HPLC

Abstract

Different irrigation strategies carried out during the ripening period on grapes of the Monastrell variety have been evaluated in order to find the effects that cause different levels of water supplied and different compositions of mineral salts on the polyphenolic composition of the seeds and the characteristics of grain. After the harvest, different determinations were made on the berries and the extracts of their seeds and were analyzed statistically, obtaining the weight of the 100 berries, the weight of the seeds of the 100 berries, the concentration of catechins, the concentration of total condensed tannins and the total polyphenol index. In addition, the analysis and quantification of the average degree of polymerization of condensed tannins have been carried out using HPLC techniques. All this to establish the influence of the strategies on the polyphenolic composition of the seeds.

Keywords: seeds, tannins, catechins, irrigation, Monastrell, HPLC

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora Victoria Lizama Abad por su dedicación, confianza y orientación, ya que sin ella no habría sido capaz de llegar donde estoy.

En segundo lugar, agradecer a mi familia, especialmente a mi hermano, por estar siempre a mi lado y enseñarme el camino para conseguir mi sueño.

Y por último, agradecer a la universidad por transmitirme durante estos 4 años conocimientos y valores los cuales me han hecho sentir realizado.

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto de investigación financiado por Mineco-FEDER Estrategias para mitigar los efectos del estrés hídrico severo en la viticultura de clima cálido y árido del sureste de España AGL 2014-54201-C4-4-R

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. El cultivo de la vid	7
1.2. Variedad Monastrell.....	7
1.3. Composición polifenólica de la uva tinta	8
1.4. Influencia de la cantidad de agua suministrada a los viñedos y su composición en sales minerales sobre los granos de uva, la producción y la composición y síntesis de compuestos polifenólicos.....	9
2. Objetivos	11
3. Plan de trabajo.....	12
4. Materiales y métodos	14
4.1. Características de la parcela de estudio.....	14
4.2. Obtención del extracto a partir de las pepitas de las bayas	15
4.3. Determinaciones espectrofotométricas.....	15
4.3.1. Determinación del índice de polifenoles totales (IPT).....	15
4.3.2. Determinación de taninos condensados totales	16
4.3.3. Determinación de catequinas.....	16
4.4. Determinación con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	17
4.4.1. Estimación del grado medio de polimerización de proantocianidinas	17
4.5. Tratamiento estadístico	17
5. Resultados y discusión	19
5.1. Efecto de los distintos tratamientos sobre el peso de 100 bayas, el peso de las pepitas de 100 bayas y la composición del extracto de pepitas.....	19
5.2. Efecto de la cantidad de agua de riego suministrada sobre el peso de 100 bayas, el peso de las pepitas de 100 bayas y la composición del extracto de las pepitas.	21
5.3. Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el peso de 100 bayas, el peso de las pepitas de 100 bayas y la composición del extracto de las pepitas.	24
5.4. Interacción entre la calidad del agua aplicada y el régimen de riego.....	26
5.5. Análisis del grado medio de polimerización (mDP) de proantocianidinas del extracto de las pepitas mediante cromatografía en fase líquida de alta eficacia (HPLC).....	28
6. Conclusiones	32

7. Bibliografía	33
-----------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los monómeros que conforman los taninos.....	9
Figura 2. Distribución de los tratamientos llevados a cabo en el viñedo	12
Figura 3. Instantánea aérea de la parcela de estudio	14
Figura 4. Instantánea de una de las cepas de la parcela de estudio.	14

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos aplicados en el estudio.	13
Tabla 2. Promedio y desviación típica del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según el tratamiento aplicado.	19
Tabla 3. Promedio y desviación típica de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según el tratamiento aplicado.	20
Tabla 4. Promedio y desviación típica de la concentración de catequinas de pepita en uvas y pepitas e IPT de pepitas según el tratamiento aplicado.	21
Tabla 5. Promedio y desviación típica del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según la cantidad de agua de riego aplicada.....	22
Tabla 6. Promedio y desviación típica de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según la cantidad de agua de riego aplicada.....	23
Tabla 7. Promedio y desviación típica de la concentración de catequinas de pepita en uvas y pepitas e IPT de pepitas según la cantidad de agua de riego aplicada.....	23
Tabla 8. Promedio y desviación típica del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.	24
Tabla 9. Promedio y desviación típica de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.	25
Tabla 10. Promedio y desviación típica de la concentración de catequinas de pepita en uvas y pepitas e IPT de pepitas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.	25
Tabla 11. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según el tratamiento aplicado.	26
Tabla 12. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según el tratamiento aplicado.	27
Tabla 13. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego de la concentración de catequinas de pepita en uvas e IPT de pepitas según el tratamiento aplicado.	27
Tabla 14. Promedio y desviación típica del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio (aMW) de proantocianidinas del extracto de pepitas según el tratamiento aplicado.	29
Tabla 15. Promedio y desviación típica del grado medio de polimerización (mDP ₉), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio (aMW) de proantocianidinas del extracto de pepitas según la cantidad de agua aplicada.	29

Tabla 16. Promedio y desviación típica del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio (aMW) de proantocianidinas del extracto de pepitas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.	30
Tabla 17. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio(aMW) de las proantocianidinas del extracto de hollejos según el tratamiento aplicado.	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cultivo de la vid

La actividad vitivinícola tuvo su origen hace más de 5.000 años a.C. en Oriente Medio y en el sector más Oriental del Mar Mediterráneo. En estas zonas se desarrollaba una agricultura muy favorable gracias al clima Mediterráneo cultivándose los tres productos básicos: trigo, vid y olivo (Unwin, 2001).

Con el avance de los diferentes pueblos que habitaban el Mediterráneo, al igual que sus tradiciones, cultura y arquitectura, se fueron trasladando sus costumbres y con ello el consumo del vino. De esta forma los viñedos penetraron en la Galia, en la Península Ibérica y en el resto de Europa. En un primer momento se localizaron cerca de las zonas costeras y de los ríos ya que de esta forma su transporte era más fácil y más barato, y permitió establecer rutas comerciales entre diferentes territorios. Así comenzó la existencia de una actividad vitivinícola que se ha ido consolidando con el paso de los años constituyendo un factor clave en el tejido económico del medio rural de muchos municipios europeos, pero sobre de todo de tres países: Francia, Italia y España (Fernández, 2013).

Actualmente, según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) la viticultura es muy importante a nivel mundial, y en relación con los datos presentados en 2016 la superficie vitícola mundial se sitúa en 7.500.000 hectáreas, donde cinco países suponen el 50% de la superficie mundial de viñedo: España (13%), China (11%), Francia (10%), Italia (9%) y Turquía (6%) (OIV, 2017).

Los datos de a OIV muestran una producción mundial de uva de 75,8 millones de toneladas en 2016, de las cuales el 39% del total se producen en Europa, el 34% en Asia y el 18% en América, que incluye tanto la producción de uvas de vinificación como las uvas de mesa y las uvas pasas. En 2015, de los 73,5 millones de toneladas de uvas, 39,6 millones fueron uvas de vinificación, mientras que los 33,9 millones restantes fueron uvas de mesa y pasas. La producción mundial de vino (sin incluir el mosto), se estima en 2016 en 267 millones de hectolitros. Italia se mantiene en 2016 como el primer productor mundial de vino, con 50,9 millones de hectolitros, seguido de Francia con 43,5 millones de hectolitros y de España, con 39,3 millones de hectolitros (OIV, 2017).

España contiene 951.693 hectáreas plantadas en todas sus comunidades autónomas siendo Castilla La Mancha la principal región productora con más de un 60% del total, seguida de Extremadura, Cataluña y Valencia (FEV, 2018).

1.2. Variedad Monastrell

Es la tercera variedad más plantada en el territorio español con presencia significativa en el Este y Sur este de nuestro país y la segunda en importancia después del tempranillo en lo que se refiere a uva tinta.

Su sabor varía en función de la zona y aunque los más conocidos provienen del sur de Francia, se ha ido extendiendo en Bandol, Australia, California o el Ródano, debido al clima cálido que requiere para su perfecta maduración. En cuanto a España Jumilla, Bullas, Yecla en Murcia y Alicante y el Ampurdán son sus zonas de cultivo (Martínez y Medina, 2008).

Sus racimos son pequeños y bastante compactos, con bayas esféricas y de tamaño mediano, de oscura coloración y gran riqueza en azúcares y en otros componentes nobles del extracto. Es una variedad de gran rusticidad, elevada resistencia a la sequía y necesita buena insolación (Juarez et al., 2008)

El vino tinto joven Monastrell es de color rubí intenso con tonalidades violetas. Su alta capacidad oxidativa produce vinos con una buena graduación alcohólica, ligeramente secos y carnosos. También es una variedad con la que se elaboran buenos vinos rancios dulces.

1.3. Composición polifenólica de la uva tinta

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes presentes en el reino vegetal. Poseen una estructura característica formada por un anillo aromático de benceno con uno o más grupos hidroxilos sustituyentes (Weisshaar y Jenkins, 1998).

Su importancia en enología es muy significativa ya que están presentes en las uvas y su función es esencial en los factores que determinan las propiedades sensoriales del vino al ser responsables de sus propiedades organolépticas más importantes como el aroma, color, sabor, amargura o astringencia (Scalbert, 1993). Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas y en las pepitas siendo su concentración baja en la pulpa y el raspón (Hidalgo et al., 2004).

Estos compuestos se agrupan según su estructura química en dos grandes grupos: fenoles flavonoides y fenoles no flavonoides. Los flavonoides se caracterizan por presentar dos anillos de 6 carbonos unidos por un heterociclo central de 3 carbonos (C6-C3-C6). Dentro de este grupo los flavonoles y los antocianos son los componentes con una mayor relevancia.

Los flavonoles o taninos condensados están presentes en hollejos y semillas y su importancia radica en el amargor y astringencia que proporcionan al vino. Tienen como base la (+) catequina, la (-) epicatequina la (-)-epicatequina-3-O-galato o la epigalocatequina y el número de unidades determinan el tamaño del tanino (Kennedy y Jones, 2001). Las estructuras de los monómeros que conforman los taninos aparecen en la **Figura 1**. Su tamaño es directamente proporcional a la intensidad de la astringencia, pero inversamente proporcional a la intensidad del amargor, siendo el tanino más astringente pero menos amargo a medida que aumenta su tamaño hasta alcanzar un tamaño en el que no son solubles por lo que las proteínas de la saliva no reaccionan y dejan de producir la sensación de astringencia. (Peña, 2009).

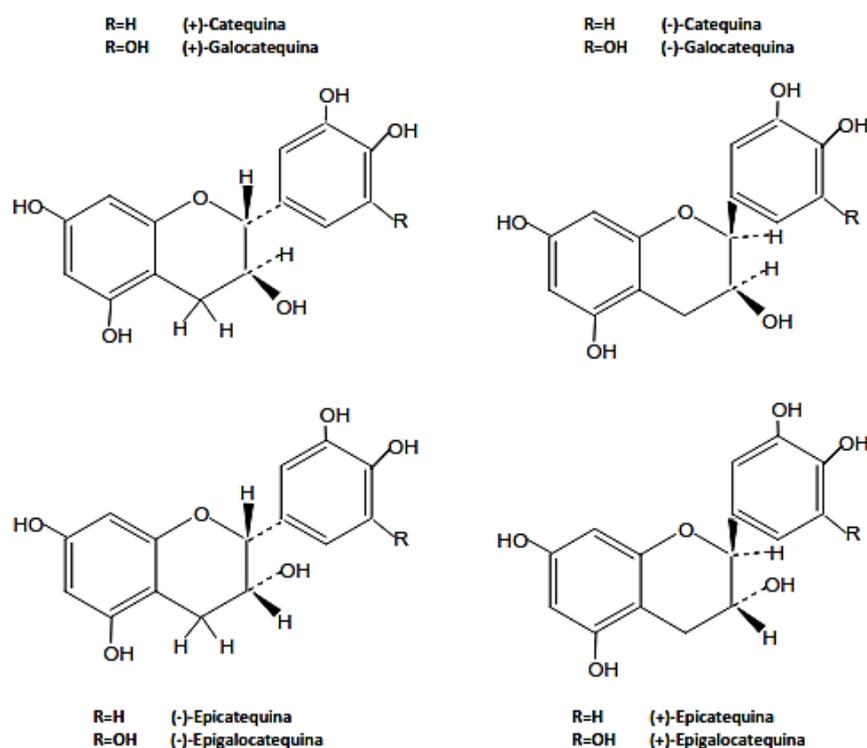


Figura 1. Estructura de los monómeros que conforman los taninos

Los antocianos son pigmentos naturales responsables del color rojizo de uvas y vinos se encuentran en los hollejos y de forma excepcional en el mesocarpio de variedades tintoreras. Son 3- glucósidos y tienen como base 5 gliconas que difieren en su patrón de sustitución en el anillo B (Francis, 1989).

Por otro lado, el grupo de los no flavonoides se caracterizan por presentar sólo un anillo de 6 carbonos (C6). Dentro de este grupo destacan los ácidos benzoicos (C6-C1) como el ácido gálico o el ácido catecol, y los ácidos cinámicos (C6-C3) como el ácido cafeico, el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico. La relevancia de los ácidos benzoicos reside en su relación con el gusto amargo de los vinos. A su vez, los ácidos cinámicos resultan importantes por su relación con el pardeamiento y de forma menos notable por su participación en el gusto amargo (Peña, 2009).

1.4. Influencia de la cantidad de agua suministrada a los viñedos y su composición en sales minerales sobre los granos de uva, la producción y la composición y síntesis de compuestos polifenólicos

El agua y los nutrientes son requisitos básicos para el crecimiento de plantas y el rendimiento, el suministro de agua de la hoja constituye la limitación abrumadora tanto en la productividad de la planta como en la calidad de la uva (Kramer y Boyer, 1995)

Cuando se hace referencia a la calidad de la uva, se habla de un concepto complejo que engloba principalmente la composición química de las bayas, donde se incluyen ácidos, azúcares y compuestos polifenólicos y aromáticos (Lund y Bohlmann, 2006). La composición y la

concentración de estos compuestos químicos cambian a lo largo de las distintas fases del desarrollo de las bayas y se ven afectadas por diversos factores ambientales y endógenos o por las técnicas de cultivo utilizadas (Jackson y Lombard, 1993; Dai et al., 2011).

Una gran proporción de viñedos están situados en regiones con sequía estacional (por ejemplo, el clima del tipo mediterráneo) donde el suelo y la atmósfera presentan déficits de agua que, junto con las altas temperaturas, ejercen grandes limitaciones en el rendimiento y la calidad. En los últimos años, las temperaturas y el número de días secos por año se han incrementado en el sur de Europa (Luterbacher et al., 2006). Esta tendencia es probable que aumente en el futuro, de acuerdo con los escenarios de cambio global (Petit et al., 1999; Miranda et al., 2006). Esto tendrá un impacto en la viticultura (Schultz, 2000), haciendo que los viticultores tengan que establecer nuevos enfoques para la gestión del riego teniendo que reducir tanto el consumo de agua como los efectos ambientales perjudiciales de las prácticas agrícolas actuales.

En determinadas zonas, como en la costa mediterránea, reutilizar el agua se considera una solución rentable para la agricultura, ya que se reduce el volumen de agua utilizado y se proporciona una solución adaptable al cambio climático (Costa et al., 2016).

Actualmente, las dos herramientas de riego más importantes, basadas en conocimientos fisiológicos de la vid y la respuesta al estrés hídrico, son el riego deficitario controlado (RDI) y el secado parcial de raíces (PRD).

En el régimen de riego deficitario (RDI) la entrada de agua se elimina o se reduce durante períodos específicos del ciclo de cultivo, mejorando el control de vigor vegetativo, para optimizar el tamaño del fruto, fecundidad y calidad de la fruta (Chalmers et al., 1986; Alegre et al., 1999; Secoet al., 2001). Sin embargo, esta técnica necesita un control de la aplicación de agua, que se dificulta a la hora de ponerlo en práctica. Los viñedos bajo condiciones mediterráneas proporcionan a los viticultores un mayor control sobre el estado del agua disponible facilitando la implementación de este tipo de riego (Williams y Matthews, 1990).

El estrés hídrico leve provocado puede reducir el vigor de la planta y la competencia por los hidratos de carbono (Matthews y Anderson, 1988 y 1989). El tamaño más pequeño de las bayas de las uvas producido por la limitación de agua disponible mejora la calidad de la fruta como resultado del aumento del grosor de la piel a proporción de la pulpa ya que como se ha hecho referencia en el apartado anterior, los compuestos polifenólicos se encuentran en la piel (McCarthy, 1997). Los polifenoles son sintetizados por una ruta biosintética que viene regulada por las prácticas de riego y por factores bióticos y abióticos (Kennedy y Cohen, 2010). Hay estudios que indican que el déficit hídrico efectivamente regula la biosíntesis de las antocianinas y taninos (Castellarin y Di Gaspero, 2007), dejando claro así, que el riego suministrado al viñedo afecta a la acumulación de compuestos polifenólicos que se encuentran en la piel de la baya. Por el contrario, si se aplica agua en exceso se puede reducir el contenido de color, riqueza polifenólica y azúcar y producir desequilibrios de acidez (Bravdo et al., 1985; Matthews et al., 1990; Esteban et al., 2001).

La magnitud de los efectos del riego deficitario y la respuesta de la vid al estrés hídrico depende del periodo fenológico en el que se aplique, la cantidad de agua suministrada, la variedad de uva, las condiciones ambientales y de otras prácticas de cultivo asociadas al aporte de riego (Matthews *et al.*, 1987, Medrano *et al.*, 2003).

El secado parcial de raíces (PRD) es una nueva técnica de riego que requiere aproximadamente que la mitad del sistema radicular de la vid se mantenga en un estado de secano mientras que el resto del sistema radicular se mantenga en regadío. Las raíces en regadío son las responsables de mantener un estado de agua de la planta favorable, mientras que las raíces en secano sintetizarán señales químicas que serán transportadas a las hojas haciendo que se produzca un crecimiento de los estomas provocando un aumento en la eficacia a la hora de emplear el agua (Loveys, 1984). Esta técnica de riego no fue aplicada en el estudio.

El incremento en la salinización de los suelos supone una seria amenaza para el cultivo de la vid corriendo un mayor riesgo los viñedos de riego deficitario frente al resto de viñedos de regadío, debido a las sales contenidas en el agua suministrada (Keller, 2010). Este incremento de sales solubles genera un efecto osmótico que produce sequía en la planta y un efecto tóxico, provocando efectos perjudiciales en el crecimiento de la planta (Marschner, 1986). En el caso de la composición de las bayas, el efecto de la salinidad parece depender tanto de la variedad como del momento de aplicación en la temporada de crecimiento. Se deben llevar a cabo prácticas agronómicas que minimicen el impacto sobre la composición de las bayas y favorezcan un correcto desarrollo.

Para concluir indicar que es de suma importancia estudiar el impacto del volumen de agua y de la salinidad empleados en el plan de riego establecido, el cuál va a condicionar el posterior rendimiento de la vid y la calidad de las uvas.

2. Objetivos

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la composición fenólica de pepitas de uvas de la variedad Monastrell, sometidas a distintos tratamientos de riego que se han llevado a cabo desde la floración o desde el envero, en los cuales se ha variado la cantidad de agua y su concentración de sales, y así poder determinar su influencia sobre la composición fenólica: concentración y estructura de los taninos.

3. Plan de trabajo

El experimento consistió en aplicar 6 estrategias de riego (denominadas como T1, T2, T3, T4, T5, y T6) con distintas cantidades de agua de diferente calidad sobre un viñedo en Fuente Álamo. Para ello se dividió la parcela en 4 zonas, las cuales a su vez se subdividieron en 6 sectores de riego, uno para cada tratamiento, que integraban 192 cepas cada uno (en la **Figura 2** se contempla la disposición de la parcela en estudio).

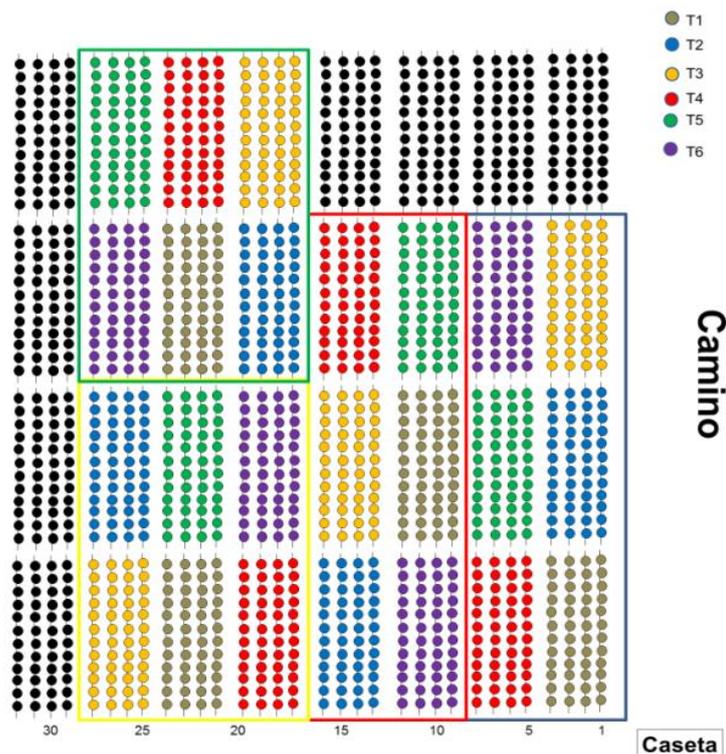


Figura 2. Distribución de los tratamientos llevados a cabo en el viñedo

Primeramente, las instalaciones fueron modificadas para disponer de manera independiente de los diferentes tratamientos. La finca disponía de una red de riego con un gotero por metro de tubería. Cada tratamiento se dispuso en 4 filas de 10 cepas cada una, habiendo una repetición de cada tratamiento en las 4 zonas establecidas. Por lo que el ensayo quedó formado por 28 filas en las cuales había 1152 cepas en una superficie de 5184 m². Posteriormente se llevó a cabo la vendimia de los racimos de uva y el muestreo correspondiente para llevar a cabo el estudio.

Con la aplicación de los diferentes tratamientos (explicados en la **Tabla 1**) se busca simular las condiciones que posiblemente en un futuro próximo, tengan que soportar los cultivos de la vid debido a las limitaciones provocadas por el cambio climático. Estas limitaciones son principalmente la disminución de la disponibilidad de agua y el incremento de la salinidad de los suelos que, en el caso que no se encuentren prácticas agronómicas que puedan subsanarlas, podrían tener un impacto negativo sobre el desarrollo y la calidad de los cultivos y la calidad.

Para evaluar la disponibilidad de agua se plantearon 3 situaciones: un régimen de secano en el que no se aplica ningún tipo de riego, un régimen de riego moderado en el que se suministra mayor cantidad de agua debido a que el periodo de aplicación de agua se distribuye a partir de la

floración, y por último un régimen de riego deficitario en el que se suministra menor cantidad de agua debido el periodo de aplicación de agua se distribuye a partir del envero. Para el estudio de la creciente salinidad de los suelos se adicionaron al agua de riego sulfatos y cloruro básico obteniendo 3 tipos de agua: agua de riego de buena calidad que no provocaba efecto osmótico, agua de riego con una conductividad eléctrica de 4,0 dS/m de sulfato básico y por último agua de riego con una conductividad eléctrica de 4,0 dS/m de cloruro básico. Combinando las diferentes condiciones se plantearon 6 tratamientos diferentes:

Tabla 1. Descripción de los tratamientos aplicados en el estudio.

TRATAMIENTO	mm ³	CANTIDAD DE AGUA SUMINISTRADA	SALINIDAD DEL AGUA. EFECTO OSMÓTICO
T1	0	Secano, sin riego	
T2	111,4	Riego moderado distribuido a partir de la floración	Agua de “buena calidad”. Sin efecto osmótico
T3	114,3	Riego moderado distribuido a partir de la floración	Agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de sulfato básico
T4	115	Riego moderado distribuido a partir de la floración	Agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de cloruro básico
T5	82,1	Riego deficitario distribuido a partir del periodo de envero	Agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de sulfato básico
T6	81,2	Riego deficitario distribuido a partir del periodo de envero	Agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de cloruro básico

4. Materiales y métodos

4.1. Características de la parcela de estudio

El viñedo sobre el que se realizó el estudio se encuentra en el término municipal de Fuente Álamo (Albacete) siendo sus coordenadas geográficas 38° 43' 43,3'' Norte y 1° 28' 12,6'' Oeste. El terreno está situado a una altitud de 820 m con una pendiente media del 5%. La plantación abarca una superficie de 1,147 hectáreas. En la **Figura 3** se muestra la situación geográfica de la parcela.



Figura 3. Instantánea aérea de la parcela de estudio

Las cepas del viñedo son de la variedad Monastrell y fueron plantadas en 2007. La distancia entre las calles es de 3 metros habiendo 1,5 metros entre cepas, aproximadamente 2.222 cepas por hectárea. Las filas están orientadas en el sentido Norte-Sur. El sistema de conducción consta de un cordón doble. En la **Figura 4** se muestra una cepa perteneciente al estudio.



Figura 4. Instantánea de una de las cepas de la parcela de estudio.

4.2. Obtención del extracto a partir de las pepitas de las bayas

En primer lugar, se descongelaron las muestras para facilitar su posterior procesado. Una vez descongeladas, se contaron y se pesaron 100 bayas de cada muestra, 50 bayas por duplicado, para obtener su peso promedio y se separaron las pepitas de los hollejos y de la pulpa con la ayuda de una espátula sobre una placa Petri. A continuación, se obtuvo el peso total de las pepitas contenidas por las bayas y se tomaron 3 g de pepitas que se lavaron con agua destilada para eliminar azúcares y se introdujeron en un tubo de centrifuga cónico con 50 mL una solución acetona:agua (2:1).

Para su maceración fueron sometidas a una agitación horizontal en oscuridad durante 24 horas a 75 rpm y a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente el contenido se transfirió a un matraz balón utilizando lana de vidrio como filtro y se eliminó la acetona con un rotavapor a 35°C. El extracto resultante se llevó a un volumen de 20 mL en un Erlenmeyer con agua destilada y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos en los tubos comentados anteriormente. Posteriormente, con la ayuda de una bomba de vacío se hizo pasar el líquido a través de un filtro de 0,45 µm y, por último, con el filtrado obtenido se llenaron dos tubos eppendorf, que se conservaron a 12°C para realizar posteriormente las determinaciones espectrofométricas, congelando el líquido sobrante en flaneras a -40°C para su posterior liofilización durante 24h. El polvo obtenido de la liofilización se trasvasó a un tubo hasta su posterior análisis, protegido en un desecador.

4.3. Determinaciones espectrofotométricas

Para cada extracto obtenido a partir de las pepitas se llevaron a cabo las siguientes determinaciones analíticas leyéndose cada una de las muestras por cuadruplicado: índice de polifenoles totales (IPT), taninos condensados totales y catequinas.

Para las determinaciones, se empleó un espectrofotómetro de doble haz, JASCO V-630 UV-Visible (Tokio, Japón).

4.3.1. Determinación del índice de polifenoles totales (IPT)

El procedimiento consistió en diluir el extracto con un índice de 1:100, en agua destilada e introducirlo en la cubeta de cuarzo de 10 mm de camino óptico. La lectura de la absorbancia se realizó a 280 nm utilizando el agua destilada como blanco. Se realizó a 280 nm porque, a esta longitud de onda, el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos alcanza su máximo de absorbancia (Zamora, 2003).

Para calcular el índice se aplicó la siguiente ecuación:

$$IPT = A_{280} \times 100$$

[Eq.1]

4.3.2. Determinación de taninos condensados totales

Este método consiste en la medición por colorimetría de las antocianidinas, obtenidas por la oxidación de un carbón muy reactivo liberado en medio ácido y en presencia de calor por ruptura de los enlaces intermonoméricos de los taninos condensados (Smith, 1981).

El procedimiento consistió en diluir el extracto en agua destilada con un índice 1:50 y posteriormente introducir 1 mL de la muestra diluida en tubos de ensayo denominados Tubo A y Tubo B. En el tubo A se añadió 0,5 mL de agua destilada y 3 mL de HCL (37%). En el tubo B se añadió 0,5 mL de agua destilada y 3 mL HCL (37%). Se calentó el tubo “A” a 90 °C en la estufa durante 30 minutos tapado con parafilm y protegido de la luz y una vez transcurrido este tiempo se dejó atemperar. El tubo “B” se mantuvo a temperatura ambiente protegido de la luz. Una vez el tubo “A” estuvo atemperado se añadió 0,5 mL de etanol en ambos tubos y se midió la absorbancia a 550 nm en cubeta de cuarzo de 10 mm de paso óptico.

Una vez realizaba la determinación de las primeras muestras se observó que los valores de absorbancia de los tubos B eran muy próximos a 0 por lo se despreciaron y únicamente se prepararon los tubos A. Para calcular la concentración de taninos condensados se aplicó la siguiente ecuación.

$$C_{taninos}(g/L) = 19,33 \times (AA)$$

[Eq 2]

4.3.3. Determinación de catequinas

El método se fundamenta en la capacidad de la vainillina para reaccionar de forma selectiva con las posiciones seis y ocho de las moléculas de flavanoles, formando un compuesto de adición que genera un cromóforo rojo, por eliminación del agua. Cuanto más elevado sea el grado de polimerización de los taninos, la reacción de la vainillina con las procianidinas dará coloraciones menos intensas, ya que son menores los puntos de ataque libres (Pompei y Peri, 1971).

El procedimiento consistió en diluir el extracto en agua destilada con un índice 1:50 y preparar dos tubos de ensayo, en el tubo “A” se añadió 1,5 mL de muestra diluida, 3 mL de HCl (35%), 1,5 mL de vainillina y 1,5 mL de alcohol etílico (96%). En el tubo “B” se añadió 1,5 mL de muestra diluida, 3 mL de HCl (35%) y 3 mL de alcohol etílico (96%), sin vainillina. Los tubos A se dejaron en reposo protegidos de la luz durante 15 min y a continuación se midió la absorbancia de ambos tubos a 500 nm con una cubeta de 10mm de paso óptico.

Para calcular concentración de catequinas se aplicó la siguiente ecuación:

$$C_{catequinas}(g/L) = [531,35 \times (AA - AB) \times 5] - 1,1033$$

[Eq 3]

4.4. Determinación con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La determinación con HPLC se llevó a cabo para estimar el grado medio de polimerización de proantocianidinas de los extractos de las pepitas.

Para la determinación se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC-DAD) JASCO serie MD-2010 Plus, (JASCO, Tokyo, Japón) equipado con un detector Diodo Array LC-Net II/ADC (Tokyo, Japón). La columna cromatográfica utilizada fue Gemini NX (Phenomenex, Torrance, CA), 250 mm x 4,6 mm de 5 μ m de tamaño de partícula.

4.4.1. Estimación del grado medio de polimerización de proantocianidinas

El polvo seco obtenido tras el proceso de liofilización se procesó aplicando la reacción de floroglucinólisis (Kennedy y Jones, 2001). Se pesaron 5 mg del polvo y se disolvieron en 0,5 mL de MetOH (100%), a continuación, se añadió 0,5 mL de solución de hidrólisis (HCl 0,2 N en metanol, 100 g/L de floroglucinol y 20 g/L de ácido ascórbico) durante 20 minutos a 50°C. Una vez cumplido el tiempo, la hidrólisis fue detenida con 2 volúmenes de solución acuosa 200 Mm de acetato de sodio en agua. Posteriormente, las soluciones fueron filtradas utilizando una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μ m y colocadas en viales de HPLC.

El análisis se realizó ocupando una gradiente binaria que consta de 2 fases móviles donde la fase móvil A es una solución de ácido acético 1% en agua Mili Q y la fase móvil B es MetOH (100%)

La elución fue monitoreada a 280 nm de longitud de onda y las condiciones fueron 5% de B por 10 minutos, un gradiente lineal de 5 a 20% de B en 20 minutos, de 20 a 40% de B en 25 minutos. La columna se lava finalmente con 90% de B durante 10 minutos y se reequilibra con 5% de B en 5 minutos antes de la siguiente inyección.

El grado medio de polimerización (mDP) se obtuvo dividiendo la totalidad de las subunidades identificadas (proantocianidinas terminales y de extensión) entre las proantocianidinas terminales. Para el porcentaje de galoilación (%G) se dividió la totalidad de proantocianidinas galoiladas entre la totalidad de las proantocianidinas identificadas, multiplicando por 100. Por último, el peso molecular promedio (aMW) se determinó a través de la proporción molar de cada subunidad y del peso molecular.

4.5. Tratamiento estadístico

Con los datos obtenidos de las determinaciones espectrofotométricas y con los pesos tanto de las bayas como de las pepitas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple en primer lugar entre los 6 tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6) para evaluar su efecto sobre los distintos parámetros analizados. En segundo lugar, para evaluar el efecto de la cantidad de agua suministrada, se agruparon los tratamientos según el régimen de riego que aplica: secano (T1), riego moderado distribuido a partir de la floración (T2, T3, T4,) y riego deficitario distribuido a partir del envero (T5, T6). Por último, para evaluar el efecto de la salinidad del agua riego, por lo

que se agruparon los tratamientos según la composición de las sales adicionadas: agua de buena calidad sin efecto osmótico (T2), agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de sulfato básico (T2, T4) y agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de cloruro básico (T3, T5).

Además, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para estudiar la posible interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y la salinidad de la propia agua.

Para ello se utilizó el programa informático STATGRAPHICS Centurion X64. El nivel de confianza utilizado fue del 95% utilizando un valor $P < 0,05$ para detectar posibles diferencias significativas entre los valores.

5. Resultados y discusión

5.1. Efecto de los distintos tratamientos sobre el peso de 100 bayas, el peso de las pepitas de 100 bayas y la composición del extracto de pepitas.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los distintos parámetros se agruparon los resultados según el tratamiento aplicado y se llevó a cabo el análisis estadístico.

La **Tabla 2** recoge los resultados obtenidos para los factores “peso 100 bayas” y “peso pepitas 100 bayas”, agrupándolos según el tratamiento y mostrando el promedio de las repeticiones realizadas y su desviación típica.

Tabla 2. Promedio y desviación típica del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según el tratamiento aplicado.

Tratamiento		Peso 100 bayas (g)	Peso pepitas 100 bayas (g)
T1	Secano	178,46 ± 13,60 a	8,85 ± 0,94 b
T2	Riego moderado-Agua de buena calidad	210,13 ± 11,34 b	9,66 ± 1,06 c
T3	Riego moderado-Agua con sulfato básico	196,56 ± 18,30 b	8,85 ± 0,66 b
T4	Riego moderado-Agua con cloruro básico	175,36 ± 14,34 a	9,12 ± 1,43 bc
T5	Riego deficitario-Agua con sulfato básico	178,15 ± 28,03 a	8,61 ± 0,39 ab
T6	Riego deficitario-Agua con cloruro básico	166,17 ± 33,53 a	8,04 ± 1,01 a
Razón-F		8,67	4,84
Valor-P		0,000	0,001

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

Según los resultados de la **Tabla 2** se observan diferencias significativas entre los valores correspondientes a los diferentes tratamientos para ambos parámetros siendo el valor $P < 0,05$.

La influencia del agua de riego, es clara en lo que se refiere al peso de 100 bayas. Se pueden establecer claramente dos grupos; el primero de ellos estaría formado por los tratamientos que reducen la aplicación de agua, es decir, secano y riego deficitario (T1, T5, T6) y el segundo por los tratamientos con riego moderado (T2 y T3). Sin embargo, el tratamiento de riego moderado con sales de cloruro básico, se comporta más parecido al tratamiento de secano por que la presencia de este tipo de sales, produce mucho estrés a la planta. Esto se traduce en que la cantidad de agua suministrada influye en el peso de las bayas y las pepitas. En cuanto al peso de las pepitas de 100 bayas, los resultados no son tan claros como los obtenidos con el peso de 100 bayas, pero también se puede observar como el empleo de riego moderado produce un incremento en el peso de las pepitas (T2 y T4), excepto en el caso de emplear agua con sulfato básico (T3). Los pesos menores, se consiguen con los tratamientos de riego deficitario y secano (T1, T5 y T6).

En las **Tablas 3** y **4** están recogidos los resultados de las determinaciones espectrofotométricas llevadas a cabo sobre las pepitas, agrupándolos según el tratamiento y mostrando el promedio de

las repeticiones realizadas y su desviación típica. Cuando se observan los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico, lo primero que llama la atención es la ausencia de diferencias significativas en la concentración de taninos expresados en gramo de tanino/gramo de pepita, es decir, la composición tánica de las pepitas no difiere por efecto de la cantidad de agua y/o tipo de agua. Las diferencias que se encuentran entre los tratamientos, están más relacionadas con el peso de las bayas que con las síntesis de taninos en las pepitas, es por lo que sí se encuentran diferencias entre la concentración de taninos expresados en mg/g de uva y no entre los expresados en mg/g de pepita. Sin embargo, sí se observan diferencias significativas en la concentración de taninos expresados en mg/g de baya debido a que los tratamientos de riego sí que producen cambios en los pesos de las bayas y pepitas.

Tabla 3. Promedio y desviación típica de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según el tratamiento aplicado.

Tratamiento		Taninos de pepita (mg/g uva)	Taninos (g/g pepita)
T1	Secano	3,80 ± 0,66 abc	0,076 ± 0,007 a
T2	Riego moderado-Agua de buena calidad	3,46 ± 0,75 a	0,075 ± 0,016 a
T3	Riego moderado-Agua con sulfato básico	3,16 ± 1,04 a	0,070 ± 0,021 a
T4	Riego moderado-Agua con cloruro básico	4,27 ± 0,27 bc	0,083 ± 0,003 a
T5	Riego deficitario-Agua con sulfato básico	3,72 ± 0,24 ab	0,076 ± 0,007 a
T6	Riego deficitario-Agua con cloruro básico	4,50 ± 1,89 c	0,087 ± 0,020 a
Razón-F		3,35	1,83
Valor-P		0,008	0,115

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

En el caso de las uvas, el tratamiento que aplica riego deficitario con agua con cloruro básico presenta la mayor concentración de taninos (expresado en mg de tanino/g de uva) mientras que el tratamiento que aplica riego moderado con agua con sulfato básico presenta la concentración menor, inversamente proporcional al peso de 100 bayas (Tabla 1). Los valores se incrementan en los tratamientos que se encuentran en un régimen de secano (T1) y de riego deficitario (T5 y T6) con respecto a los tratamientos en los que el riego es moderado (T2, T3), a excepción del tratamiento con cloruro básico cuyo valor es mayor. En los tratamientos en los que se aplica agua con cloruro básico (T3, T5) se aprecia un aumento en los valores con respecto a los tratamientos en los que aplica agua de buena calidad (T2) y agua con cloruro básico (T4, T6). Esto quiere decir que la salinidad del agua influye en la concentración de taninos de las uvas.

En el caso de las pepitas, al no presentar los valores de la concentración de taninos diferencias significativas entre los diferentes tratamientos se puede indicar que el riego no influye de manera significativa en la síntesis de taninos en las pepitas. Simplemente se puede observar que los valores son mayores en los tratamientos en los que se aplica agua con cloruro básico (T2, T5).

Tabla 4. Promedio y desviación típica de la concentración de catequinas de pepita en uvas y pepitas e IPT de pepitas según el tratamiento aplicado.

Tratamiento	Catequinas de pepita (mg/g uva)	Catequinas (mg/g pepita)	IPT extracto pepitas
T1 Secano	0,19 ± 0,03 a	11,25 ± 0,42 ab	83,35 ± 8,95 ab
T2 Riego moderado-Agua de buena calidad	0,17 ± 0,03 a	11,92 ± 2,45 abc	88,27 ± 8,80 abc
T3 Riego moderado-Agua con sulfato básico	0,20 ± 0,02 a	12,68 ± 2,87 bc	90,42 ± 11,25 bc
T4 Riego moderado-Agua con cloruro básico	0,18 ± 0,04 a	10,57 ± 2,88 a	78,51 ± 11,43 a
T5 Riego deficitario-Agua con sulfato básico	0,21 ± 0,03 a	11,92 ± 2,28 ab	83,69 ± 12,87 ab
T6 Riego deficitario-Agua con cloruro básico	0,24 ± 0,05 b	13,59 ± 3,91 c	94,63 ± 9,39 c
Razón-F	4,1	3,08	2,34
Valor-P	0,002	0,013	0,048

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

Atendiendo a los resultados de la **Tabla 4** se observan diferencias significativas entre los valores correspondientes a los diferentes tratamientos en los 3 parámetros, catequinas expresados en mg/g de uva y mg/g de pepitas e IPT del extracto, siendo el valor P en todos ellos inferior a 0,05.

Con respecto a la concentración de catequinas en las uvas, el tratamiento que aplica riego deficitario con agua con cloruro básico presenta la concentración más elevada con diferencias significativas sobre los demás ensayos, mientras que el tratamiento que aplica riego moderado con agua de buena calidad presenta la concentración inferior sin diferencias significativas con el resto de tratamientos. La cantidad de agua aportada influye en la concentración de las catequinas.

En las pepitas, tanto como para la concentración de catequinas como para el IPT, el tratamiento que aplica riego deficitario con agua con cloruro básico presenta los valores más altos mientras que el tratamiento que aplica riego moderado con agua de cloruro básico presenta los valores más bajos. Los valores aumentan en los tratamientos en los que se aplica riego moderado (T2, T3, T4) y riego deficitario (T5, T6) con respecto al tratamiento en el que se aplica régimen de secano (T1). Esto indica que la cantidad de agua de riego afecta a la concentración de catequinas y al IPT.

5.2. Efecto de la cantidad de agua de riego suministrada sobre el peso de 100 bayas, el peso de las pepitas de 100 bayas y la composición del extracto de las pepitas.

Para evaluar el efecto individual de la cantidad de agua de riego suministrada en los distintos parámetros se agruparon los resultados de los tratamientos en función del régimen de riego establecido: secano (T1), riego moderado (T2, T3, T4) y riego deficitario (T5, T6), y se llevó a cabo el análisis estadístico en un ANOVA simple.

En la **Tabla 5** se recogen los pesos de las bayas y de las pepitas reflejando el promedio de todas las repeticiones realizadas agrupadas por el régimen de riego y acompañadas de su desviación típica.

Tabla 5. Promedio y desviación típica del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según la cantidad de agua de riego aplicada.

Factor		Peso 100 bayas (g)	Peso pepitas 100 bayas (g)
T1	Secano	178,46 ± 13,60 a	8,85 ± 0,94 ab
T2,T3,T4	Riego moderado	194,02 ± 20,14 b	9,21 ± 1,05 b
T5,T6	Riego deficitario	172,16 ± 29,32 a	8,33 ± 0,77 a
Razón-F		8,42	7,44
Valor-P		0,000	0,001

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

Según los resultados de la **Tabla 5** se observa que hay diferencias significativas entre los valores correspondientes a las diferentes cantidades de agua suministradas para ambos parámetros siendo el valor $P < 0,05$.

Tanto el peso de las bayas como el peso de las pepitas alcanzan su valor máximo cuando se aplica un régimen de riego moderado a partir del periodo de floración de la vid. Esto nos indica que la cantidad de agua tiene una influencia en el peso de las bayas y sus pepitas incrementándolo cuanto mayor es el volumen de agua suministrado, es decir, cuando no se genera un estrés hídrico considerable (riego moderado) ya que el régimen de secano y el régimen de riego deficitario presentan valores próximos, siendo incluso mayor el peso en régimen de secano, sin diferencias significativas con el ensayo de riego deficitario.

Estudios realizados por Matthews et al., en 2016 y Medrano et al., en 1987 indican que la magnitud de los efectos del riego deficitario y la respuesta de la vid al estrés hídrico dependen del periodo fenológico en el que se aplique y la cantidad de agua suministrada. En relación con el periodo fenológico, Keller et al., (2016) hacen referencia a que aportar agua en etapas previas al invierno induce modificaciones metabólicas importantes en la baya por lo que, al aplicar mayor cantidad de agua durante la floración, podría ser la causa del aumento de pesos de bayas y pepitas. En este sentido McCarthy (1997), observó que la mayor reducción del peso de la baya al inducir el déficit hídrico se producía durante el periodo inmediatamente posterior a la floración en comparación con el de las vides bien regadas. Esto podría explicar que los pesos fueran mayores cuando el riego se distribuye a partir de la floración que cuando se aporta después del invierno o en tratamientos de secano ya que en este periodo la cantidad de agua suministrada es determinante en el desarrollo de la baya. Por el contrario, Kennedy et al., (2000) indican que el número de semillas y su peso no se ve influenciado por el régimen de riego. El tamaño más pequeño de las bayas producido por la limitación de agua disponible mejora la calidad de la fruta como resultado del aumento de la piel a proporción de la pulpa (McCarthy, 1997).

En las **Tablas 6 y 7** están recogidos los resultados de las determinaciones espectrofotométricas llevadas a cabo sobre el extracto de pepitas, agrupándolos según el régimen de riego y mostrando el promedio de las repeticiones realizadas y su desviación típica.

Tabla 6. Promedio y desviación típica de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según la cantidad de agua de riego aplicada.

Factor		Taninos de pepita (mg/g uva)	Taninos (g/g pepita)
T1	Secano	3,80 ± 0,66 a	0,076 ± 0,007 a
T2,T3,T4	Riego moderado	3,64 ± 0,84 a	0,076 ± 0,015 a
T5,T6	Riego deficitario	4,11 ± 1,32 a	0,082 ± 0,015 a
Razón-F		1,67	1,07
Valor-P		0,193	0,348

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

Atendiendo a los resultados de la **Tabla 6** no se observan diferencias significativas en la concentración de taninos tanto cuando se expresan en mg/gramo de uva como cuando se expresan en g/g de pepita siendo el valor $P > 0,05$.

Esto quiere decir que el régimen de riego no influye de manera significativa en la síntesis de taninos de pepitas. Simplemente se puede observar que los valores son mayores cuando se aplica riego deficitario, aunque sin diferencias significativas sobre los demás tratamientos.

Tabla 7. Promedio y desviación típica de la concentración de catequinas de pepita en uvas y pepitas e IPT de pepitas según la cantidad de agua de riego aplicada.

Factor		Catequinas de pepita (mg/g uva)	Catequinas (mg/g pepita)	IPT extracto pepita
T1	Secano	0,19 ± 0,03 a	11,25 ± 0,42 a	83,35 ± 8,95 a
T2,T3,T4	Riego moderado	0,18 ± 0,03 a	11,72 ± 2,92 a	85,73 ± 10,98 a
T5,T6	Riego deficitario	0,22 ± 0,04 b	12,75 ± 3,14 a	89,16 ± 11,96 a
Razón-F		6,21	2,46	0,85
Valor-P		0,003	0,091	0,432

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

En los resultados contenidos en la **Tabla 7** se observan diferencias significativas en la concentración de catequinas expresados en relación al peso de las uvas siendo el valor $P < 0,05$. Sin embargo, los valores correspondientes a la concentración de catequinas en pepitas y en el IPT del extracto de pepitas no presentan diferencias significativas al ser el valor $P > 0,05$.

Esto indica que el régimen de riego no influye de manera significativa en la síntesis de catequinas en pepitas y uvas, ni en el IPT en pepitas, ya que las diferencias significativas presentes en las uvas se pueden asociar a la diferencia del peso de la baya. Únicamente se puede observar que los valores son mayores cuando se aplica riego deficitario.

Como en este caso, Ginestar et al., (1998) hacen referencia a que la concentración de fenoles decrece con la aplicación del riego debido sobre todo a un incremento en el peso de la baya.

Sin embargo, según Genebra et al., (2014) el régimen de riego parece tener un profundo impacto sobre el contenido de flavonoles en pepitas. A su vez, Castellarin et al., (2007) indican que generar

estrés hídrico en la baya puede anticipar su madurez y que el momento de aplicación del riego resulta crucial en la síntesis de polifenoles en etapas previas al envero e inmediatamente posteriores. La concentración de flavanoles es mayor en uvas y pepitas más maduras, por lo que, al generar estrés hídrico mediante el déficit de agua, las pepitas presentarán una mayor madurez y por lo tanto un mayor contenido en flavanoles (Gachons y Kennedy, 2003), este estudio estaría de acuerdo con nuestros resultados en los que el régimen de riego deficitario da lugar a mayores concentraciones de catequinas en relación a la baya.

5.3. Efecto de la salinidad del agua de riego sobre el peso de 100 bayas, el peso de las pepitas de 100 bayas y la composición del extracto de las pepitas.

Para evaluar el efecto individual de la composición salina del agua de riego suministrada en los distintos parámetros se agruparon los resultados de los tratamientos en función de la composición de las sales adicionadas: agua de buena calidad sin efecto osmótico (T2), agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de sulfato básico (T2, T4) y agua con una conductividad eléctrica (CE) de 4,0 dS/m de cloruro básico, y se llevó a cabo el análisis estadístico. El tratamiento T1 no se incluyó en el análisis debido a que aplicaba un régimen de secano.

En la **Tabla 8** se recogen los pesos de las bayas y de las pepitas reflejando el promedio de todas las repeticiones realizadas agrupadas la composición de las sales adicionadas y acompañadas de su desviación típica y del análisis estadístico.

Tabla 8. Promedio y desviación típica del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.

Factor		Peso 100 bayas (g)	Peso pepitas 100 bayas (g)
T2	Agua de buena calidad	210,123 ± 11,34 a	9,66 ± 1,06 b
T3,T5	Agua con sulfato básico	187,36 ± 24,02 b	8,58 ± 0,52 a
T4,T6	Agua con cloruro básico	170,76 ± 24,37 c	8,73 ± 1,28 a
Razón-F		14,76	6,06
Valor-P		0,000	0,004

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

Atendiendo a los resultados de la **Tabla 8** se observa que el tipo de agua aplicada provoca diferencias significativas para ambos parámetros porque el valor $P < 0,05$.

Tanto las bayas como las pepitas presentan un incremento en su peso cuando se aplica un régimen de riego con agua de buena calidad sobre la aplicación de agua con sales. Al aplicar regímenes de riego con aguas salinas los valores de peso de 100 bayas disminuyen sobre todo al aplicar agua con cloruro básico en el caso de las bayas y sin presentar diferencias significativas entre ellas en el caso de las pepitas. Esto permite intuir que la composición de sales en el agua de riego influye en el peso de las bayas y de las pepitas, y produce un incremento de ambos parámetros cuanto mejor sea la calidad del agua suministrada y con menor salinidad. Esto puede deberse, según Marschner (1986),

a que el incremento de sales solubles genera un efecto osmótico que produce sequía en la planta y un efecto tóxico, provocando efectos perjudiciales en el crecimiento de la planta y por lo tanto de bayas y pepitas. Las diferencias presentes entre los regímenes de riego con aguas salinas pueden deberse a que el cloruro básico genera un mayor estrés hídrico en la planta en comparación al generado por el sulfato básico, lo que haría disminuir el peso de las bayas.

En las **Tablas 9 y 10** están recogidos los resultados de las determinaciones espectrofotométricas llevadas a cabo sobre las pepitas, agrupándolos según la composición de las sales adicionadas y mostrando el promedio de las repeticiones realizadas y su desviación típica.

Tabla 9. Promedio y desviación típica de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.

Factor		Taninos de pepita (mg/g uva)	Taninos (g/g pepita)
T2	Agua de buena calidad	3,46 ± 0,75 a	0,075 ± 0,016 ab
T3,T5	Agua con sulfato básico	3,44 ± 0,76 a	0,085 ± 0,015 a
T4,T6	Agua con cloruro básico	4,39 ± 1,26 b	0,073 ± 0,014 b
Razón-F		7,00	3,68
Valor-P		0,002	0,029

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

Según los resultados de la **Tabla 10** se observa que hay diferencias significativas entre los valores de la concentración de taninos de pepita para los distintos tratamientos a la diferente composición salina del agua suministradas porque el valor $P < 0,05$.

La concentración de taninos de pepita en relación al peso de la uva, se ve incrementada cuando se aplica agua con cloruro básico en el riego en comparación a cuando se aplica agua de buena calidad. Por el contrario, para la concentración de taninos de pepita, la concentración aumenta cuando se aplica agua con sulfato básico en relación a la aplicación de agua de buena calidad y cloruro básico. Por lo tanto, la concentración de taninos en pepitas aumenta cuando se aplican aguas salinas en el riego.

Tabla 10. Promedio y desviación típica de la concentración de catequinas de pepita en uvas y pepitas e IPT de pepitas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.

Factor		Catequinas de pepita (mg/g uva)	Catequinas (mg/g pepita)	IPT extracto pepita
T2	Agua de buena calidad	0,17 ± 0,03 a	11,92 ± 2,45 a	88,27 ± 8,80 a
T3,T5	Agua con sulfato básico	0,20 ± 0,02 ab	12,08 ± 2,53 a	86,57 ± 11,76 a
T4,T6	Agua con cloruros básicos	0,21 ± 0,05 b	12,30 ± 3,85 a	87,06 ± 12,96 a
Razón-F		3,22	0,11	0,06
Valor-P		0,046	0,089	0,942

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

En los resultados mostrados en la **Tabla 10** se observan diferencias significativas en la concentración de catequinas de pepitas expresados en relación al peso de las uvas al ser el valor $P < 0,05$ debido a las diferencias que producen los tratamientos en el peso de las bayas. Sin embargo, los valores correspondientes a la concentración de catequinas de pepitas e IPT en el extracto de pepitas no presentan diferencias significativas al ser el valor $P > 0,05$.

En el caso de las uvas, la concentración de catequinas de pepitas, aumenta cuando se aplican regímenes de riego con aguas salinas mientras que al aplicar un régimen de riego con agua de buena calidad la concentración disminuye en relación al peso de las uvas, aunque no parezcan diferencias significativas en la concentración de catequinas en las pepitas. La calidad del agua de riego no influye de manera significativa en la síntesis de catequinas ni en el IPT de las pepitas. La concentración de catequinas es ligeramente inferior cuando se aplica agua sin sales.

Keller (2005) indicó que las concentraciones de iones salinos ya sea por déficit o por exceso producen importantes modificaciones en el crecimiento de la vid, en la producción de bayas, así como en la composición de las mismas, las cuales determinarán las características del vino resultante de ellas. Como se comentó anteriormente, la adición de sales al agua de riego produce un exceso en la concentración de iones salinos, esto según Marschner (1986), produce una sequía osmótica en la planta provocando un incremento en la concentración de los compuestos polifenólicos en bayas y pepitas.

5.4. Interacción entre la calidad del agua aplicada y el régimen de riego

Las **Tablas 11, 12 y 13** recogen el resumen estadístico llevado a cabo para analizar una posible interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y la composición salina del agua de riego. Los resultados están agrupados según el tratamiento aplicado y muestran el promedio de las repeticiones realizadas y su desviación típica. Los tratamientos T1 y T2 no se incluyeron en el análisis debido a que el primero aplicaba un régimen de secano y el segundo aplicaba un régimen de riego con agua de buena calidad con sólo un nivel de riego, (riego moderado). Para el riego con agua con sales, existen dos niveles de riego, moderado y deficitarios, permitiendo el ANOVA multifactorial.

Tabla 11. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego del peso de 100 bayas y el peso de las pepitas de 100 bayas según el tratamiento aplicado.

Factor		Peso 100 bayas (g)	Peso pepitas 100 bayas (g)
T3	Riego moderado-Agua con sulfato básico	196,56 ± 18,30	8,85 ± 0,66
T4	Riego moderado-Agua con cloruro básico	175,36 ± 14,34	9,12 ± 1,43
T5	Riego deficitario-Agua con sulfato básico	178,15 ± 28,03	8,61 ± 0,39
T6	Riego deficitario-Agua con cloruro básico	166,17 ± 33,53	8,04 ± 1,01
Razón F (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		0,55	3,71
Valor-P (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		0,460	0,080

Atendiendo a los resultados de la **Tabla 11**, en ambos parámetros no se observan diferencias significativas siendo el valor $P > 0,05$. No se detecta un efecto de interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y la salinidad del agua sobre el peso de las bayas y el de las pepitas. Se puede observar un ligero aumento en el peso de las bayas en un régimen moderado con agua con sulfato básico y en el peso de las pepitas en un régimen moderado con agua con cloruro básico.

Tabla 12. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego de la concentración de taninos de pepita en uvas y pepitas según el tratamiento aplicado.

Factor		Taninos de pepita (mg/g uva)	Taninos (g/g pepita)
T3	Riego moderado-Agua con sulfato básico	3,16 ± 1,04	0,070 ± 0,021
T4	Riego moderado-Agua con cloruro básico	4,27 ± 0,27	0,083 ± 0,003
T5	Riego deficitario-Agua con sulfato básico	3,72 ± 0,24	0,076 ± 0,007
T6	Riego deficitario-Agua con cloruro básico	4,50 ± 1,89	0,087 ± 0,020
Razón F (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		0,33	0,04
Valor-P (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		0,567	0,840

En los resultados de la **Tabla 12** no se observan diferencias significativas en la concentración de taninos de pepitas expresados en relación al peso de las bayas como en pepitas. Esto indica que la interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y la salinidad del agua de riego no produce un efecto significativo sobre la concentración de taninos en pepitas.

Tabla 13. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego de la concentración de catequinas de pepita en uvas e IPT de pepitas según el tratamiento aplicado.

Factor		Catequinas de pepita (mg/g uva)	Catequinas (mg/g pepita)	IPT extracto pepita
T3	Riego moderado-Agua con sulfato básico	0,20 ± 0,02	12,68 ± 2,87	90,42 ± 11,25
T4	Riego moderado-Agua con cloruro básico	0,18 ± 0,04	10,57 ± 2,88	78,51 ± 11,43
T5	Riego deficitario-Agua con sulfato básico	0,20 ± 0,03	11,92 ± 2,28	83,69 ± 12,87
T6	Riego deficitario-Agua con cloruro básico	0,24 ± 0,05	13,59 ± 3,91	94,63 ± 9,39
Razón F (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		4,00	7,99	7,94
Valor-P (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		0,051	0,006	0,006

Los resultados de la **Tabla 13** indican que no existe interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y la salinidad del agua de riego únicamente para la concentración de catequinas de pepitas expresados en relación al peso de las bayas, al ser el valor $P > 0,05$. Simplemente se observa un aumento en el peso de las bayas en un régimen moderado con agua con sulfato básico.

Por el contrario, en los valores de la concentración de catequinas de pepitas y en el IPT del extracto de las pepitas, se observa interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y la salinidad

del agua, al ser el valor $P < 0,05$. Se obtienen mayores concentraciones de catequinas de pepitas y el IPT del extracto de pepitas con el riego deficitario distribuido a partir del envero y con agua de riego con cloruro básico que cuando se aplica agua con sulfato básico. Pero esta tendencia se invierte cuando se aplica riego moderado antes de la floración, siendo más bajos los valores obtenidos cuando se riega con agua con cloruro básico.

5.5. Análisis del grado medio de polimerización (mDP) de proantocianidinas del extracto de las pepitas mediante cromatografía en fase líquida de alta eficacia (HPLC)

Para obtener información sobre las proantocianidinas o taninos condensados y su grado medio de polimerización (mDP) es necesario recurrir al método de fluroglucinólisis (Kennedy y Jones, 2001). Este método está basado en la ruptura de enlaces interflavánicos en medio ácido y en presencia del fluroglucinol, las proantocianidinas se despolimerizan liberando subunidades de extensión y subunidades terminales. Únicamente las subunidades de extensión reaccionan con el fluroglucinol. Las subunidades de los taninos condensados de las semillas se dividen en catequina, epicatequina y epicatequina-3-*O*-galato, y las subunidades de extensión unidas al fluroglucinol son catequina-fluroglucinol, epicatequina-fluroglucinol, y epicatequina-3-*O*-galato-fluroglucinol.

El grado medio de polimerización (mDP) de los taninos condensados proporciona información acerca de su astringencia, ya que a menor grado de polimerización los taninos tienen una mayor capacidad de precipitar proteínas de la saliva generando una mayor sensación de astringencia. En el presente estudio también se analizó el porcentaje de galoilación así como el peso molecular promedio de los taninos. El porcentaje de galoilación indica la cantidad de taninos galoilados (unidos a *O*-galato) presentes en el extracto de las pepitas, los cuales aumentan la astringencia y el amargor (Geny et al., 2003; Prieur et al., 1994).

El análisis de la composición de las subunidades terminales y de extensión mostró la presencia de la catequina, epicatequina y epicatequina-3-*O*-galato coincidiendo con los estudios de Kennedy y Jones (2001). En el caso de las unidades terminales la epicatequina-3-*O*-galato y la catequina seguida de la epicatequina-3-*O*-galato fueron las unidades predominantes mientras que en las unidades de extensión la epicatequina y la epicatequina-3-*O*-galato fueron las predominantes. Mattivi et al., (2009) determinaron por HPLC contenidos de catequina y epicatequina en uva de la variedad Monastrell superiores a los de este estudio.

Para evaluar el efecto de los tratamientos y, de forma individual, el efecto de la cantidad de agua suministrada y el efecto de la composición salina de la propia agua sobre: el grado medio de polimerización, el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio de las proantocianidinas del extracto de las pepitas, en primer lugar se agruparon los resultados en función del tratamiento aplicado y posteriormente se agruparon los resultados de los tratamientos en función del régimen de riego establecido y de la composición de las sales adicionadas al agua, y se llevó a cabo el análisis estadístico. Para el análisis de la composición de las sales adicionadas el tratamiento T1 no se incluyó debido a que aplicaba un régimen de secano.

En las **Tablas 14, 15 y 16** se recogen los resultados obtenidos sobre los distintos parámetros reflejando el promedio de todas las repeticiones realizadas y acompañadas de su desviación típica. Los resultados se agrupan según el tratamiento aplicado, el régimen de riego y la composición de las sales adicionadas respectivamente.

Tabla 14. Promedio y desviación típica del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio (aMW) de proantocianidinas del extracto de pepitas según el tratamiento aplicado.

Tratamiento		mDP tanino de pepita	% Galoilación tanino de pepita	aMW tanino de pepita
T1	Secano	6,66 ± 0,38 b	14,53 ± 1,32 a	2082,15 ± 133,56 b
T2	Riego moderado-Agua de buena calidad	6,18 ± 0,13 a	14,70 ± 0,56 a	1932,78 ± 38,10 a
T3	Riego moderado-Agua con sulfato básico	6,71 ± 0,28 b	15,52 ± 0,36 a	2104,75 ± 91,28 b
T4	Riego moderado-Agua con cloruro básico	6,50 ± 0,15 b	15,10 ± 0,28 a	2035,38 ± 49,19 b
T5	Riego deficitario-Agua con sulfato básico	6,62 ± 0,31 b	15,34 ± 0,45 a	2077,07 ± 100,23 b
T6	Riego deficitario-Agua con cloruros básicos	6,63 ± 0,18 b	15,05 ± 0,68 a	2075,92 ± 60,47 b
Razón-F		3,67	1,09	3,51
Valor-P		0,005	0,372	0,006

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

En los resultados contenidos en la **Tabla 14** se observan diferencias significativas en el mDP y el aMW de las proantocianidinas siendo el valor $P < 0,05$. Sin embargo, los valores del porcentaje de galoilación no muestran diferencias significativas al ser el valor $P > 0,05$.

El grado medio de polimerización y el peso molecular promedio únicamente muestran diferencias significativas cuando aplicamos un régimen de riego moderado con agua de buena calidad, el cual produce una disminución en los valores. Esto se traduce en que la salinidad del agua de riego influye en ambos parámetros. El porcentaje de galoilación presenta valores ligeramente más elevados cuando aplicamos agua de riego con sulfato básico.

Los valores de grado medio de polimerización y de galoilación están dentro de los rangos presentados por Prieur et al., (1994), los cuales obtuvieron valores de 2,3-15,1 para el mDP y 13-29 % para el porcentaje de galoilación.

Tabla 15. Promedio y desviación típica del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio (aMW) de proantocianidinas del extracto de pepitas según la cantidad de agua aplicada.

Factor		mDP tanino de pepita	% Galoilación tanino de pepita	aMW tanino de pepita
T1	Secano	6,66 ± 0,38 a	14,53 ± 1,32 a	2082,15 ± 133,56 a
T2,T3,T4	Riego moderado	6,46 ± 0,29 a	15,11 ± 0,49 a	2024,32 ± 93,66 a
T5,T6	Riego deficitario	6,63 ± 0,24 a	15,20 ± 0,55 a	2076,53 ± 76,64 a
Razón-F		2,08	1,25	1,79
Valor-P		0,131	0,291	0,173

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

En los resultados mostrados en la **Tabla 15** no se observan diferencias significativas en ninguno de los parámetros al ser el valor $P > 0,05$. Esto se traduce en que mDP, el porcentaje de galoilación y aMW de los taninos condensados de las pepitas no se ven influidos por la cantidad de agua suministrada en el riego al igual que los resultados obtenidos en la **Tabla 6**, los cuales indican que la cantidad de agua no influye de forma significativa en la concentración de taninos de pepita en relación al peso de las uvas (mg/g uva) y pepitas (g/g pepita).

Las uvas sometidas a un régimen de riego moderado presentarán una menor concentración de taninos, pero estos taninos a la hora de elaborar vinos producirán una mayor sensación de astringencia al ser grado de polimerización menor.

Tabla 16. Promedio y desviación típica del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio (aMW) de proantocianidinas del extracto de pepitas según la composición de las sales adicionadas al agua de riego.

Factor		mDP tanino de pepita	% Galoilación tanino de pepita	aMW tanino de pepita
T2	Agua de buena calidad	6,18 ± 0,13 a	14,70 ± 0,56 a	1932,78 ± 38,10 a
T3,T5	Agua con sulfito básico	6,66 ± 0,28 b	15,43 ± 0,39 b	2090,91 ± 89,97 b
T4,T6	Agua con cloruro básico	6,56 ± 0,17 b	15,08 ± 0,48 ab	2055,65 ± 55,44 b
Razón-F		9,82	5,15	10,29
Valor-P		0,000	0,008	0,000

Letras distintas en la misma columna indican la existencia de diferencias significativas al 95% de nivel de confianza.

Los resultados de la **Tabla 16** presentan diferencias significativas en los valores de los 3 parámetros siendo el valor $P < 0,05$. Se puede observar que cuando la composición del agua de riego es de buena calidad mDP, el porcentaje de galoilación y el aMW promedio de los taninos condensados de las pepitas, son menores que usando aguas con sulfatos y cloruros en su composición.

Combinando los resultados con los obtenidos en la **Tabla 9**, se puede indicar que las uvas regadas con agua de buena calidad contendrán una menor concentración de taninos con respecto a las regadas con aguas salinas, pero producirán vinos más astringentes al presentar un menor grado de polimerización.

La **Tabla 17** recoge el resumen estadístico llevado a cabo para analizar una posible interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y de la composición salina del agua de riego. Los resultados están agrupados según el tratamiento aplicado y muestran el promedio de las repeticiones realizadas y su desviación típica. Los tratamientos T1 y T2 no se incluyeron en el análisis debido a que el primero aplicaba un régimen de secano y el segundo aplicaba un régimen de riego con agua no salina.

Tabla 17. Promedio de la interacción de la cantidad de agua de riego suministrada x la salinidad del agua de riego del grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de galoilación y el peso molecular promedio (aMW) de las proantocianidinas del extracto de hollejos según el tratamiento aplicado.

Tratamiento		mDP tanino de pepita	%Galoilación tanino de pepita	aMW tanino de pepita
T3	Riego moderado-Agua con sulfato básico	6,71 ± 0,28	15,52 ± 0,36	2104,75 ± 91,28
T4	Riego moderado-Agua con cloruro básico	6,50 ± 0,15	15,10 ± 0,28	2035,38 ± 49,19
T5	Riego deficitario-Agua con sulfato básico	6,62 ± 0,31	15,34 ± 0,45	2077,07 ± 100,23
T6	Riego deficitario-Agua con cloruros básicos	6,63 ± 0,18	15,05 ± 0,68	2075,92 ± 60,47
Razón F (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		1,45	0,13	1,45
Valor-P (Cantidad de agua x Salinidad del agua)		0,230	0,720	0,230

Los resultados de la **Tabla 13** indican que no existe interacción entre la cantidad de agua de riego suministrada y la salinidad del agua de riego al ser el valor $P > 0,05$. Simplemente se observa un aumento en el mDP, porcentaje de galoilación y aMW de las proantocianidinas cuando se aplica en un régimen moderado con agua con sulfato básico.

6. Conclusiones

1. El uso de aguas salinas genera una disminución en el peso y un incremento en los compuestos polifenólicos de las bayas y las pepitas. Esta mayor carga fenólica a la hora de elaborar vino tinto tiene un efecto positivo ya que favorece las características organolépticas que determinan su calidad.
2. El régimen de riego que emplea agua de buena calidad produce bayas y pepitas de mayor peso, pero de menor carga fenólica en comparación de los regímenes de riego que aplican aguas salinas.
3. El régimen de riego deficitario con agua con cloruro básico produce las uvas más pequeñas, pero de una mayor riqueza polifenólica. Por lo que serán las más adecuadas a la hora de elaborar vino tinto.
4. El grado medio de polimerización de las proantocianidinas de las pepitas aumenta con la salinidad de las aguas de riego disminuyendo la sensación de astringencia provocada
5. El agua con cloruro básico permite obtener uvas con una mayor concentración de taninos, los cuales proporcionarían menos astringencia. Ambas condiciones son adecuadas cuando se elabora un vino.

7. Bibliografía

- ATENZA JUÁREZ, J. F.; ERENA ARRABAL, M. Y MARTÍNEZ CUTILLAS, A. (2008) Zonificación Vitícola de la variedad Monastrell en la denominación de origen Jumilla. Servicio de Publicaciones y Difusión Científica de la ULPGC, 1-10
- BATE-SMITH, (1981). Astringent tannins of the leaves of Germaine species. *Phytochem*, 20, 211-216.
- BRAVDO B.A. (2005). Physiological mechanisms involved in the production of non-hydraulic root signals by partial rootzone drying – a review. In *ISHS Acta Horticultrae*. Volume 689: VII International Symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, 267–276.
- CASTELLARIN, S.D. y DI GASPERO, G. (2007). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biol.*, 7, 46.
- CASTELLARIN, S.D., et al. (2007). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruit of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell Environment*, 30, 1381-1399.
- DAI, Z. W., et al. (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 62, 413–425.
- ESTEBAN M.A., VILLANUEVA M.J. y LISSARRAGUE J.R. (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 409–420.
- FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE VINO. Visto el 19 de junio de 2018 [ev.es/vhttp://www.f_portal/apartados/apartado.asp?te=29](http://www.f_portal/apartados/apartado.asp?te=29)
- FERNANDEZ, J. (2013). La evolución reciente del sector vitivinícola internacional. *Revista GeoGraphos*, 4 (39), 173-194.
- FRANCIS, F J. (1989). Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 273-314.
- GENY, L., et al. (2003). Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *J.Agric Food Chem.*, 51, 8051-8054.
- GINESTAR, C., et al. (1998). Use of sap-flow sensors to schedule vineyard irrigation. H. Effects of post-veraison water deficits on composition of Shiraz grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (4), 421-428.
- HIDALGO, P., et al. (2004). Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6640– 6645.
- JACKSON, D.I., LOMBARD, P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44 (4), 409-430.

- JOSÉ M. MARTÍNEZ-CARRIÓN Y FRANCISCO J. MEDINA-ALBALADEJO (2008). Innovación en el reino de la monastrell. Cambio técnico e instituciones vitivinícolas en el sureste de España. *Historia agraria*, 44, 53-88.
- KELLER, M. (2005). Deficit Irrigation and Vine Mineral Nutrition. *Proceedings of the Soil Environment and Vine Mineral Nutrition Symposium*. L.P. Christensen and D.R. Smart (Eds.), 91-107.
- KELLER, M. (2010). Managing grapevines to optimize fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists. *Aus. J. Grape Wine Res.*, 16, 56–59.
- KENNEDY, J.A. y COHEN, S.D. (2010). Plant metabolism and the environment: Implications for managing phenolics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 50, 620–643.
- KENNEDY, J.A. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5348-5355.
- LOVEYS B.R. (1984). Diurnal changes in water relations and abscisic acid in field grown *Vitis vinifera* cultivars. III. The influence of xylem-derived abscisic acid on leaf gas exchange. *New Phytologist*, 98, 563–573.
- LUND, S.T., BOHLMAN, J. (2006). The Molecular Basis for Wine Grape Quality, A Volatile Subject. *Science* 311, 804-805.
- LUTERBACHER, J. et al. (2006). Mediterranean climate variability over the last centuries, a review. In *The Mediterranean Climate: An Overview of the Main Characteristics and Issues*, 27–148.
- MARSCHNER, H. (1986). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic Press.
- MATTHEWS M.A., ANDERSON M.M. y SCHULTZ H.R., (1987). Phenologic and growth responses to early and late season water deficits in Cabernet franc. *Vitis*, 26, 147-160.
- MATTHEWS M.A. y ANDERSON M.M. (1988). Fruit ripening in grapes (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 313–320.
- MATTHEWS M.A. y ANDERSON M.M. (1989). Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 52–60.
- MATTIVI, F., VRHOVSEK, U., MASUERO, D. y TRAINOTTI, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 27-35.
- MEDRANO, H., et al. (2015). Improving water use efficiency of vineyards in semi-arid regions. A review. *Agron. Sustain. Dev.*, 35, 499–517.
- MINERVA. Consulta: 17 de junio de 2018. https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2353/9788497509435_content.pdf;sequence=1

- MIRANDA P.M.A., et al. (2006). O clima de Portugal nos séculos XX e XXI. In Alterações Climáticas em Portugal. Cenários, Impactes e Medidas de Adaptação, 45–113.
- ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO. Consulta: 18 de junio de 2018. <http://www.oiv.int/es/>
- PEÑA-NEIRA, A. (2009). Composición fenólica de uvas y vinos. Departamento de Agroindustria y Enología. Grupo de Investigación Enológica (GIE). Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- PETIT J.R., et al. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399, 429–436.
- PEYROT DES GACHONS, C. y KENNEDY, J.A. (2003). Direct method for determining seed and skin proanthocyanidin extraction in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5877–5881.
- POMPEI, C. y PERI, C. (1971). Determination of catechins in wines. *Vitis*, 9, 312-316.
- PRIEUR, C., RIGAUD J., CHEYNIER, V. y MOUTOUNET, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.
- PRIEUR, C., et al (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.
- SCHULTZ H.R. (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.
- WEISSHAAR, B., JENKINS, G.I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 251–257.
- WILLIAMS L.E. y MATTHEWS M.A. (1990). Grapevine. In *Irrigation of Agricultural Crops. Series of Agronomy*, 1019–1055.
- ZAMORA, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. AMV Ediciones.
- ZARROUK, O., (2012). Impact of irrigation regime on berry development and flavonoids composition in Aragonez (Syn. Tempranillo) grapevine. *Agricultural Water Management*, 114, 18–29.