

ESTUDIO PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD DEL VINO ALBARIÑO^x

A.J. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ², S. BOSO¹, J.L. SANTIAGO¹,
E. CEBOLLERO², V. ALONSO-VILLAVERDE¹, M. JUEGA²,
P. GAGO¹, A. LEÓN², E. ZUBIAURRE¹, Y. P. NÚÑEZ², I. GONZÁLEZ¹,
A. OLIVEIRA³, J. M^a. FONSECA³, E. RODRÍGUEZ³ *,
A.V. CARRASCOSA^{2*} Y M^a.C. MARTÍNEZ^{1*}

¹ Grupo de Viticultura. Misión Biológica de Galicia, CSIC, Apartado de correos 28, 36080 Pontevedra; Carballerira 8, 36143 Salcedo (Pontevedra), Tlfn: 986854800, Fax: 986841362, www.mbg.csic.es

² Departamentos de Microbiología y Caracterización de Alimentos. Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, c/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Tlfn: 915622900, Fax: 915644853, www.ifi.csic.es.

³ Bodegas Terras Gauda S.A., Estrada Tui-A Guarda, Km 46. As Eiras-O Rosal. 36760 Pontevedra Tlf: 986621001, www.terrasgauda.com

*Autores para correspondencia: E. Rodríguez (dirtecnico@terrasgauda.com), A.V. Carrascosa (acarrascosa@ifi.csic.es), M.C. Martínez (carmenmartinez@mbg.cesga.es)

RESUMEN

En base a características ampelográficas, moleculares y sanitarias, se seleccionaron 22 clones de la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.), partiendo de 115 iniciales. Sobre los clones seleccionados se ha llevado a cabo un estudio agronómico y enológico, así como la cuantificación de los niveles de susceptibilidad a Mildiu, Oídio y Botrytis. Se ha seleccionado una levadura ecotípica, cuyo uso ha sido patentado y se encuentra en explotación. Con ella se fermentaron los mostos obtenidos a partir de los clones de Albariño previamente seleccionados, dando lugar a vinos con una dinámica fermentativa

y unos atributos sensoriales mejorados, fundamentalmente en base al aumento del contenido en sustancias volátiles de interés (terpenos: linalool y geraniol; norisoprenoides: α -ionona y β - damascenona).

Palabras clave: *Vitis vinifera*, Albariño, ampelografía, caracteres agronómicos, enfermedades criptogámicas, *Saccharomyces cerevisiae*, vino, linalool, geraniol, α -ionona, β - damascenona

ABSTRACT

Twenty-two clones from Albariño variety (*Vitis vinifera* L.), from an initial collection of 115 clones, were selected on the basis of their ampelographic, molecular and sanitary characteristics. These selected clones were studied from the agronomic and oenological point of view, and were also quantified for their levels of susceptibility to Powdery Mildew, Oidium and Botrytis. An ecotypic yeast was selected, its use has been patented and it is being exploited. Musts obtained from the previously selected Albariño clones were fermented with this yeast, essentially by increasing the content in volatile substances of interest (terpens: linalool and geraniol; norisoprenoids: α -ionone and β -damascenone), leading to wines with improved fermentative dynamic and sensorial attributes.

Key words: *Vitis vinifera*, Albariño, ampelography, agronomic traits, criptogamic diseases, *Saccharomyces cerevisiae*, wine, linalool, geraniol, α -ionone, β - damascenone

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Variedades de vid de Galicia. El Albariño y su selección clonal

A pesar de que el cultivo de la vid en Galicia es tan antiguo como el de cualquiera de las zonas vitícolas europeas de más renombre, los estudios sobre sus variedades eran prácticamente inexistentes hasta las últimas décadas del siglo XX. Hasta entonces únicamente aparecían citados, en la bibliografía antigua, los nombres de algunas variedades. En muy contados casos, estos nombres iban acompañados de escuetas descripciones, referidas en la mayoría de los casos a características agronómicas (muy productiva, poco productiva,

maduración temprana o tardía...) o a algunos otros aspectos como el color de las uvas (Labrada, 1804; Casares, 1843; Abela y Sainz de Andino, 1885; Fernández-Crespo, 1897; Rodríguez-Navas, 1904; García de los Salmones, 1908, 1915; Pacottet, 1928; Huetz de Lemps, 1967). Gracias a la bibliografía antigua y a los datos recogidos por parte de Martínez a partir de entrevistas realizadas a los viticultores más ancianos de las distintas zonas vitícolas de Galicia (datos sin publicar), se sabía que antes de la llegada del Oídio, la Filoxera y el Mildiu, existía en esta zona un número considerable de variedades muy antiguas, y que la llegada de estas enfermedades provocó, al igual que en toda Europa (finales del siglo XIX, principios del XX), un gran trasiego de variedades de vid. A partir de esa época, las más antiguas comenzaron a convivir en los viñedos con las recién llegadas, que en muchas ocasiones recibían nombres locales distintos a los originales, atribuyéndoseles incluso sinónimos erróneos con algunas de las variedades tradicionales de la zona. La falta de dibujos, representaciones gráficas, o descripciones ampelográficas más amplias de las variedades de vid prefiloxéricas, no permitía determinar con exactitud si algunas de las citadas en la bibliografía más antigua, se correspondían con las que se encontraban actualmente en los viñedos.

En 1987, dirigido por el Dr. Mantilla, y con la participación de la Dra. Martínez y de Pérez, se emprendió en el Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), centro perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y situado en Santiago de Compostela, un trabajo de localización, descripción ampelográfica y conservación de las antiguas variedades de vid de Galicia y también de Asturias. Se puede decir que este fue el primer trabajo sobre las variedades de vid de Galicia y Asturias realizado con criterios y metodología científica. En el año 1992, tras el fallecimiento del Dr. Mantilla, y el cierre de la línea de investigación de viticultura en el citado Instituto, la Dra. Martínez continuó el trabajo en la Misión Biológica de Galicia (MBG), otro centro del CSIC situado en la ciudad de Pontevedra y perteneciente también al área de ciencias agrarias. Fruto de todo ello, en el año 1993 se estableció la colección de variedades de vid de Galicia y Asturias, en la parcela de la MBG. A la vez que se realizaba la localización, estudio y conservación de las antiguas variedades de vid y teniendo en cuenta el interés que, por aquel entonces, empezaba a despertar en Galicia la variedad Albariño, Martínez y Mantilla habían iniciado también un estudio de selección (por toda Galicia) de clones de la citada variedad, con unos criterios de selección muy concretos (Martínez *et al*, 2005) y una metodología

puesta a punto a lo largo de varios años (Martínez *et al*, 1994 Martínez y Grenan, 1999; Martínez *et al*, 2005; Boso *et al*, 2005a). Los resultados de todo este trabajo fueron publicados en diferentes libros y artículos (Martínez y Mantilla, 1993, 1994a,b; Martínez *et al*, 1994 Loureiro *et al*, 1998; Martínez, 2002). A partir del año 2000, la Dra. Martínez inicia la creación del actual grupo de investigación en viticultura de la Misión Biológica de Galicia, dando un nuevo impulso a los estudios sobre selección clonal de Albariño y de otras variedades de vid, como lo muestran las numerosas publicaciones realizadas desde entonces en el seno del citado grupo de investigación (Boso *et al*, 2004a,b; Martínez *et al*, 2005; Boso *et al*, 2005b, 2007a). Fruto por lo tanto de más de veinte años de trabajo, se han podido seleccionar 11 clones de Albariño, de los que se dispone de numerosos datos ampelográficos, agronómicos, de resistencia a enfermedades fúngicas, enológicos, etc. Algunos de estos 11 clones ya tienen categoría de “certificados”, y serán comercializados en breve entre el CSIC, la Denominación de Origen Rías Baixas y Viveros Provedo S.A.

Actualmente, la variedad Albariño es sin duda la de mayor importancia dentro del sector vitivinícola gallego y su vino uno de los productos agroalimentarios de mayor valor económico para Galicia. Hasta la aprobación de la Denominación de Origen (D.O.) Rías Baixas, en 1988, el Albariño se producía para autoconsumo y era muy poco conocido fuera de las fronteras de la comunidad autónoma. La aprobación de dicha D.O., el apoyo de la Administración y la apuesta, por parte de muchos empresarios, por el tema, hizo que en muy pocos años se multiplicase la superficie vitícola plantada con esta variedad, y el número de bodegas dedicadas a la elaboración de este tipo de vino. En la actualidad vemos como el Albariño se conoce y se exporta no sólo a nivel nacional, sino también a nivel internacional. En los últimos años, incluso países como EEUU, Australia o Nueva Zelanda, han iniciado la plantación de viñedos con la variedad Albariño, mostrando gran interés por la importación de planta seleccionada de esta variedad.

En el año 1990, adscrita a la D.O. Rías Baixas, y dentro de la subzona “O Rosal”, se funda la empresa Bodegas Terras Gauda S.A., que dispone de viñedos propios. La variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.) es la utilizada mayoritariamente para la elaboración de sus vinos, uno monovarietal de Albariño y otro formado por la mezcla de Albariño, Loureira y Caíño Blanco.

En el año 2001, responsables de Bodegas Terras Gauda S.A., conocedores de la experiencia en selección clonal de Albariño del CSIC, encargaron al grupo de la Dra. Martínez el estudio de ciertos clones de Albariño (distintos a los del CSIC), que ellos conservaban en sus viñedos desde el año 1992. Se suponía que eran 115 clones diferentes de Albariño, que habían sido localizados en diferentes lugares de la provincia de Pontevedra, según datos suministrados por la empresa. Según las mismas fuentes, las plantas madre de las que procedía este material vegetal, eran en unas ocasiones emparrados situados al lado de las casas y en otras, pequeños viñedos. En unos casos estas cepas eran centenarias (100 ó 200 años), y en otros no tenían más de 20 años. Esta selección no fue realizada con criterios científicos, ni estaba apoyada en la recogida de datos previos (ampelográficos, estado sanitario, análisis de ADN,...) sobre las cepas localizadas.

1.2. Susceptibilidad innata a las enfermedades fúngicas de la vid: Mildiu, Oídio, Botrytis

La vid (*Vitis vinifera* L.) es sensible a numerosas enfermedades criptogámicas, como Mildiu, Oídio y Botrytis causadas por hongos como *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator* o *Botrytis cinerea* respectivamente (Galet, 2000). Hasta el momento, aunque se cree que es cuantitativa, se desconoce la base molecular de la resistencia a estas enfermedades, y todos los genes que están implicados. En el caso del Mildiu, diferentes estudios demuestran que la susceptibilidad de la planta está significativamente correlacionada con la del Oídio, y han sido identificados algunos genes que codifican la susceptibilidad para ambas enfermedades (Li, 1993; Brown *et al*, 1999; Wang y Li, 2004). Para distinguir pequeñas diferencias en resistencia durante el proceso de selección en campo es esencial disponer de un buen método de evaluación. Dos parámetros fiables para medirla y que son utilizados también para otras enfermedades (roya en cereales, Mildiu en patata,...) son la severidad y la incidencia de la enfermedad.

Diversos estudios apuntan a que existen distintos niveles de susceptibilidad entre las diferentes especies de vid, dentro de la especie *Vitis vinifera*, entre sus variedades, e incluso dentro de una misma variedad, entre sus clones. Las especies de vid americanas (*Vitis riparia*, *Vitis rupestris*) son más resistentes a la infección de estos patógenos, como consecuencia, según algunos autores (Allégre *et al*, 2006) de la coevolución patógeno-huésped. Los síntomas de cada

una de estas enfermedades son variables dependiendo de la susceptibilidad del tejido huésped, del órgano al que afecten (hoja, brote, zarcillos, racimo...), del estado vegetativo de la planta, o de otros factores como pueden ser las condiciones climáticas en las que se desarrolla la planta (Galet, 1995; Pérez, 1992).

En la época actual, en la que la utilización de variedades autóctonas de alta calidad es una de las prioridades en el mercado vitivinícola, urge la necesidad de priorizar la realización de estudios que analicen la susceptibilidad de las variedades de vid tradicionales y de calidad, frente a los diferentes patógenos que pueden afectarles. Por otro lado, la tendencia a la utilización de cultivos cada vez más ecológicos, y a la reducción del uso de plaguicidas y productos fitosanitarios, aumenta el interés sobre el tema de la selección de plantas con un cierto nivel de resistencia a determinadas enfermedades de gran incidencia en nuestra viticultura.

En el norte y noroeste de España, las condiciones de humedad y temperatura en las que se encuentran los viñedos, los hacen especialmente sensibles al ataque de estas enfermedades fúngicas. El Albariño, la variedad cultivada mayoritariamente en los viñedos gallegos y productora de vinos de alta calidad, parece muy sensible a Mildiu, a Botrytis y poco sensible a Oídio (Martínez *et al*, 2006). Diferentes trabajos sobre esta variedad han demostrado que existe variabilidad interclonal a nivel agronómico (Boso *et al*, 2004a), a nivel ampelográfico (Boso *et al*, 2005b; Martínez *et al*, 2006) y a nivel de resistencia a Mildiu (Boso *et al*, 2004b, 2005a). Por otro lado se ha observado también, que mientras el tipo de portainjerto puede influir en ciertos parámetros agronómicos (Boso *et al*, 2008), no influye en el nivel de susceptibilidad a Mildiu (Boso *et al*, 2007b).

Tanto la incidencia, como la severidad de las enfermedades fúngicas están en relación directa con las condiciones ambientales, en especial con la temperatura (en el caso del Oídio) y con la humedad (Mildiu y Botrytis). Los períodos prolongados de precipitación con temperaturas cálidas favorecen la presencia de daños severos. Otros factores a considerar son la alta fertilización con nitrógeno, una poda y manejo inadecuado, la presencia de heridas por daño mecánico, quemaduras de sol, lesiones por insectos, etc. Los pesticidas utilizados para controlar este tipo de enfermedades, son fundamentalmente de contacto y preventivos. Existen también los productos sistémicos, capaces de

entrar en el interior de la planta y distribuirse por toda ella y que, en algunos casos, tienen un cierto carácter curativo.

1.3. Características organolépticas, químicas y compuestos aromáticos de un vino Albariño

Si nos ceñimos a un vino blanco joven de la D.O. Rías Baixas o en general a un blanco joven gallego, éste destaca por su notable y fresca intensidad aromática frutal en la que predominan los aromas de frutas blancas como la manzana o la pera y cítricos. Estos aromas suelen ir acompañados en muchos casos de notas florales y herbáceas muy agradables. Son vinos con una considerable estructura y una acidez presente que le aporta frescura y juventud sin llegar a ser agresiva. Suelen ser vinos en los cuales las sensaciones sápidas se mantienen largo tiempo y cuyos aromas de boca resultan finos y frescos. Muestran unos niveles de acidez total elevados, rondando los 7 g/L (expresada en tartárico) y un contenido alcohólico ajustado que suele oscilar entre los 12 y 13% vol. Suelen ser vinos secos, con escaso nivel de azúcares residuales (entre 2 y 5 g/L) y unos valores de extracto seco entre 20 y 27 g/L. Su acidez volátil, aunque variable, suele encontrarse entre los 0,2 y los 0,5 g/L

El aroma del vino es uno de los factores más importantes de su calidad y depende del contenido de compuestos volátiles. Sin embargo, no todos los compuestos contribuyen de la misma forma en el aroma del vino. La importancia de cada compuesto depende de la correlación entre la concentración química y el umbral de percepción. Para que se tenga en cuenta, la concentración química debe ser más alta que el umbral de percepción (Valor de actividad olorosa, OAV) (Vilanova y Vilariño, 2006). Los aromas de los vinos elaborados con uvas de Albariño, tienen tres tipos de compuestos aromáticos. El aroma primario o varietal; el aroma secundario o fermentativo y el aroma terciario o post-fermentativo. El aroma terciario no se menciona en este estudio debido a que nuestras muestras de trabajo son de vinos jóvenes y dicho aroma se origina durante el envejecimiento de los vinos, que en el caso que nos ocupa, no ha tenido lugar.

El aroma primario o varietal engloba aquellos compuestos que están localizados principalmente en el hollejo de la uva (Günata *et al*; 1985a,b; Gómez *et al*, 1994; Ribereau-Gayón *et al*; 2000; Flanzky, 2000) que suponen aproximadamente el 50% del potencial aromático de la uva y junto con el de la pulpa constituyen el 70% del aroma varietal (Cordonnier y Bayonove,

1981). Entre estos compuestos se encuentran los monoterpenos y los C-13 norisoprenoides, que provienen del grano de uva y aportan los aromas florales y frutales (Peynaud y Blouin, 1996). Los terpenos, debido a su alta concentración y bajo umbral de aroma, son los principales componentes responsables del aroma primario del vino (Carballeira *et al*, 2001). Éstos se derivan principalmente del grano de uva, se sintetizan durante la maduración y cualitativa y cuantitativamente están influidos por la variedad, la tierra, el clima y las prácticas de cultivo. Aparte de dichos compuestos, también se pueden encontrar pirazinas y algunos alcoholes, que son productos secundarios del metabolismo de la planta, se distribuyen entre la pulpa y la piel de la baya, siendo la concentración de los mismos mayor en ésta última (Cortés, 1997; Fernández *et al*, 1999).

El contenido de compuestos varietales, que dependen principalmente del clima, edafología y prácticas de cultivo (Jackson y Lombard, 1993; Razungles *et al*, 1993; Belancic *et al*, 1997; Razungles *et al*, 1998; Gil, 2000) aumenta durante la maduración de la uva paralelamente al contenido de azúcar, aunque generalmente, la madurez aromática se alcanza previamente (Bayonove y Cordonnier, 1971; Marais, 1983; Marais y Van Wyck, 1986). Los compuestos responsables de este aroma pueden encontrarse tanto en forma libre, y por tanto con una contribución directa al aroma, como en forma ligada, llamándose precursores glicosilados de aromas. Ésta última es la más abundante (Günata, *et al*, 1985a).

Con el fin de liberar los terpenos conjugados y enriquecer aromáticamente el vino, se debe llevar a cabo una hidrólisis enzimática, normalmente usando preparaciones enzimáticas comerciales con actividad β -glucosidasa (Marais y Van Wyck, 1986; López-Tamames *et al*, 1997; Carballeira *et al*, 2001). En el próximo apartado comentaremos lo relacionado con la actividad de las levaduras durante la vinificación en lo referente al aroma de los vinos Albariño.

1.4. El papel de las levaduras en la calidad de los vinos. Las levaduras ecotípicas

El primer estudio científico de la microbiota de mostos de Galicia se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI), perteneciente al CSIC en el año 1974 (Iñigo y Bravo, 1977; Quecedo *et al*, 1976). En este centro se constituyó la Escuela de Madrid

de Microbiología Enológica, cuyo pionero fue Juan Marcilla (Carrascosa, 2007a), y cuyo institucionalizador fue el Prof. Baldomero Iñigo, que terminaría produciendo el primer vino ecológico español, con un concepto en el que se integraba y adquiriría un papel preponderante la microbiología de la vinificación (Carrascosa, 2007b, 2009). La investigación científica en microbiología enológica española surgía y se institucionalizaba de este modo. Aplicando este enfoque ecológico, en el mencionado estudio de los mostos de Galicia se obtuvieron levaduras autóctonas de potencial interés para la vinificación en las zonas estudiadas (Provincias de Pontevedra y Ourense). Ya entonces se observó la lentitud de la fermentación de los mostos estudiados, y se relacionó con la escasa incidencia de microbiota epifítica, originada por el uso indiscriminado de plaguicidas y las lluvias previas a la vendimia. La escasa presencia de cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en las fermentaciones espontáneas estudiadas, retrasaba en exceso el final de la fermentación. Se recomendaba ya el empleo de cultivos seleccionados para mejorar la cinética y la calidad sensorial de los vinos gallegos.

Precisamente, se sabe que las levaduras contribuyen a la composición y calidad del vino (Fleet y Heard, 1993; Herraiz *et al*, 1990; Gil *et al*, 1996) considerándose un factor muy importante en la formación de los compuestos aromáticos, ya que producen compuestos volátiles como productos secundarios durante la fermentación alcohólica, que es el proceso por el cual se transforma el mosto en vino. En dicho proceso, las levaduras fermentan los azúcares presentes en el mosto, dando lugar a CO₂, etanol y otras sustancias (Carrascosa *et al*, 2005). Las levaduras responsables de la fermentación alcohólica en la elaboración del vino provienen generalmente de la superficie de los granos de uva, de la maquinaria o de cultivos iniciadores (Fleet y Heard, 1993; Ciani, 1997). El proceso de fermentación puede ocurrir de forma espontánea o por inoculación del mosto con cultivos iniciadores (Heard y Fleet, 1985; Boulton *et al*, 1996).

En los últimos años ha habido un creciente interés en el uso de levaduras locales seleccionadas para la fermentación de los mostos, generalmente perteneciente a la especie *S. cerevisiae* y que podían tener un efecto positivo en la calidad del vino final (Regodón *et al*, 1997; Romano *et al*, 2003). De hecho, cultivos iniciadores de *S. cerevisiae* usados en algunos países han dado excelentes resultados (Fleet y Heard, 1993; Nurgel *et al*, 2003; Estévez *et al*, 2004) y en líneas generales, el producto final es de mejor calidad que el

vino producido por fermentación espontánea (Regodón *et al*, 1997; Clemente-Jiménez *et al*, 2004), aparte de obtenerse vinos de una calidad constante a lo largo de los años (Bauer y Pretorius, 2000; Fleet y Heard, 1993).

Pese a que cultivos iniciadores comerciales están disponibles para la fermentación del mosto, el uso de levaduras locales seleccionadas puede ser más eficaz, ya que pueden estar mejor adaptadas al ambiente local frente a otras (Degré *et al*, 1989; Melero, 1992; Querol *et al*, 1992). Además, el uso de estas levaduras contribuye a asegurar la permanencia de las propiedades sensoriales típicas de la región vinícola (Regodón *et al*, 1997). De ahí el interés de la Bodega Terras Gauda por buscar en sus propias instalaciones las levaduras a utilizar que, de hecho y de manera espontánea, están ya realizando la fermentación por ser ubicuas y resultar el mosto no estéril.

Respecto al modo de inocular el mosto, existen técnicas muy divulgadas en la actualidad, de ellas, la siembra directa es la más universal. Una segunda modalidad ofrece la posibilidad de utilizarlas partiendo de un pie de cuba, que suele tener a veces más interés por el modo de trabajar en la bodega. El pie de cuba, que debe representar al menos el 4% del volumen de mosto total a fermentar, constituye la operación clásica de la técnica que se ha de aplicar en las fermentaciones en pureza (Carrascosa *et al*, 2005).

El efecto de *S. cerevisiae* en la vinificación ha sido estudiado por diversos autores, observándose diferencias significativas en los compuestos volátiles tales como alcoholes superiores y ésteres (Vilanova y Masneuf-Pomarède, 2005; Vilanova y Sieiro, 2006) entre Vinos Albariño fermentados de forma espontánea y Vinos Albariño fermentados de manera controlada con cepas de *S. cerevisiae*. El papel de dicha levadura en la hidrólisis de los precursores glicoconjugados, y por tanto, su capacidad de liberación de los compuestos volátiles varietales, no estaba del todo claro.

Los primeros estudios han encontrado que los extractos enzimáticos de *S. cerevisiae* poseen poca capacidad de hidrólisis de los precursores glicosilados, especialmente cuando se comparan con otras cepas no-*S.* (Rosi *et al*, 1994; Charoenchai *et al*, 1997; McMahon *et al*, 1999). Además, se ha observado una fuerte inhibición de dicha cepa debido a la alta concentración de azúcares y etanol, y al pH del vino (Delcroix *et al*, 1994). Posteriormente, una detallada investigación acerca de la β -glucosidasa de las levaduras de distintos vinos, sugirió que dicha enzima no se inhibía a altas concentraciones de glucosa, y

por tanto, podía ser efectiva en las primeras fases de la fermentación (Mateo y Di Stefano, 1997). De hecho, algunos autores, estudiando el efecto de *S. cerevisiae* en la liberación de compuestos volátiles varietales durante la fermentación, han llegado a la conclusión de que la enzima β -glucosidasa de dicha levadura, es capaz de hidrolizar los precursores glicosilados, y liberar monoterpenos, particularmente geraniol, linalool y citronerol, que tienen un bajo umbral sensorial y por ello juegan un papel importante en el aroma de los vinos (Ugliano *et al*, 2006). Es fácil suponer que dicho papel será particularmente relevante en vinos como el Albariño.

2. OBJETIVOS

De todos es conocido que la calidad y originalidad de los vinos jóvenes (como los de Albariño) viene determinada, fundamentalmente por la calidad de la variedad y de la planta, por el óptimo manejo del cultivo y también por la utilización de técnicas enológicas adecuadas, que favorezcan el control microbiológico del proceso, algo a lo que puede contribuir, de manera determinante, la utilización de levaduras seleccionadas. El presente trabajo se centra en los viñedos propiedad de Bodegas Terras Gauda, y sus objetivos son los siguientes.

a) Selección de las plantas

En primer lugar, en la variedad Albariño, y concretamente en los 115 “clones” de esta variedad conservados por esta empresa, comprobar si los 115 “clones” de Albariño pertenecen realmente a esta variedad, y si están libres de virus. En segundo lugar, estudiar sus características agronómicas, y cuantificar su nivel de susceptibilidad a Mildiu, Oídio y Botrytis (enfermedades de mayor incidencia en la viticultura gallega). A partir de todos estos datos, intentar conjugar las condiciones de clima, suelo y características de la planta para seleccionar aquellos clones capaces de dar la máxima calidad y rendimiento en las condiciones particulares de los viñedos de la Bodega.

b) Estudio enológico de los clones de Albariño seleccionados

En función de los resultados obtenidos del estudio de las plantas (punto anterior), seleccionar aquellos clones que presenten mayor interés desde el punto de vista agronómico, de resistencia a Mildiu, Oídio y Botrytis etc, y

realizar microvinificaciones, de cada uno de los clones por separado. En cada uno de los vinos, analizar diferentes parámetros, con el objetivo de comprobar cuales producen los mejores vinos y sobre todo cuales presentan el sello único de la Bodega.

c) Selección de las levaduras y estudio enológico de las levaduras seleccionadas sobre mostos Albariño

En los mismos viñedos e instalaciones en los que se han realizado los estudios anteriores, estudiar levaduras ecotípicas durante varias vendimias, con el propósito de identificar las que de manera espontánea, actúan y se implantan de modo mayoritario en las vinificaciones, para reducir su número y poder estudiar después las propiedades enológicas. Para ello se utilizarán técnicas moleculares que permiten la identificación inequívoca de cepa.

Con cuatro cepas mayoritarias, realizar estudios de comprobación, en el laboratorio, de su predominancia en microvinificaciones, y realización de vinificaciones piloto en la Bodega, con seguimiento molecular, para comprobar la predominancia de las cepas seleccionadas. Realización de catas ciegas de los vinos producidos por cada cepa y estudio de la fracción volátil de los mismos para determinar, con base científica, los compuestos responsables del aroma de los vinos Albariño, estudiando la coincidencia de los perfiles aromáticos con los compuestos determinados, con el objetivo de seleccionar las cepas de levadura idóneas, empleando métodos moleculares para constatar predominancia de cepa y comprobando además, que lleven a cabo una correcta fermentación de los mostos con mejora de la cinética fermentativa.

d) Transferencia de los resultados y de la experiencia al sector

Para la protección en exclusiva de los resultados obtenidos en el estudio realizado por la Bodega y el Organismo, solicitar una patente de explotación de la levadura seleccionada. Al mismo tiempo, y dada la importancia y trascendencia que hoy en día tiene la presencia en medios, la cultura y divulgación científica, para la búsqueda de sinergias entre el sector público y privado en I+D, se desarrollará una importante labor de difusión del trabajo y de los planteamientos abordados. Se pretende con ello que el esfuerzo financiador de la Xunta de Galicia, de la empresa y del CSIC, llegue a ser conocido y pueda beneficiar a todo el sector industrial.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios realizados han sido llevados a cabo en coordinación entre dos grupos científicos del CSIC (MBG y IFI) y el personal técnico de Bodegas Terras Gauda S.A. Dichos trabajos fueron realizados entre los años 2003 y 2007, y su aplicación llega hasta el 2009, año en el que se vinificó toda la producción de Albariño de la Bodega, con la levadura seleccionada en este estudio.

3.1. Estudio vitícola de los clones de Albariño

Este estudio se realizó durante tres años consecutivos 2003, 2004 y 2005 y fue llevado a cabo por el grupo de la Misión Biológica de Galicia, en colaboración con el personal técnico de la bodega.

3.1.1. *Material vegetal y características de la parcela*

Desde el año 1992 se conservaban en los viñedos de la Bodega lo que ellos consideraban 115 clones diferentes de la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.). Las cepas fuente o cepas madre de cada uno de esos clones habían sido marcadas entre los años 1989 y 1990 en distintos puntos de la Provincia de Pontevedra. El criterio que se utilizó para marcarlas fue que los viticultores la identificasen como Albariño, la diferencia en las fechas en las que alcanzaban determinados estados fenológicos y la ausencia de síntomas externos de virosis.

Todas las plantas se encontraban en la misma parcela (Lat. 41° 56' 24.68" N; Long. 8° 47' 38.59" W) de los viñedos de la Bodega, a razón de 5 ejemplares por clon y sobre el mismo portainjerto (196-17). El sistema de conducción es en espaldera con una distancia entre filas de 3.5 metros y a una distancia entre plantas de 2.5 metros. El sistema de poda utilizado consiste en dejar pulgares de reposición de 2 yemas, y varas de producción de 7 yemas. El suelo es de estructura franco-arenosa, sobre una base de esquisto, poco habitual en los suelos donde se cultiva el Albariño. Este esquisto se encuentra acompañado de incrustaciones de cuarzo alcalino, lo que le aporta una menor acidez. La composición del suelo es la siguiente: arcilla: 13.8%, sílice: 16.1%, arena: 70.1%, materia orgánica: 8%. En cuanto a las condiciones climatológicas, la temperatura media anual es de 14.4°C y la precipitación media anual de 1.586 mm, con fuerte variación anual.

3.1.2. *Estudio ampelográfico*

La caracterización ampelográfica se realizó en brote, hoja, racimo, bayas y semillas.

Brote: Los muestreos de brote se realizaron cuando éstos tenían un tamaño entre 10 y 30 centímetros. Se observó un brote de cada uno de los 5 ejemplares de los diferentes clones. La mayoría de los parámetros estudiados, se observaron directamente en campo. Para los parámetros referidos a la pubescencia se empleó una lupa de campo modelo 10/40 Eschenbach 35 mm, serie 1510 (Nürnberg, Alemania). Además, con la ayuda de una cámara fotográfica digital (Nikon Coolpix 990) se realizaron fotografías de la extremidad de cada uno de los clones. Se tomó nota de los siguientes parámetros propuestos por la OIV (1983): código 001, 002, 003, 004, 005, 006.

Hoja adulta: Los muestreos de hoja adulta se realizaron entre el cuajado y el envero. Se seleccionaron 10 hojas (dos por cada una de las 5 plantas por clon). Las hojas elegidas pertenecían al nudo 8, o en su defecto el 9, contado desde la base de un pámpano fructífero que salía de madera del año, según el método de Martínez y Grenan (1999). Las hojas se recogieron en bolsas de plástico, se prensaron y se almacenaron herborizadas hasta el momento de ser medidas. Sobre las 10 hojas se midieron y observaron los siguientes parámetros propuestos por la OIV (1983): código 065, 066, 067, 068, 069, 070, 071, 072, 073, 074, 075, 076, 077, 078, 079, 080, 081, 082, 083, 084, 085, 086, 087, 088, 089, 090, 091, 092, 093. Los parámetros correspondientes a la pubescencia se observaron con ayuda de un microscopio estereoscópico conectado a una cámara de vídeo (SONY SSC-C370P). Para la toma de los parámetros cuantitativos en hoja, se realizó una fotografía de cada una de las 10 hojas por separado, con ayuda de la cámara fotográfica digital, bajo similares condiciones de iluminación, distancia, velocidad, etc. A continuación, siguiendo el método propuesto por Martínez y Grenan (1999), y mediante el programa de análisis de imágenes (analySIS 3.0), se midieron en cada una de las 10 hojas por clon, las longitudes de nervios y los ángulos. Se contó también el número de dientes y se describieron, para cada una de las 10 hojas, distintos aspectos morfológicos propuestos por Martínez y Grenan (1999). Todos estos datos fueron utilizados posteriormente para la reconstrucción de la hoja media típica de cada uno de los clones (Fig. 1).

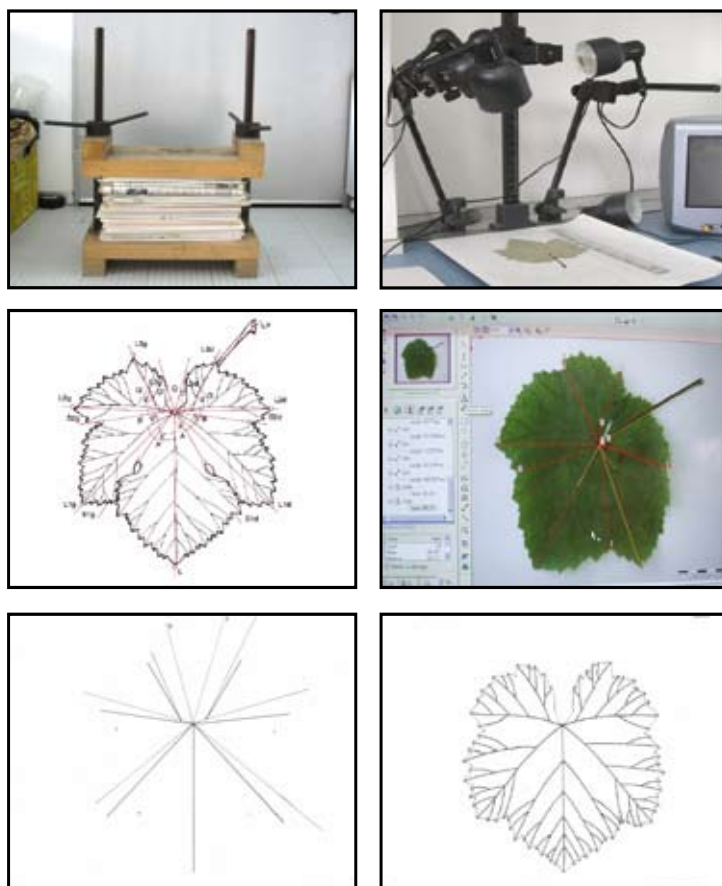


Fig. 1. Estudios ampelográficos en hoja. Método de Martínez y Grenan (1999) para la reconstrucción de la hoja media de cada clon

Racimos, bayas y semillas: En la época de maduración, de cada una de las cepas, se eligió el racimo más representativo. Posteriormente, de cada uno de los racimos, se extrajeron 5 bayas, de la parte central del mismo (a razón de 50 bayas por clon). Sobre cada uno de los racimos y bayas, se midieron y observaron los siguientes caracteres propuestos por la OIV (1983): código 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244. El parámetro morfología del racimo, ha sido modificado por nosotros estableciendo las siguientes clases: 1=Cónico, 2=Cónico con un ala, 3=Cónico con dos alas, 4=Cónico con zarcillo, 5=Cilíndrico, 6=Ramoso, 7=Doble.

3.1.3. Análisis molecular

En la época de poda, se recogieron 10 estaquillas de cada uno de los clones (dos estaquillas por planta), se desinfectaron, parafinaron y se plantaron meses más tarde en macetas en el invernadero. Cuando las estaquillas brotaron se recogieron hojas jóvenes de cada una de ellas y se congelaron a -80°C hasta su utilización.

Para la caracterización molecular se emplearon 6 loci microsatélite (SSR) seleccionados para la caracterización de cultivares de vid (This *et al.*, 2004), y que son los siguientes: VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79. Estos microsatélites han sido incluidos como seis descriptores más en la nueva versión del código para la caracterización de variedades y especies de *Vitis*, de la Organización Mundial de la Viña y el Vino (OIV) de 2007.

3.1.4. Estudio del estado sanitario

Se realizó un test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para evaluar el estado sanitario de los clones respecto a las siguientes virosis: el virus del entrenudo corto infeccioso de la vid (GFLV); virus del enrollado de la viña I y III (GLRaVI y GLRaVIII) y el virus del mosaico del Arabis (ArMV).

3.1.5. Comportamiento fenológico

Desde mediados del mes de marzo se fue tomando nota, cada semana, del estado de desarrollo de los distintos órganos de la planta, según los métodos de Eichhorn y Lorenz (1977) y Bagliolini (1952). Se empezó en el estado de yema dormida y se terminó en la maduración,

3.1.6. Estudio agronómico

Para determinar el comportamiento agronómico de cada uno de los clones de Albariño, se midieron distintos parámetros en los racimos, bayas, semillas y mostos en cada una de las vendimias (2003, 2004 y 2005). En el mes de septiembre se hizo un control de maduración, y cuando los primeros clones alcanzaron el óptimo de maduración (momento en el que deja de aumentar la concentración de azúcar), se vendimiaron todos a la vez. En la época de vendimia, se recogió toda la cosecha de cada cepa cortando los racimos a ras de pámpano y se depositaron en una caja debidamente etiquetada. Para

cada uno de los clones, se midió el peso (kg) de uva por cepa y se estimó la producción total en kilogramos por hectárea. También se calculó el índice de fertilidad a partir del número de yemas dejadas en la poda y el número de racimos producidos mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de fertilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de racimos totales} \times 10}{\text{N}^{\circ} \text{ de yemas totales}}$$

A continuación, para cada clon, se seleccionaron 10 racimos representativos y en cada uno de ellos se midieron los siguientes parámetros: peso (g), longitud y anchura (cm) y longitud (cm) del pedúnculo del racimo. Posteriormente, de cada uno de los 10 racimos representativos por clon, se extrajeron bayas, de la parte central del mismo (hasta un total de 50 bayas), y en ellas se midieron los siguientes parámetros: Longitud (cm) del pedicelo de cada baya, longitud y anchura (cm) y peso (g) de cada baya. Después, con la ayuda de un bisturí, se extrajeron y contaron las semillas que había en el interior de cada una de las 50 bayas. Se dejaron secar, se almacenaron hasta el momento de ser medidas. De cada clon, se seleccionaron 50 semillas y se midió el peso (g), largo y anchura (cm) de cada una de ellas.

Mosto: Entre los racimos de cada cepa, se recogieron 10 bayas de la zona media del racimo. Se pesaron y se introdujeron en un tubo de centrifuga. A continuación se trituraron levemente y fueron centrifugadas durante 3 minutos a 3.000 r.p.m. tal y como propone la OIV (1983), (código N° 233). A continuación, se midió el volumen obtenido de sobrenadante, y se calculó el rendimiento en mosto yema (%) (primer mosto obtenido a partir de un prensado ligero de las uvas) según la fórmula siguiente: (ml de mosto obtenido/ peso 10 bayas) x 100. Mediante refractometría se determinó el Grado alcohólico probable en °Baumé. Se calculó la acidez total (g/L ácido tartárico) según el Método Volumétrico con Patrón de Coloración publicado en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE, 1990), y con un pH-metro se determinó el pH del mosto.

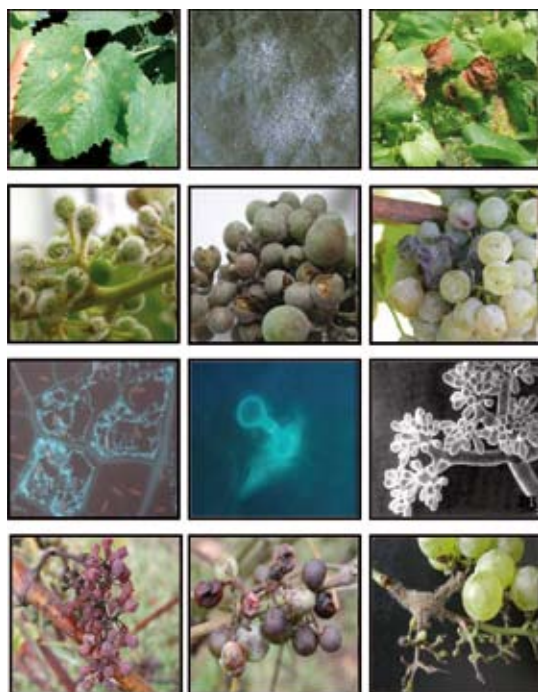


Fig. 2. Síntomas de Mildiu, Oídio y Botrytis en Albariño y detalles del hongo causante del Mildiu (*Plasmopara viticola*).

3.1.7. Cuantificación susceptibilidad a enfermedades fúngicas

Este estudio se realizó en hoja y en racimo. El estudio realizado en hoja fue llevado a cabo a partir de estaquillas plantadas en macetas (10 estaquillas por clon), con el objeto de no dañar las cepas que estaban en plena producción. Las macetas se situaron a su vez en la misma parcela en la que estaban los clones. El estudio en racimo se llevó a cabo en las cepas plantadas en campo.

Las enfermedades estudiadas fueron Mildiu (*Plasmopara viticola*), Oídio (*Uncinula necator*) y Botrytis (*Botrytis cinerea*) (Fig. 2). De las 10 plantas puestas en maceta, a 5 de ellas se les aplicaron los tratamientos fitosanitarios habituales (plantas testigo) y las 5 restantes no se le aplicó tratamiento alguno. Tal y como se acaba de explicar anteriormente, todas las macetas se colocaron en la misma parcela en la que estaban plantados los clones, para que las condiciones climáticas fuesen las mismas.

a) Plantas en maceta

En el mes de julio, cuando ya existía un elevado porcentaje de hojas con síntomas de Mildiu, se realizó en las macetas el primer muestreo. Para ello se marcaron todas las hojas con síntomas de Mildiu con un número. A continuación, con ayuda de una cámara digital, se realizó una foto de cada una de las hojas. Posteriormente mediante un procesador de análisis de imágenes (análySIS 3.0), se midió el área total de la hoja y el área de cada una de esas manchas. Además se contó el número de manchas, y el número de hojas con síntomas de Mildiu, Oídio y Botrytis.

A partir de estos parámetros base se calcularon, para cada hoja, los siguientes coeficientes:

Incidencia Mildiu: nº de hojas con síntomas de Mildiu / número total de hojas.

Severidad Mildiu: suma de la superficie de las manchas /superficie total de la hoja.

Intensidad Mildiu: nº manchas en cada hoja /superficie total de la hoja

Incidencia Botrytis: nº de hojas con síntomas de Botrytis / número total de hojas.

Severidad Botrytis: suma de la superficie de las manchas /superficie total de la hoja.

Intensidad Botrytis: nº manchas en cada hoja /superficie total de la hoja

Incidencia Oídio: nº de hojas con síntomas de Oídio / número total de hojas.

Dos semanas más tarde, se hizo un segundo muestreo para cuantificar la resistencia a Mildiu, Oídio y Botrytis. No se hizo estudio de resistencia en racimo, dado que las plantas sólo llevaban unos meses en maceta y no dieron racimos.

b) Plantas en la parcela de selección

En la parcela de selección, se contó el número de hojas totales de cada ejemplar y el número de hojas con síntomas de Mildiu, Oídio y Botrytis.

Además se contaron y se pesaron (por separado para cada enfermedad) los racimos afectados por estas tres enfermedades. También se contaron y pesaron todos los racimos de cada cepa. A continuación se calcularon los siguientes



Fig.3. Toma de muestras para el estudio en campo de susceptibilidad a enfermedades fúngicas en Albariño.

coeficientes: Incidencia a Mildiu, Oídio y Botrytis en hoja, Incidencia a Mildiu, Oídio y Botrytis en racimo (teniendo en cuenta el nº de racimos) e Incidencia a Mildiu, Oídio y Botrytis en racimo (teniendo en cuenta el peso de los racimos) (Fig. 3).

3.1.8. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos durante los tres años de estudio fueron sometidos a diferentes análisis estadísticos (Análisis de varianza y Análisis en Componentes

Principales). Todos ellos se realizaron con el paquete estadístico SAS System v. 8.1 (SAS 2000).

De los 115 clones iniciales, en función de los resultados obtenidos tras nuestro estudio ampelográfico, molecular y sanitario, se descartaron todos aquellos que o bien presentaban presencia de virus o tenían algún otro problema (yesca, ausencia de repeticiones, problemas de vigor, etc...). Los clones que se seleccionaron siguiendo este criterio fueron 22, y se numeraron de la A a la Z. Sobre cada uno de estos 22 clones, se realizaron los estudios completos tanto a nivel agronómico, como de susceptibilidad a enfermedades fúngicas, además de las microvinificaciones.

4.2. Estudio enológico de los clones de Albariño seleccionados

3.2.1. Microvinificaciones

Esta parte del trabajo fue llevada a cabo por el personal técnico de la bodega, con la colaboración del grupo de la MGB, en las instalaciones de la empresa.

Las microvinificaciones se llevaron a cabo únicamente con los 22 clones seleccionados a partir de los 115 iniciales. Para cada uno de los tres años de estudio (2003, 2004, 2005), todos los clones fueron vendimiados el mismo día. La uva de las cinco cepas de cada clon se juntó y se realizó un despallado y un estrujado suave. La pasta fue sulfitada a razón de 4g/Hl de SO₂. Se realizó una maceración en frío (10-11°C) durante 6 horas para extraer la mayor cantidad de aromas terpénicos. Una vez terminada la maceración la pasta se prensó con prensa hidráulica obteniendo un rendimiento medio del 60%. El mosto fue desfogado durante 48 horas por sedimentación y a continuación se llevó a una temperatura de 17-18°C para realizar la fermentación alcohólica. Las fermentaciones se realizaron en un volumen de 30 litros y se desarrollaron con la microbiota autóctona durante 23 días. Una vez finalizada la fermentación se realizó una decantación a 12°C, durante 10 días. El vino se trasegó y se le adicionó SO₂, dejando 25 mg/L de SO₂ libre. Los depósitos se mantuvieron en atmósfera de nitrógeno (Fig. 4).



Fig. 4 Realización de microvinificaciones de clones de Albariño.

3.2.2. Realización de catas y análisis organolépticos de los vinos obtenidos

Cada año y una vez embotellados los 22 vinos, se realizó un análisis sensorial por parte del personal técnico de la bodega. Los catadores eran profundos conocedores de los vinos de la Bodega y tenían muy claros los aspectos que querían ver reforzados en ellos. Así se tomó nota del color y de las características olfativas y gustativas.

3.2.3. Análisis químicos de los vinos

Se hicieron los siguientes análisis, todos ellos según los métodos oficiales del Reglamento CEE 2676/90 (1990): pH (medido con pHmetro), contenido en etanol (por destilación), acidez total (por valoración con azul

de bromofenol como indicador), acidez volátil (por valoración de ácidos volátiles del vino mediante destilación y valoración del destilado), azúcares reductores (mediante determinación de glucosa y fructosa utilizando métodos enzimáticos)

3.2.4. Análisis de los aromas varietales y fermentativos de cada uno de los clones

El segundo año de estudio (2004) se realizó un análisis de los aromas varietales (terpenos libres) y aromas fermentativos (alcoholes superiores, ésteres, acetatos y ácidos) por cromatografía de gases. Para la extracción de terpenos y norisoprenoides, libres y ligados, se siguió el método propuesto por Di Stefano *et al* (1991) modificado por Versini (1994), que implica una extracción en fase sólida donde los distintos compuestos aromáticos y sus precursores fueron fraccionados por retención selectiva en cartuchos C18. Los alcoholes superiores, debido a sus elevadas concentraciones en el vino, no requieren extracción previa a su análisis por cromatografía de gases. Para la determinación de dichos compuestos se siguió el método propuesto por Bertrand (1981). A partir de una muestra de 10 mL de vino + 1 mL de patrón interno (4-metil-2-pentanol, 1g/L) se hace inyección directa de 2 μ L de la mezcla en el cromatógrafo de gases. Para la extracción de ésteres etílicos y acetatos de alcoholes superiores se siguió el método propuesto por Bertrand (1981). A 50 mL de vino se le añadió 1mL de ácido sulfúrico (1/3) y 1 mL de patrón interno (3-octanol, 50 mg/L). A continuación se realizó una triple extracción con 4, 2 y 2 mL de éter dietílico-hexano (1:1) con agitación de 5 minutos a 600 r.p.m. Las fases orgánicas se reunieron y se concentraron bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen de 0.5 mL.

Todos los extractos fueron analizados utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series II, equipado con una columna Chromatopack CO-WAX 57 CB (50m x 0.25mm x 0.20 μ m), inyector automático HP 6890 y un detector de ionización de llama (FID), modificando las condiciones cromatográficas para la correcta separación de las distintas familias de compuestos aromáticos.

3.3. Selección levaduras ecotípicas en viñedos de Albariño

Esta parte del trabajo fue llevada a cabo por el grupo de investigación del IFI, dirigido por el Dr. Carrascosa, con la colaboración de técnicos de la bodega y del grupo de la MBG.

3.3.1. Elaboración de los vinos blancos de la variedad Albariño y diferenciación de las cepas de levadura mediante métodos de biología molecular

En años anteriores se llevó a cabo el estudio faunístico de la microbiota espontánea de la fermentación de mostos Albariño de la Bodega. Se tomaron muestras reales de vinificaciones espontáneas, sobre las cuales se llevó a cabo el recuento y aislamiento de cepas de levadura. Se estudiaron los patrones obtenidos en las muestras reales y se anotaron los porcentajes de dominancia en dos vendimias consecutivas. Los ensayos de laboratorio, que consistieron en la inoculación simultánea de los mostos con varias cepas de *S. cerevisiae* correspondientes a los perfiles predominantes, aportaron información en el mismo sentido, esta vez en experimentos controlados. Sobre los resultados de todas las experiencias, recogidos en la memoria de los resultados de 2005, se realizó un estudio pormenorizado de la abundancia de las cepas, entendiendo que las cepas más abundantes serían en principio las que deberían considerarse bien adaptadas. Como resultado del mismo se eligieron las cepas 1, 2, 3 y 4 como cepas ajustadas al objetivo principal del proyecto en lo que se refiere a su buena adaptación.

Para ellas, de acuerdo en todo momento con la Bodega, se diseñaron los experimentos a realizar para confirmar su capacidad de predominancia en vinificaciones con mostos de Albariño, y aquellos necesarios para obtener cantidad suficiente de vino en los que hubiese predominado cada una de las cepas inoculadas, para poder así contar con producto susceptible de análisis sensorial por parte de la empresa, y análisis de compuestos volátiles. Se podría contar así con datos suficientes para culminar el objetivo principal. Así mismo, se realizaron experimentos para demostrar la resistencia a la liofilización de la colección de cepas de *S. cerevisiae* de la Bodega.

3.3.2. Experimentos a escala de laboratorio

a) Inoculación del mosto

Tubos de ensayo con 5 ml de YPD (1% extracto de levadura, peptona 2%, glucosa 2%) se inocularon con una colonia de las cepas 1, 2, 3 y 4. Tras 12 h de incubación a 30°C y 200 r.p.m., matraces con 1L de YPD se inocularon a una densidad de 10 cel/ml con cada uno de los cultivos, que se incubaron a 30°C bajo agitación durante 36 horas. Finalmente, se incubaron 200 ml de mosto inoculados a una densidad de 10⁶ cel/ml con cada una de estos cultivos, en estático a 20°C. Como control de la fermentación se dejó una muestra de mosto sin inocular. Se perseguía con estos ensayos de laboratorio confirmar la capacidad de predominancia de las cepas en unas condiciones más controladas que en la bodega, para poder contrastar resultados caso de problemas en bodega.

b) Seguimiento del proceso fermentativo

El objetivo de este ensayo fue el de conocer si la dinámica fermentativa transcurría más rápido en los mostos inoculados que en el mosto control, en el que se produjo la fermentación espontánea. El seguimiento de la fermentación de cada una de las muestras de mosto inoculadas con las diferentes cepas se llevó a cabo mediante la cuantificación de azúcares reductores. Para ello, se recogieron muestras de 2 ml durante el transcurso de la fermentación, que se centrifugaron para eliminar las células y se incubaron durante toda la noche a 37°C con invertasa (2.82 mg/L) para asegurar la hidrólisis completa de la sacarosa residual. Posteriormente, se realizaron diferentes diluciones de las muestras en un volumen final de 500 µl, que se mezclaron con 500 µl de DNS (ácido dinitro-3,5-salicílico 1% (p/v), sulfito sódico 0.05% (p/v), NaOH 1% (p/v)). Las mezclas se incubaron durante 5 minutos en un baño a 90°C, se enfriaron en hielo y se añadieron 167 µl de tartrato sódico-potásico 40% (p/v), para finalmente determinar los valores de absorbancia a 575 nm. A partir de estos datos se determinó la concentración de azúcares reductores de cada muestra interpolando los valores de absorbancia en una recta patrón de concentraciones de glucosa conocidas (entre 0 y 2.5 g/L). Al final de este estudio se determinó la concentración de levaduras viables.

c) *Aislamiento de colonias*

A lo largo de la fermentación de cada mosto se extrajeron muestras para proceder al aislamiento de las colonias de levadura provenientes de las diferentes fases del proceso fermentativo. El objetivo del aislamiento era el de contar con ejemplares sobre los cuales realizar el estudio de ADN-mitocondrial que permitiese comprobar la predominancia de la cepa inoculada. Para ello se realizaron diluciones en NaCl 0.9 % estéril de las muestras extraídas y 100 μ L de cada una de ellas se extendieron sobre placas de YPD. Tras dos días de incubación a 30°C se procedió al recuento de viables en placa así como a la conservación en YPD con 10 % de glicerol de 30 de las colonias aisladas en cada toma de muestra. Finalmente, cada una de estas colonias se caracterizó molecularmente mediante extracción del ADN total y posterior digestión con *Hinf*I.

d) *Extracción de ADN total de levaduras*

El objetivo de estos análisis del ADN-mitocondrial fue el de poder tener la certeza de que las cepas de levadura seleccionada se imponían en las fermentaciones, frente a la microbiota indígena del mosto Albariño suministrado que, como no se esterilizó, se encontraba microbiológicamente contaminado. Para la extracción de ADN genómico de levaduras se utilizó un método basado en los métodos de Querol *et al* (1992). Se realizaron inóculos de 5 ml de YPD con cada una de las 30 colonias de levadura aisladas de los mostos inoculados con las cepas 1, 2, 3 y 4 y del mosto sin inocular a lo largo de las diferentes fases del proceso fermentativo. Tras 12 horas de incubación a 30°C con agitación, las células del cultivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 500 μ l de solución SE con zymoliasa 20T (10 mg/ml). Después de 2 horas de incubación a 37°C, cada muestra se centrifugó 1 min para sedimentar los esferoplastos que posteriormente se resuspendieron en 500 μ l de 50mM Tris-HCl-20 mM EDTA, pH 7.4. Para favorecer la lisis celular se añadieron 25 μ l de dodecil sulfato sódico (SDS) al 20 % y la muestra se incubó a 65°C durante 30 min. Posteriormente se añadieron 200 μ l de acetato potásico 5 M, se incubó la muestra durante 30 min en hielo y se centrifugó durante 5 min. Se añadió un volumen de isopropanol sobre la fracción sobrenadante y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 min antes de una centrifugación de 10 min para favorecer la precipitación del ADN. Para eliminar restos de sales se hizo un lavado con etanol al 70

% y finalmente se resuspendió el ADN en 20 μ l de TE. Para determinar la eficiencia del proceso de extracción 3 μ l de las muestras de ADN se cargaron en un gel de agarosa para su posterior visualización.

e) Digestión de ADN

Una vez determinadas las concentraciones relativas de ADN mediante visualización en geles de agarosa, se digirieron cantidades similares de ADN empleando diferentes volúmenes de cada muestra (entre 3 y 8 μ l). Las digestiones del ADN total se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l, durante 12 horas a 37°C empleando la enzima de restricción *Hinf*I (U/ μ g) y el tampón recomendado por el proveedor (H).

f) Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación y visualización de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0.7 % sumergidos en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM pH 7.5, ácido acético 4 M, EDTA 1 mM pH 8). Para la migración del ADN se aplicó un voltaje de 5 V/cm y el patrón de ADN utilizado fue λ H + E (ADN de fago lambda digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI). Para visualizar el ADN, los geles previamente incubados durante 15-20 minutos en una solución de bromuro de etidio (5 μ g/ml) se irradiaron con luz ultravioleta ($\lambda=312$ nm) en un transiluminador.

3.3.3. Experimentos en bodega

El objetivo de los experimentos en bodega fue el de conseguir, en condiciones reales, evidencias que nos permitiesen confirmar la capacidad de predominancia de las cepas seleccionadas, así como cantidad suficiente de vino como para poder hacer el análisis sensorial por parte de los catadores de la Bodega, y los análisis cromatográficos de compuestos volátiles.

a) Preparación de los inóculos

Se inocularon colonias aisladas de las cepas 1, 2, 3 y 4 por separado en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de YPD. Tras 12 h de incubación a 30°C y 200 rpm, matraces con 1 L de YPD se inocularon con cada una de las cepas a una densidad inicial de 10 cel/ml. Tras 36 horas de incubación a 30°C con agitación, las células de los cultivos se sedimentaron por centrifugación a

3000g durante 5 min a 4°C, realizándose dos lavados con NaCl 0.9 % estéril para eliminar los restos de YPD. Finalmente aproximadamente 3.10^{10} células de cada una de las cepas se disolvieron en 100 ml de NaCl 0.9 % estéril y se conservaron a 4°C hasta el momento de su inoculación en el mosto.

b) Inoculación del mosto en bodega y recogida de muestras

Se inocularon tanques de 30 L de mosto con cada una de las cepas 1, 2, 3 y 4, por triplicado, reservándose tres tanques con mosto sin inocular como control del experimento. El seguimiento de la fermentación se llevó a cabo en la propia bodega mediante la determinación de la densidad del medio, y durante las fases inicial (tiempo cero), tumultuosa (crecimiento exponencial) y final (fermentación concluida) de la fermentación se extrajeron muestras de 250 ml para la realización de los ensayos analíticos. Para la extracción de muestras el contenido de los tanques previamente era homogeneizando por removido con una vara de acero inoxidable, limpiada con etanol entre la homogeneización de los mostos inoculados con las diferentes cepas. Junto con las muestras de 250 ml, para la realización de los ensayos de imposición se obtuvieron muestras de 50 ml a las que se le añadió glicerol a concentración final del 10 %. Todas las muestras se conservaron congeladas desde el momento de su obtención.

c) Aislamiento de colonias y su caracterización molecular

Para el aislamiento de colonias de levadura se descongelaron las muestras de mosto conservadas en una disolución de glicerol obtenidas a lo largo del proceso fermentativo. El procedimiento de aislamiento y conservación de colonias fue idéntico al explicado anteriormente para los experimentos a escala de laboratorio. Igualmente, la caracterización molecular de las colonias implicó la extracción del ADN total, la restricción con la enzima *HinfI* y su posterior visualización en geles de agarosa.

3.3.4. Preparación de inóculos para procesos fermentativos con la cepa 1

Con objeto de conocer si la cepa elegida por su capacidad de adaptación, predominancia e incentivación de la tipicidad de los vinos Albariño de la bodega Terras Gauda, que resultó ser como veremos en los resultados la cepa 1, podría ser inoculada utilizando la técnica del pié de cuba tradicional comúnmente aplicada en la bodega, se diseñó un estudio a escala laboratorio

de reposición de 5% de mosto en fase tumultuosa con 95% de mosto nuevo (Figura 5), haciendo un estudio molecular paralelo del nivel de imposición de la cepa inoculada, para poder utilizar los resultados como base científica del escalado llevado a cabo en la vendimia de 2007.

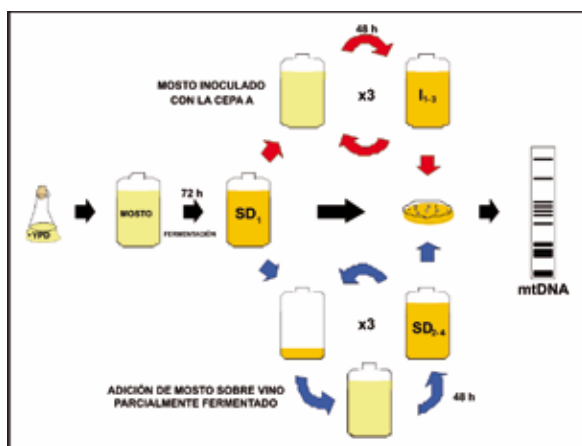


Fig. 5. Esquema de resiembras para valorar la imposición de la cepa seleccionada en un pié de cuba simulado en el laboratorio

A partir de una colonia aislada de la cepa 1 se realizó un preinóculo en 5 ml de YPD, que una vez crecido se utilizó para inocular 100 ml de YPD a una densidad inicial de 10^4 cel/ml. Después de aproximadamente 12 horas de incubación a 30°C en agitación, 200 ml de mosto se inocularon a una densidad de 10^5 cel/ml con el cultivo crecido. Esta muestra recibió el nombre de SD_1 . Tras 72 horas de incubación a 20°C sin agitación se extrajeron muestras de SD_1 que se diluyeron y extendieron sobre placas de YPD para aislar colonias y proceder posteriormente a su caracterización molecular. A su vez, tras la incubación de 72 h, 10 ml de SD_1 se transfirieron a 190 mL de mosto, constituyendo la muestra I_1 y 180 ml de mosto se añadieron sobre 20 ml de SD_1 , dando lugar a lo que se denominó muestra SD_2 . Las muestras I_1 y SD_2 se incubaron durante 48 h a 20°C sin agitación, y transcurrido este tiempo se procedió al aislamiento de colonias y a su caracterización molecular. Se añadió un volumen de 180 ml de mosto sobre 20 ml de SD_2 dando lugar a la muestra SD_3 y se inocularon 10 ml de I_1 sobre 190 ml de mosto, constituyendo la muestra I_2 . Este proceso se repitió una tercera vez (generación de las muestras I_3 y SD_4).

El mismo experimento se llevó a cabo utilizando volúmenes de muestra de 900 ml. Las proporciones de los volúmenes de los inóculos se mantuvieron con respecto al experimento anterior. En este caso, las muestras I_{1-3} se inocularon con volúmenes de 45 ml, mientras que la obtención de SD_{2-4} implicó la transferencia de 810 mL de mosto sobre 90 mL de muestra.

3.3.5. Conservación de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cada cepa se conservó a -70°C en una solución de YPD con glicerol al 10%. Adicionalmente se procedió a la obtención de levaduras secas activas mediante liofilización de la biomasa disuelta en un medio de leche desnatada al 10%. Inicialmente, tras 48 horas de incubación en placas de YPD, se obtuvo un césped de levaduras que se disolvió en 5 ml de leche desnatada al 10%. Las muestras fueron congeladas a -70°C durante 48 horas antes de proceder a su liofilización, obteniéndose tres muestras de cada levadura seca activa. Para determinar el número de viables después del proceso de liofilización, cada cepa se disolvió en 2 ml de una solución estéril de NaCl al 0.9%, a partir de la cual se hicieron diluciones que se sembraron en placas de YPD para posteriormente proceder al recuento de colonias. El resto de las muestras de cada triplicado se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización, dos meses después, cuando se volvió a determinar la viabilidad de las levaduras. Con estos ensayos se obtenía información sobre la susceptibilidad de las cepas a ser liofilizadas para poder garantizar así a la bodega cultivos stock de larga duración.

a) Recuento de células de un cultivo de levadura

Para el recuento con microscopio del número de células en un cultivo de levaduras se realizaron diferentes diluciones del cultivo, aplicándose 20 μl de las mismas en una cámara de recuento Glasstic[®] (Kovac, Kassel). Para dicho recuento se seleccionaron aquellas diluciones que daban un número de 40-100 células por área de recuento. El número de células por mililitro de cultivo era calculado a partir de la media obtenida tras el recuento de 9 de éstas áreas.

3.3.6. Determinación de compuestos volátiles de los vinos blancos Albariño producidos en bodega en 2006

El análisis de los compuestos volátiles de los vinos base se ha realizado por cromatografía de gases mediante inyección directa y detección con el

empleo de un detector de ionización de llama (DI-GC-FID), en el caso de los volátiles mayoritarios, con microextracción en fase sólida del espacio de cabeza, previo al análisis cromatográfico, y empleo de un detector de ionización de llama (HS-SPME-GC-FID) en el caso de los compuestos minoritarios. El objetivo de esta parte del estudio era poder establecer una relación entre la cepa inoculada y los caracteres organolépticos relacionados con la cata, a través del estudio de la fracción volátil. Identificado por los expertos de la bodega el vino más ajustado al perfil idóneo del vino Albariño a obtener, elegido de entre los producidos por fermentación controlada por las cepas inoculadas, y tras haber comprobado molecularmente que la cepa inoculada había predominado en la fermentación, con lo que se podrían atribuir a su actividad los caracteres organolépticos descubiertos, los datos del estudio de la fracción volátil servirían para saber si todo ello tendría una base científica sólida.

a) Análisis de los compuestos volátiles de los vinos por inyección directa

Se determinaron los siguientes compuestos volátiles: Alcoholes: Metanol, 1-Propanol, Isobutanol, 2-metil-1-Butanol, 3-metil-1-Butanol. Aldehidos: Acetaldehido

A 10 ml de vino se añadieron 50 μ l de patrón interno (0,06g de 3-pentanol preparado en una solución de etanol al 10%). Se inyectó 1 μ l de esta solución en modo split (1/15) en el cromatógrafo de gases. Cada muestra se analizó por triplicado (Pozo Bayón, 2002). Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard M-5890 serie II, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con inyector split/splitless. La separación se realizó en una columna capilar Carbowax 20M de 50m de longitud y 0,25 μ m de espesor de película de fase. El control del equipo, la adquisición y el procesado de datos, se llevaron a cabo con el programa HP-Chem. La separación se llevó a cabo con una temperatura inicial del horno de 40°C durante 10 minutos, aumentando 7°C/min hasta 150°C y 30°C hasta 210°C, durante 2 minutos. Como gas portador se empleó helio, con una presión de 12,5 psi. La temperatura del inyector y detector fue de 220°C

La identificación de los distintos compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención, relativos al patrón interno, con los de los compuestos empleados como referencia (Tabla 1). La cuantificación se llevó a cabo por comparación del área de cada compuesto, relativa al patrón interno, con la

obtenida en la recta de calibrado correspondiente a cada sustancia patrón, en las mismas condiciones que la muestra problema.

b) Análisis de los compuestos volátiles de los vinos por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME-GC)

El análisis de los compuestos volátiles que se encuentran en los vinos en concentraciones menores de 10 mg/l, requieren una etapa previa de extracción y concentración. Se empleó la técnica de HS-SPME, previa a su separación por cromatografía de gases. Para la identificación de los diferentes compuestos se ha empleado la ionización de llama (FID).

Tabla 1. Tiempo de retención (min) de los patrones internos empleados como referencia en las condiciones del ensayo.

COMPUESTO	T _R (min)
Acetato de Etilo	11,77
Metanol	12,24
1-Propanol	17,86
Isobutanol	21,33
3-Pentanol(PI)	22,43
2-metil-Butanol	28,87
3-metil-Butanol	29,05

Se determinaron los siguientes compuestos volátiles: Ésteres: Acetato de Isobutilo, Butanoato de Etilo, Acetato de Butilo, Acetato de Isopentilo, Hexanoato de Etilo y Decanoato de Etilo; Ácidos: Ácido Hexanoico y Ácido Octanoico.

En un vial de muestra de 12 ml se introducen 5 ml de vino, 25µl de patrón interno (6 mg de nonanoato de metilo/100 ml de etanol) y 2g de NaCl para favorecer el proceso de extracción. La muestra se dispone en un baño termostatzado a 40°C con agitación magnética. La fibra de 10 mm de longitud, recubierta con una fase de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm, se introduce a través del septum del vial en el espacio de cabeza confinado entre la muestra y el tapón y se mantiene en las condiciones señaladas durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, la fibra se lleva al glass liner del inyector

en modo splitless, donde permanece 10 min para que tenga lugar la desorción de todos los compuestos extraídos. Los análisis se hicieron por duplicado (Pozo Bayón, 2002)

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, M-5890 serie II, con detector de ionización de llama (FID) e inyector split/splitless. La separación se llevó a cabo en una columna capilar Carbowax 20M de 50 m de longitud, 0,25 μm de espesor de película de fase. El control del equipo, la adquisición y el procesado de datos, se llevaron a cabo con el programa HP-Chem (HP 3365, serie II, Chemstation). La separación se realizó con una temperatura inicial del horno de 70°C, aumentando 5°C/min hasta 200°C y 3°C/min hasta 215°C. Una vez alcanzada esta temperatura se mantiene durante 10 min. Se utilizó He como gas portador con una presión de 14,5 psi. La temperatura del inyector y del detector fue de 250°C

La identificación de los distintos compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención (Tabla 2), relativos al patrón interno, con los de los compuestos empleados como referencia. La cuantificación se llevó a cabo por comparación del área, relativa al patrón interno de cada compuesto, con la obtenida en la recta de calibrado correspondiente a cada sustancia patrón, en las mismas condiciones que la muestra problema.

Tabla 2: Tiempo de retención de los patrones internos empleados como referencia en las condiciones del ensayo.

COMPUESTO	T _R (min)
Acetato de Isobutilo	7,61
Butanoato de Etilo	7,85
Acetato de Butilo	8,25
Acetato de Isopentilo	8,95
Hexanoato de Etilo	10,87
Acetato de Etilo	11,68
1-Hexanol	13,99
Octanoato de Etilo	16,05
Nonanoato de Metilo(PI)	16,91
Decanoato de Etilo	21,22
Ácido Hexanoico	26,57
Ácido Decanoico	31,19

c) Análisis de los compuestos volátiles libres de uva (terpenos libres)

Se determinaron los siguientes terpenos libres y alcoholes: Terpenos libres: Limoneno, Linalool, Terpin-4-ol, Terpineol, Citronerol, Nerol, Geraniol, β -Damascenona, α -Ionona, β -Ionona y Eugenol. Alcoholes: 2-Feniletanol.

Los terpenos libres y conjugados fueron fraccionados por retención selectiva en columnas SepPak Vac C-18 (1g) (Waters, Milford, Massachussets, Ireland) según el procedimiento descrito por Di Stefano (1991), con algunas modificaciones (Cortés, 1997). Las columnas fueron acondicionadas con 5 ml de metanol y 10 ml de agua destilada.

A 100 ml de vino diluidos con 100 ml de agua destilada, se le adicionó 1 ml de patrón interno (10 ppm de 3-Octanol preparado en una solución de etanol al 100%). Se pasó a través de la columna, lavando el residuo con 25 ml de agua destilada. La fracción libre fue eluida con 10 ml de pentano-diclorometano (2:1), la solución fue desecada con sulfato de sodio anhídrido y concentrada hasta 0,5 ml en un rotavapor Büchi (Büchi Labortechnik AG, Fawil, Suiza) para su posterior análisis en GC. La fracción conjugada fue eluida con 10 ml de metanol y concentrada hasta sequedad por rota-evaporación la cuál fue disuelta con anterioridad en 5 ml de un buffer citrato-fosfato pH 5,0 y disuelta con 200 μ l de la enzima de acción β -glicosidasa (AR-2000 Gist Brocades, France) (0,5 g en 5 ml de citrato-fosfato pH 5,0) e incubada a 40 °C por 18 horas. El aglicón fue extraído en la columna de SePack Vac C-18 (1g) seguido por el procedimiento descrito previamente, para la forma libre. (Vilanova y Martínez, 2007; Aldave, 1999).

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard M-5890 serie II, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y con inyector split/splitless. La separación se realizó en una columna capilar Carbowax 20M de 50 m de longitud y 0,25 μ m de espesor de película de fase. El control del equipo, la adquisición y el procesado de datos, se llevaron a cabo con el programa HP-Chem. La separación se llevó a cabo con una temperatura inicial del horno de 70°C durante 5 min, aumentando 2 °C/min hasta 120 °C y 3 °C/min hasta 215 °C, durante 25 minutos. Como gas portador se empleó helio, con una presión de 14,5 psi. La temperatura del inyector fue 250 °C y detector fue de 260 °C.

La identificación de los distintos compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención, relativos al patrón interno (Tabla 3), con los de los compuestos empleados como referencia.

Tabla 3. Tiempo de retención de los patrones internos empleados como referencia en las condiciones del ensayo

COMPUESTO	T _R (min)
Limoneno	24,35
3-Octanol(PI)	27,18
Linalool	36,20
Terpin-4-ol	41,79
Terpineol	45,12
Citronerol	46,97
Nerol	48,11
Geraniol	49,95
β-Damascenona	51,25
α-Ionona	52,24
2-feniletanol	54,31
β-Ionona	57,71
Eugenol	61,08

La cuantificación se llevó a cabo por comparación del área de cada compuesto, relativa al patrón interno, con la obtenida en la recta de calibrado correspondiente a cada sustancia patrón, en las mismas condiciones que la muestra problema.

3.3.7. Escalado en bodega durante la vendimia 2007

Obtenidos los resultados de los anteriores apartados, se procedió a diseñar la experiencia en bodega que permitiría abordar el experimento realizado en depósitos de 30L en 2006, esta vez a escala real, en depósitos de 30.000 L. Se acordó preparar inóculo para un depósito de 30.000L, que junto con otro depósito control no inoculado, serviría para obtener vinos de Albariño comparables. Por las características de la vendimia, se eligió una parcela con fruto nada o escasamente dañado. Durante la elaboración del vino se llevó a cabo el seguimiento en bodega, por el personal de la bodega, y tras la finalización de la vinificación la bodega llevó a cabo la cata de los vinos obtenidos, para ver si la calidad del inoculado era superior a la del

control. En paralelo, y siguiendo la metodología expuesta en el apartado 1.1., se comprobó la imposición de la cepa inoculada, haciendo un seguimiento durante el transcurso de la preparación del pié de cuba y hasta la fermentación tumultuosa. Así mismo se diseñaron otras experiencias con mostos de distintas procedencias, para aprovechar el posible inóculo sobrante y permitir a la bodega la cata de vinos Albariño elaborados con la levadura seleccionada a partir de uva Albariño de calidad variada.

Si la cepa seleccionada produjese el vino de calidad idónea, con el “sello Bodega”, se daría por terminado con éxito el proyecto.

3.4. Patentes o equivalentes. Transferencia y divulgación de la experiencia y los resultados

Siempre de forma conjunta, las tres partes implicadas realizaron diferentes actuaciones para dar a conocer tanto los resultados científicos del trabajo, como los beneficios que suponían estos para el sector vitivinícola en general, para la bodega participante y para los dos grupos de investigación concretos en particular. También se ofreció la experiencia como ejemplo de éxito en una relación Investigación+Empresa, con objeto de resaltar cómo una investigación financiada por la Xunta de Galicia, por la empresa y por el CSIC, podía repercutir en beneficio de la sociedad tras la interacción del sector público y privado en I+D.

3.4.1. Patentes o equivalentes

Estas solicitudes son aplicables al material vegetal seleccionado (clones) y a las levaduras ecotípicas seleccionadas.

3.4.2. Divulgación de la experiencia y de los resultados

A través de la redacción de artículos para su publicación en revistas científicas de impacto; redacción de artículos de divulgación para su publicación en revistas técnicas o de divulgación, especializadas en el tema vitivinícola, así como convocatorias de ruedas de prensa (nacionales e internacionales), para dar a conocer los resultados de las diferentes partes del proyecto, a través de la prensa escrita, radio y televisión así como el envío de notas de prensa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización Ampelográfica

Los resultados ampelográficos mostraron que todos los clones tenían las características típicas de la variedad Albariño, tanto a nivel de brote como de hoja joven y hoja adulta. La mayoría de los clones presentaron racimos cónicos, con un ala y de compacidad media (Figura 6), mientras que el resto presentaron racimos cónicos, compactos y de pequeño tamaño (Figura 7).



Fig. 6. Racimo cónico con ala



Fig. 7. Racimo cónico



Fig. 8. Bayas típicas

Las bayas (Figura 8) fueron esféricas, uniformes, de color verde amarillento, pulpa jugosa y blanda, sin ningún sabor particular; no coloreada; sección transversal de la baya circular; pruina media; ombligo poco aparente; separación del pedicelo media y presencia de anillo.

4.2. Análisis molecular

Los resultados de la caracterización molecular han mostrado que los clones de Albariño estudiados, presentaban idéntico perfil para los seis pares de microsatélites analizados y que fue el siguiente (resultados expresados en pares de bases): VVS2: 132/150; VVMD5: 218/228; V V M D 7 : 2 3 7 / 2 3 7 ; VVMD27: 185/185; VrZAG62: 185/203; VrZAG79: 245/249

4.3. Análisis del estado sanitario

Los resultados del test ELISA para los virus del Entrenudo corto, Enrollado y Mosaico, fueron negativos para 33 de los clones seleccionados.

4.4. Estados Fenológicos

4.4.1. Año 2003

En cuanto a los estados fenológicos (yema hinchada, yema semiabierta, hojas separadas, racimos visibles, racimos separados, botones florales separados), todos los clones se comportaron de igual forma hasta llegar a la floración. A partir de este momento se observan diferencias entre los clones, distinguiéndose en la floración tres fases. Los clones G y Ñ se caracterizaron por ser los más tardíos. Se diferenció otro grupo que estaban con el inicio de la floración, y un tercer grupo que ya estaban en plena floración. Los clones B, D, G, H, L, M, y R presentaron la maduración más temprana, y los clones Ñ y P la maduración más tardía. El clon A, sin embargo, aunque fue uno de los primeros en llegar a la floración y al estado 35 (envero), fue uno de los que más tardó en alcanzar la madurez. Los clones G y V, aunque fueron los más atrasados hasta llegar al envero, sorprendentemente, fueron los primeros en madurar.

4.4.2. Año 2004

En cuanto a los estados fenológicos, la época de brotación y floración fue la misma para todos los clones. Sin embargo, la brotación se produjo una semana antes que en el año 2003 (mediados de abril). En floración se diferenciaron tres grupos, por un lado el clon G, que en ambos años fue uno de los que más tardó en llegar a la floración. Por otro lado un grupo de clones que en ese momento se encontraban con el inicio de la floración, y por último un tercero que en esa época estaba en plena floración (P, O y B). Por lo que se refiere a la maduración todos alcanzaron el aspecto maduro una semana antes, con respecto al año anterior y se observaron diferencias entre los clones. Los clones B, D, C y H tuvieron el mismo comportamiento que en el año 2003, siendo los primeros en madurar. Los clones de maduración más tardía en el año 2003 (G, W y R), lo fueron también en el 2004. Recordemos que en el caso concreto del clon G en el año 2003 fue uno de los más atrasados hasta llegar

al envero, y sorprendentemente, después fue uno de los primeros en madurar. Este año sin embargo, tuvo un comportamiento completamente diferente.

4.4.3. Año 2005

La época de brotación, floración y envero fue la misma para todos los clones. En el año 2005, como consecuencia de las condiciones climáticas, la brotación se produjo el 22 de marzo, mucho antes que en el año 2003 y 2004 (mediados y principios de abril). La floración se produjo a principios de junio y el envero la segunda semana de agosto, en ambos casos, en 2005, se adelantó también con respecto a los años anteriores. Por lo que se refiere a la maduración (estado 38) todos los clones alcanzaron el aspecto maduro más o menos a la vez, no encontrándose diferencias significativas entre los clones. La mayoría de ellos tardaron 162 días en alcanzar el estado 38 y 183 días en llegar a la maduración.

4.5. Estudio agronómico y análisis de los mostos

En las Tablas 4 y 5 se muestran los resultados de la comparación de medias (en cada uno de los años de estudio) para los parámetros (que fueron significativos) medidos en racimo y bayas.

Tabla 4. Resultado del Anova realizado para los parámetros medidos en racimo durante los tres años de estudio.

Clon	Año	Nº baya	Grado	Rendimiento	Acidez	pH
B	2003	162,500	13,213	22,708	9,319	2,973
	2004	175,000	13,275	21,360	11,643	3,155
	2005	215,000	13,700	31,405	8,405	3,120
C	2003	160,000	12,680	20,436	8,325	3,002
	2004	160,000	13,200	18,024	10,422	3,138
	2005	143,750	13,525	33,865	9,905	3,460
D	2003	133,333	10,933	19,057	9,425	2,890
	2004	183,333	12,967	19,833	11,723	3,117
	2005	200,000	13,367	26,597	10,237	3,540
E	2003	187,500	12,425	22,669	8,325	3,178
	2004	175,000	13,350	26,015	10,795	3,090
	2005	158,333	12,933	26,640	7,197	3,147
F	2003	137,500	12,400	20,388	8,681	2,973
	2004	175,000	13,225	16,508	11,098	3,198
	2005	168,750	13,175	25,890	8,285	3,188

H	2003	187,500	12,675	20,041	7,781	3,193
	2004	175,000	12,675	16,405	8,793	2,953
	2005	93,750	13,188	31,190	7,185	3,103
I	2003	133,333	13,133	20,256	7,875	3,087
	2004	133,333	12,600	21,550	9,450	3,070
	2005	125,000	13,425	29,305	9,410	3,400
J	2003	133,333	12,633	23,385	7,675	3,027
	2004	133,333	13,667	21,010	9,097	3,090
	2005	125,000	13,383	30,427	7,600	3,140
K	2003	190,000	12,230	18,752	12,375	2,870
	2004	210,000	13,320	14,948	11,668	3,080
	2005	180,000	13,500	22,044	10,680	3,076
L	2003	200,000	12,833	10,127	9,600	2,890
	2004	150,000	12,800	23,003	10,973	3,180
	2005	200,000	13,083	24,320	9,248	3,090
M	2003	162,500	12,725	20,543	9,600	2,950
	2004	116,667	12,200	15,520	8,173	3,243
	2005	166,667	13,617	26,230	9,723	3,350
N	2003	187,500	11,750	24,230	9,394	2,933
	2004	150,000	11,225	20,945	11,118	3,055
	2005	106,250	13,125	24,788	9,408	3,108
Ñ	2003	140,000	12,110	17,632	10,875	2,860
	2004	150,000	11,840	16,092	10,676	3,030
	2005	115,000	13,520	28,652	9,448	3,114
O	2003	137,500	13,375	13,935	7,125	3,230
	2004	225,000	13,525	19,473	8,605	3,025
	2005	106,250	13,888	29,785	8,606	2,985
Q	2003	180,000	13,780	22,700	10,560	2,980
	2004	170,000	13,220	22,204	9,628	3,164
	2005	175,000	13,438	22,375	10,199	3,064
R	2003	137,500	12,525	20,443	7,819	2,908
	2004	175,000	12,600	16,483	11,660	3,068
	2005	158,333	13,450	33,337	9,300	2,923
S	2003	200,000	12,300	24,330	8,494	2,953
	2004	146,250	13,800	17,320	10,275	3,065
	2005	141,667	12,000	24,233	9,273	2,947
T	2003	175,000	12,675	20,301	11,119	2,883
	2004	177,500	12,525	19,695	9,805	3,160
	2005	150,000	13,300	17,167	12,000	2,957
U	2003	150,000	12,080	23,583	8,790	2,934
	2004	117,000	11,980	18,274	9,508	3,012
	2005	100,000	13,740	28,340	9,464	2,958
V	2003	150,000	12,850	19,727	9,694	2,833
	2004	162,500	13,475	18,678	8,490	3,183
	2005	128,125	13,387	22,043	9,088	3,025
W	2003	183,333	13,300	19,462	9,025	2,893
	2004	161,667	12,933	21,710	9,847	3,033
	2005	133,333	13,733	25,333	7,750	3,060
X	2003	162,500	12,275	18,584	9,225	2,978
	2004	121,000	13,720	21,902	10,332	3,022
	2005	115,000	13,360	23,710	9,088	3,136

Tabla 5. Resultado del Anova realizado para los parámetros medidos en baya y semillas, durante los tres años de estudio. ¹Lompedi: longitud del pedicelo; Lonbaya: longitud de la baya; Anbaya: anchura de la baya; Pebaya: peso de la baya; Nusemi: nº de semillas; Pesemi: peso de las semillas; Lonsemi: longitud de la semilla; Ansemi: anchura de la semilla.

Clon	Año	Lompedi ¹	Lonbaya	Anbaya	Pebaya	Nusemi	Pesemi	Lonsemi	Ansemi
B	2003	0,646	1,207	1,223	1,225	2,000	0,030	0,594	0,350
	2004	0,802	1,231	1,242	1,332	2,400	0,033	0,561	0,309
	2005	0,592	1,346	1,326	1,547	2,340	0,026	0,576	0,314
C	2003	0,624	1,192	1,174	1,129	2,000	0,025	0,544	0,336
	2004	0,748	1,239	1,280	1,435	2,740	0,041	0,569	0,290
	2005	0,555	1,324	1,296	1,432	1,940	0,026	0,592	0,315
D	2003	0,727	1,253	1,229	1,214	1,825	0,072	0,607	0,354
	2004	0,918	1,192	1,226	1,298	2,500	0,027	0,585	0,322
	2005	0,529	1,257	1,256	1,327	2,220	0,025	0,592	0,306
E	2003	0,571	1,089	1,100	0,927	1,700	0,023	0,544	0,338
	2004	0,875	1,187	1,214	1,301	2,820	0,026	0,589	0,273
	2005	0,578	1,302	1,247	1,290	2,360	0,025	0,592	0,318
F	2003	0,561	1,215	1,227	1,169	2,100	0,025	0,573	0,339
	2004	0,773	1,191	1,206	1,292	2,280	0,026	0,572	0,311
	2005	0,610	1,345	1,317	1,522	2,320	0,025	0,589	0,314
H	2003	0,671	1,180	1,159	1,253	1,980	0,024	0,566	0,323
	2004	0,784	1,291	1,309	1,465	2,560	0,022	0,524	0,271
	2005	0,506	1,130	1,141	1,549	2,460	0,022	0,544	0,310
I	2003	0,599	1,225	1,220	1,195	2,140	0,024	0,579	0,337
	2004	0,855	1,250	1,245	1,365	2,540	0,027	0,628	0,351
	2005	0,624	1,270	1,270	1,394	2,120	0,025	0,568	0,305
J	2003	0,816	1,227	1,206	1,197	2,200	0,024	0,581	0,334
	2004	0,811	1,251	1,244	1,441	2,820	0,025	0,615	0,315
	2005	0,609	1,323	1,328	1,470	2,460	0,025	0,572	0,316
K	2003	0,685	1,206	1,209	1,136	1,480	0,030	0,589	0,363
	2004	0,858	1,102	1,125	1,054	1,498	0,028	0,549	0,304
	2005	0,584	1,248	1,223	1,254	1,780	0,027	0,590	0,327
L	2003	0,728	1,227	1,231	1,295	2,167	0,027	0,600	0,346
	2004	0,798	1,193	1,235	1,315	1,977	0,027	0,538	0,276
	2005	0,558	1,253	1,285	1,450	2,000	0,025	0,594	0,324
M	2003	0,678	1,165	1,177	1,000	1,660	0,025	0,569	0,329
	2004	0,792	1,223	1,256	1,235	2,056	0,026	0,574	0,314
	2005	0,577	1,276	1,241	1,349	2,060	0,026	0,596	0,319
N	2003	0,687	1,227	1,218	1,166	1,966	0,025	0,588	0,338
	2004	0,761	1,295	1,286	1,451	2,660	0,024	0,575	0,318
	2005	0,579	1,357	1,314	1,500	2,460	0,024	0,597	0,314
Ñ	2003	0,628	1,261	1,254	1,227	1,780	0,031	0,578	0,361
	2004	0,817	1,344	1,371	1,632	2,760	0,029	0,613	0,344
	2005	0,550	1,296	1,294	1,410	1,900	0,030	0,577	0,345
O	2003	0,636	1,204	1,208	1,102	1,960	0,024	0,569	0,338
	2004	0,779	1,143	1,174	1,188	2,400	0,024	0,529	0,278
	2005	0,644	1,251	1,248	1,349	2,160	0,024	0,574	0,310

Q	2003	0,728	1,123	1,148	1,089	1,900	0,028	0,599	0,348
	2004	0,917	1,135	1,193	1,160	2,425	0,028	0,616	0,318
	2005	0,663	1,293	1,285	1,447	2,420	0,026	0,590	0,325
R	2003	0,705	1,159	1,161	1,100	1,717	0,025	0,558	0,339
	2004	0,842	1,243	1,256	1,421	2,820	0,025	0,610	0,327
	2005	0,582	1,329	1,290	1,531	2,100	0,027	0,615	0,314
S	2003	0,676	1,108	1,166	0,952	1,780	0,023	0,533	0,333
	2004	0,854	1,252	1,271	1,518	2,540	0,028	0,563	0,287
	2005	0,579	1,276	1,292	1,407	2,240	0,021	0,553	0,299
T	2003	0,763	1,214	1,147	1,096	1,660	0,028	0,597	0,352
	2004	0,917	1,186	1,190	1,263	2,282	0,025	0,564	0,304
	2005	0,548	1,356	1,328	1,553	2,120	0,028	0,619	0,331
U	2003	0,614	1,214	1,198	1,037	1,580	0,030	0,554	0,333
	2004	0,768	1,217	1,213	1,337	2,140	0,037	0,537	0,296
	2005	0,562	1,335	1,312	1,560	2,280	0,025	0,570	0,314
V	2003	0,642	1,156	1,151	0,964	1,340	0,035	0,579	0,368
	2004	0,740	1,141	1,153	1,002	1,287	0,035	0,571	0,338
	2005	0,498	1,251	1,228	1,275	1,460	0,027	0,566	0,332
W	2005	0,580	1,329	1,319	1,525	2,380	0,026	0,605	0,314
X	2003	0,693	1,264	1,267	1,161	2,160	0,027	0,591	0,346
	2004	0,828	1,236	1,272	1,384	2,580	0,023	0,550	0,294
	2005	0,603	1,345	1,330	1,516	2,420	0,025	0,571	0,316

4.5.1. Año 2003

Por lo que se refiere al resto de los parámetros medidos en racimo, se encontró diferencia significativa entre todos los clones, en 6 de los 14 parámetros evaluados. El número de racimos por pámpano osciló entre 2,5 y 2, destacando los clones P y X con un valor medio de 2,5 racimos por pámpano. En este caso se observó, como era de esperar, una correlación entre el nº de racimos por pámpano y los Kg de uva por cepa (mayor número de racimos, mayor peso). El nº de bayas por racimo, osciló de unos clones a otros entre 200 y 100. Los clones con mayor número de bayas por racimo fueron el A y el S. El menor número de bayas por racimo lo presentaron los clones J, I y D. En el control de maduración realizado una semana antes de la vendimia se observó que los clones D, Q y R presentaban el mayor grado alcohólico probable, con un valor medio de 13,5 °Baumé, estos fueron los que llegaron primero a la maduración. Los clones N y Ñ presentaban el grado alcohólico probable más bajo, con valores medios de 12,3 °Baumé, y fueron los que más tardaron en alcanzar la maduración. En los análisis realizados en mosto, una vez realizada la vendimia, los clones A, Q y O presentaron el grado alcohólico

probable más elevado, con un valor medio de 13 °Baumé. Los clones D, N, Ñ y P presentaron el °Baumé más bajo (10 °Baumé).

Sorprende el comportamiento del clon D, que en el control de maduración era el que presentaba mayor grado, y en el análisis de mosto después de la vendimia presentaba el menor grado. No encontramos explicación lógica, será necesario observar su comportamiento, los próximos años, con especial atención. Como era de esperar, se observó una correlación negativa entre grado alcohólico probable y acidez total. Con respecto a la variable rendimiento, el clon A presentó el mayor rendimiento (25%). Los clones L, P, O y D el rendimiento más bajo (10%). Estos valores de rendimiento son bastantes bajos, pero no hay que olvidar que se trata de mosto yema (estrujado leve). Los valores de pH más elevados (pH 3.23) los presentaron los clones O, H y E, mientras que los más bajos (pH 2.78) los clones P, V y Ñ.

Hay una serie de parámetros (fertilidad, peso de madera de poda, peso de todos los racimos de la cepa, o nº de racimos totales), que aunque no presentaron diferencia significativa, hay que tenerlos en cuenta, porque nos ayudan a comprender la diferencia significativa que apareció en otros parámetros.

Los resultados obtenidos reflejan, al igual que en los resultados del año 2002, una correlación positiva entre tamaño de racimo (largo y ancho), peso de racimo representativo, Kg de uva por cepa, rendimiento, nº de bayas y grado alcohólico probable. Por ejemplo los clones P y D, presentaron el menor peso de racimo, menor tamaño de racimo representativo, menor nº bayas, menor grado alcohólico probable, menor rendimiento y menor pH. En el caso contrario, los clones A y Q presentaron los valores medios más elevados de todos estos parámetros

El análisis de varianza realizado en bayas demostró que había diferencia significativa para todos los parámetros, excepto para “largo y ancho de baya”. Los clones P y V presentaron las bayas más pequeñas y el menor nº de semillas, mientras que los clones L y M presentaron las bayas de mayor tamaño y el mayor nº de semillas. El clon J además presentó la mayor longitud de pedicelo

Como conclusión, desde el punto de vista agronómico destacaron los clones Ñ y P, que fueron los que más tardaron en alcanzar la maduración, y

presentaron un elevado nº de racimos por pámpano, elevada producción (Kg de uva por clon), elevada fertilidad, alto nº de racimos por clon, alta cantidad de madera de poda, grado alcohólico probable bajo, rendimiento bajo, pH bajo, y una acidez relativamente alta, bayas de pequeño tamaño y un bajo nº de semillas.

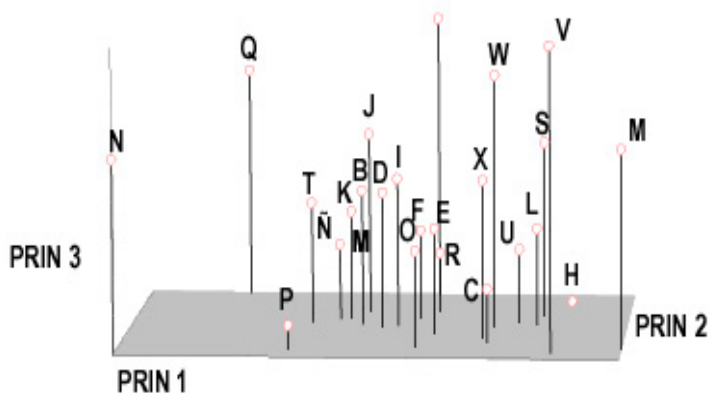


Fig. 9. Resultado Análisis en Componentes Principales para el año 2003

En la Figura 9, se observa como los clones V, M y S se sitúan a la derecha de la figura, por presentar en general la mayor cantidad de kg de uva por cepa, el mayor número de racimos totales, la mayor fertilidad, los racimos de menor peso, y la acidez total más baja. En el extremo izquierdo, con la menor cantidad de kg de uva por cepa, el menor número de racimos totales, la menor fertilidad, el mayor peso de racimo representativo y la mayor acidez total se situaron los clones N y Q. En el extremo superior se situaron de una forma destacada los clones G, Q y W que se caracterizaron por presentar el mayor nº de racimos por pámpano, la mayor longitud de pedúnculo, el mayor rendimiento, la menor anchura de baya, el menor número de bayas y por ser además los que más tardaron en llegar a la maduración. Por último, en la parte inferior se situaron los clones P, C y H por poseer el menor nº de racimos por pámpano, la menor longitud de pedúnculo, el menor rendimiento, la mayor anchura de baya, el mayor número de bayas y por ser los que menos tardaron en llegar a la maduración.

4.5.2. Año 2004

En el análisis de varianza realizado para todos los parámetros de racimo y mosto del año 2004, se observó que todos los clones se comportaron de diferente forma para la mayoría de los parámetros medidos excepto, para los parámetros “peso de todos los racimos de la cepa”, “peso y tamaño de racimo” y “fertilidad” en los que no hubo diferencias entre los clones. Los clones tuvieron un comportamiento idéntico en los años 2003 y 2004 para todos los parámetros medidos, excepto para “el número de racimos totales”, “índice de fertilidad”, “peso y largo de racimo”, “número de bayas” y “rendimiento”. En el año 2004, se observó un mayor valor medio para la mayoría de estos últimos parámetros que acabamos de citar. El número de racimos por pámpano osciló entre 2 y 3, destacando los clones X, G y S con un valor medio de 2,5 racimos por pámpano, estos dos últimos tuvieron un comportamiento idéntico al del año 2003.

El nº de bayas por racimo, osciló de unos clones a otros entre 250 y 100. Los clones con mayor número de bayas por racimo fueron O, K y P. El menor número de bayas por racimo lo presentaron los clones M, U, X, J y I. En ambos años los clones J y I presentaron el menor número de bayas por racimo mientras que el clon K presentó el mayor número.

En cuanto al grado alcohólico probable, fue mayor que en el año anterior para todos los clones. Los clones G, S, X, J y O presentaron el grado alcohólico probable más elevado, con un valor medio de 14 ° Baumé. Los clones M, Ñ y U presentaron el °Baumé más bajo (11,5 °Baumé).

Con respecto al clon D, cuya oscilación en el grado alcohólico probable comentamos sorprendidos al analizar los datos del año 2003, cabe decir que probablemente fuese un error nuestro en la toma de muestras, ya que este año tuvo un comportamiento normal y no destacaba con respecto al resto de los clones.

Los clones D, K y R presentaron el ácido málico, tartárico y acidez total más elevada (11,72). El clon K también presentó en el 2003 los valores de acidez total más elevados. Los clones con la acidez más baja (8,17) fueron el M, V, O y H. Estos dos últimos tuvieron un comportamiento idéntico al del año 2003. En el caso del clon H, presentó unos valores de ácido málico y tartárico muy bajos (4,4-4,5 respectivamente). Como era de esperar, se observó

en la mayoría de los clones una correlación negativa entre grado alcohólico probable y acidez total.

Con respecto a la variable rendimiento, los clones E y L presentaron el mayor rendimiento en mosto yema según el método O.I.V. para descripción de variedades (26%). Los clones K, M y Ñ en cambio, presentaron el rendimiento más bajo (15%). Hay que resaltar el clon L por presentar este año el mayor rendimiento mientras que el año anterior presentó uno de los más bajos.

Los clones que presentaron un mayor número de racimos fueron, al igual que en el año 2003, los clones V, M y O (con un valor medio de 80 racimos por cepa) mientras que los clones Q, K y T presentaron el menor número de racimos (valor medio de 34 racimos por cepa). El resto de parámetros que consideramos de gran importancia agronómica como fertilidad, peso y tamaño de racimo, peso de madera de poda y Kg de uva por cepa, igual que en el año 2003, no presentaron diferencias significativas entre los clones. Esto puede ser debido no a que no haya una diferencia real entre los clones objeto de estudio, sino a que el número de cepas por clon es tan pequeño (3 o 5 cepas), que desde el punto de vista estadístico no es suficiente para diluir el efecto de la variabilidad entre cepas. Esto se podría resolver en un futuro aumentando a 10 o 20 el número de cepas por clon.

Aunque como ya hemos dicho anteriormente no hay diferencias significativas entre los clones podríamos destacar el comportamiento de algunos de ellos, ya que estos comentarios podrían ser útiles para plantear futuros estudios en esta línea. Los clones U, X, E y M, presentaron en ambos años el menor peso de racimo, menor tamaño de racimo representativo, menor nº bayas y menor longitud del pedúnculo. Los clones más productivos (kg de uva por cepa), fueron en ambos años los clones M, H y S. Por el contrario, los clones menos productivos fueron el Ñ y el Q.

Los clones más vigorosos, es decir, que presentaron un mayor peso de madera de poda en ambos años fueron el K y L, mientras que los menos vigorosos fueron los clones W, H y E. El mayor índice de fertilidad lo presentaron ambos años los clones P, E, V y U mientras que el menor índice fue para los clones Q, T, B y Ñ. Por último, para confirmar lo observado en el análisis de varianza, se realizó con todos los parámetros de racimo un Análisis en Componentes Principales (ACP), que nos da una visión global y muy fácil de interpretar, sobre lo que acabamos de decir (Figura 10).

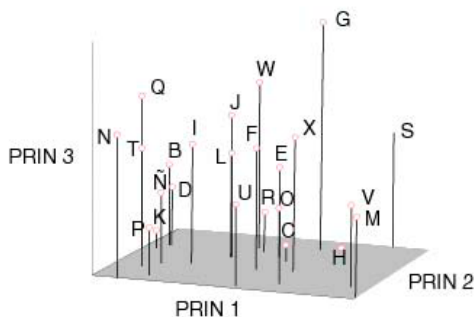


Fig. 10. Análisis en Componentes Principales para el año 2004

En la Figura 10, se aprecia perfectamente como en la parte derecha se situaron los clones V, M y S por presentar en general la mayor cantidad de kg de uva por cepa, el mayor número de racimos totales, la mayor fertilidad, los racimos de menor peso, y la acidez total más baja. En el extremo izquierdo, con la menor cantidad de kg de uva por cepa, el menor número de racimos totales, la menor fertilidad, el mayor peso de racimo representativo y la mayor acidez total se situaron los clones N, T, P, Ñ, B, D, K y Q. En la parte posterior de la figura, se situó el clon S por presentar la mayor longitud de racimo, mayor grado alcohólico probable y mayor sensibilidad a Mildiu y Botrytis. En la parte anterior, se situaron en cambio los clones M, Ñ y U caracterizados por presentar la menor longitud de racimo representativo y por ser más resistentes a Mildiu y Botrytis en racimo. En el extremo superior se situaron de una forma destacada los clones G, Q y W que se caracterizaron por presentar el mayor nº de racimos por pámpano, la mayor longitud de pedúnculo, el mayor rendimiento, la menor anchura de baya, el menor número de bayas y por ser además los que más tardaron en llegar a la maduración. Por último, en la parte inferior se situaron los clones K, C y H por poseer el menor nº de racimos por pámpano, la menor longitud de pedúnculo, el menor rendimiento, la mayor anchura de baya, el mayor número de bayas y por ser los que menos tardaron en llegar a la maduración.

4.5.3. Año 2005

En el análisis de varianza realizado para todos los parámetros de racimo y mosto del año 2004, se observó que todos los clones se comportaron de diferente manera para la mayoría de los parámetros medidos excepto, para los

parámetros “nº racimos por pámpano”, “nº de bayas por racimo”, “ tamaño de racimo”, “nº de yemas”, “grado alcohólico probable”, “nº racimos totales” y “peso de todos los racimos de la cepa”, en los que no hubo diferencias entre los clones. Los clones tuvieron un comportamiento muy similar en los tres años de estudio para todos los parámetros medidos. Sin embargo, durante esta última campaña (2005), se observó que la mayoría de los parámetros analizados presentaban un mayor valor medio, excepto para el “peso de racimo representativo”. Es decir, este año hubo una mayor producción, pero los racimos eran de menor peso y tenían en líneas generales un mayor grado alcohólico, menor acidez y mayor rendimiento.

Para el parámetro “grado alcohólico probable” este año fue mayor en todos los clones, excepto para los clones E, J, S y X para los que alcanzó un valor más elevado en 2004. Aunque como ya hemos dicho anteriormente no hubo diferencia significativa entre los clones para algunos de los parámetros evaluados, podríamos destacar el comportamiento de algunos de ellos, ya que estos comentarios podrían ser útiles para plantear futuros estudios en esta línea.

Durante el 2005, al igual que en los años anteriores el número de racimos por pámpano osciló entre 2 y 3, destacando este año los clones H, L, T y O con un valor medio de 2,5 racimos por pámpano, y el clon D por presentar el valor medio más bajo. El número de bayas por racimo, osciló de unos clones a otros entre 250 y 100. Los clones con mayor número de bayas por racimo fueron B, L, D y K. El menor número de bayas por racimo lo presentaron los clones O, N, y U. Durante todos los años los clones K y U presentaron el mayor y menor número de bayas por racimo respectivamente. En cuanto al tamaño del racimo (longitud y anchura) durante los tres años los clones de mayor tamaño fueron S y W, mientras que los de menor tamaño fueron H, U y X.

En cuanto al grado alcohólico probable, en 2005 fue mayor que en los años anteriores para todos los clones, oscilando entre 14 y 12 grados Baumé. Los clones O y V presentaron el grado alcohólico probable más elevado, con un valor medio de 14 grados Baumé, confirmándose para estos dos clones los resultados obtenidos en años anteriores. Los clones L, E y S presentaron el grado Baumé más bajo (12 grados Baumé). Los clones que presentaron un mayor número de racimos fueron, al igual que en los años anteriores, los clones O, R, C, V y M (con un valor medio de 104 racimos por cepa) mientras que los clones K y D presentaron el menor número de racimos (valor medio

de 42 racimos por cepa). En el caso del clon K se confirmó lo obtenido en años anteriores. Entre los clones con un mayor número de kg de uva por cepa destacó el clon R (15 kg/cepa), mientras que los clones con un menor número de kg de uva por cepa destacaron D, Ñ, U, V, Q y X. Aunque como ya hemos dicho anteriormente en esta campaña (2005) los valores fueron en general más elevados, para la mayoría de los parámetros, en el caso de algunos clones como el V, S, M, H y D este año fueron menos productivos que en el año 2004. Sin embargo, los más productivos y los menos productivos se mantuvieron, así por ejemplo los clones Ñ y Q fueron, durante los tres años de estudio, los menos productivos.

En cuanto a los parámetros que sí presentaron diferencias significativas entre los clones destacaríamos lo siguiente:

Los clones U, X, H, Ñ y O, presentaron durante todos los años el menor peso de racimo, menor tamaño de racimo representativo, menor número de bayas y menor longitud del pedúnculo. En el caso de la “acidez total” decir en primer lugar que los valores fueron más bajos, en relación con el resto de los años de estudio. Esto podría ser debido a dos causas, por un lado a las particulares condiciones climatológicas de este año, y por otro lado a que la poda se hizo casi un mes antes que en los dos años anteriores. Los clones D, K y T presentaron la acidez total más elevada (12-10,5). Los clones K y D también presentaron en los dos años anteriores los valores de acidez total más elevados. Los clones con la acidez más baja (7) fueron el H, E, J, V y O. Estos dos últimos, junto con el clon H, tuvieron un comportamiento idéntico al de los dos años anteriores. Como era de esperar, una vez más se confirmó la correlación negativa entre grado alcohólico probable y acidez total. El mayor pH lo presentaron los clones C y D mientras que el más bajo fue el del clon R.

Con respecto al rendimiento en mosto yema (método OIV, 1983), decir que los valores obtenidos en 2005 fueron mayores que los obtenidos en los dos años anteriores. Los clones C y R presentaron el mayor rendimiento en mosto yema (33%). Cabe destacar el comportamiento particular del clon L que en el 2004 había presentado el mayor rendimiento, en el 2003 uno de los más bajos, y este año de nuevo volvió a presentar el rendimiento más bajo. Los clones T y K, presentaron el rendimiento más bajo (17%). Es importante resaltar que el clon K presentó todos los años el menor rendimiento. El mayor índice de fertilidad lo presentaron ambos años los clones C, E y L mientras

que el menor índice fue para el clon D. Durante todos los años de estudio el clon E presentó el mayor índice de fertilidad.

Se observaron diferencias significativas al 99% entre los clones para el parámetro “madera de poda” realizada en el año 2004. Los clones más vigorosos, es decir, que presentaron un mayor peso de madera de poda fueron B, K, F, L y Q. Por el contrario los menos vigorosos fueron los clones H, I, U, W y X. Estos valores coinciden con los observados en el año 2003. La poda del tercer año no se realizará hasta el mes de febrero, por lo que no se pueden aportar datos. Este año, al igual que el año anterior, se ha observado que alguno de los clones presentaba racimos con el raspón seco, y las bayas parcialmente deshidratadas, lo cual se atribuyó a una carencia de magnesio. En este aspecto destacaron los clones K (22%), D y T (11%), O (9%), R y F (2%) y N (0,07%) como los más afectados, mientras que el resto de los clones este año no se vieron afectados. Al comparar estos resultados con los del año anterior se observa que los clones K y R ambos años fueron los más afectados por éste síntoma. Destacar también el comportamiento del clon O que mientras en el 2004 estaba entre los menos afectados, en 2005 tuvo el comportamiento contrario. Para poder visualizar de una forma más clara el comportamiento de estos clones frente a éste parámetro, sería muy interesante continuar durante unos cuantos años más este estudio.

En el análisis de varianza realizado para bayas se observaron diferencias significativas al 99,99% para los siguientes parámetros evaluados: “longitud de pedicelo”, “longitud de baya”, “ancho de baya”, “peso de baya” y “nº de semillas”. Los valores medios de estos parámetros se muestran en la Tabla 5.

Durante la campaña 2005 los clones V, H, D y K presentaron la menor longitud de pedicelo, menor tamaño de baya y menor peso de estas. Durante los años anteriores los clones V y K también presentaron los valores más bajos para estos parámetros, y los clones H y D presentaron en el 2004 los valores más elevados. Los clones B, N y T presentaron los tres años los valores más elevados para los citados parámetros.

Por lo que se refiere al parámetro “nº de semillas por baya” el mayor número de semillas por baya todos los años fue para los clones H, J, E, R y N. Los clones K y V, por el contrario, presentaron siempre el menor número de semillas por baya. No existe una relación proporcional en cuanto al tamaño de baya y número de semillas. Así, en el caso del clon H presentaba

bayas pequeñas con muchas semillas en su interior, mientras que el clon N presentaba también muchas semillas en su interior, pero en este caso las bayas eran grandes.

Como conclusión para los datos de bayas cabe decir que los clones V y K presentaron los valores más bajos para todos los parámetros medidos en baya durante todos los años. En cuanto a los parámetros de semilla, todavía falta por tomar los datos de peso y tamaño de semilla del año 2005, ya que deben pasar por un período previo de secado, que todavía no ha finalizado. En el Análisis en Componentes Principales para los parámetros de racimo y características del mosto (ACP), para el año 2005, las tres primeras componentes mostraron el 60% de la variabilidad total expresada. Los parámetros de mayor peso en la primera componente principal fueron el tamaño y el peso de los racimos, en la segunda componente el grado alcohólico probable y la longitud del pedúnculo del racimo, y en la tercera componente el parámetro de mayor peso fue el peso de racimos por cepa. Los resultados de este análisis confirman lo observado en la comparación de medias. En la Figura 11, se muestran, de forma resumida, estos resultados. En la parte derecha de la gráfica se sitúan los clones de mayor peso y tamaño (clones B y D), mientras que a la izquierda se sitúan los de menor peso y tamaño (clon H). En la parte posterior de la gráfica se sitúan aquellos que tienen el grado alcohólico más elevado y una mayor longitud del pedúnculo (clon V), mientras que en la parte anterior se sitúan los de menor grado alcohólico probable (clones S y E). En la parte superior de la gráfica se sitúan los clones que presentan el mayor peso de racimos por cepa (R, L,..).

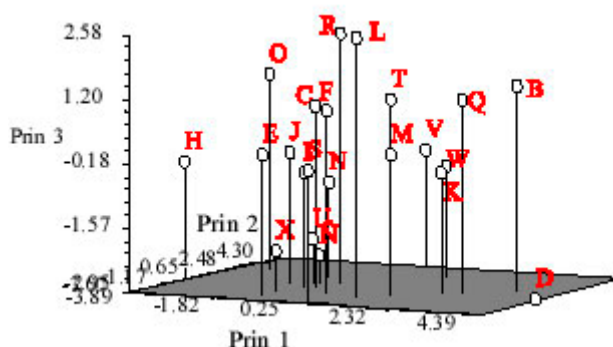


Fig. 11. Resultados del Análisis en componentes Principales (ACP) para los parámetros de racimo (vendimia 2005)

Aunque los resultados correspondientes a estas tres campañas, coinciden en muchos de los parámetros medidos, creemos que sería muy interesante poder continuar la recogida de datos durante al menos tres años más, para comprobar si las características que venimos observando en algunos clones se mantienen a lo largo del tiempo, lo que sin duda daría un alto grado de fiabilidad a los resultados.

4.6. Susceptibilidad a enfermedades

En la Tabla 6, se muestra el resultado de la comparación de medias para el parámetro Incidencia a Mildiu en hojas. Estudio realizado en los diferentes clones del cv. Albariño en las plantas en macetas y para cada uno de los tres años de estudio.

Tabla 6. Anova realizado para el parámetro Incidencia a Mildiu en hojas, durante los tres años de estudio en las plantas en macetas.

Clones	Incidencia Mildiu		
	2003	2004	2005
B	10,30	36,76	9,17
C	35,13	86,89	62,00
D	40,25	90,63	36,66
E	26,12	62,50	33,30
F	27,51	46,00	28,90
H	26,37	86,67	27,01
I	24,32	83,72	25,83
J	38,32	51,49	15,65
K	34,50	89,48	35,23
L	15,35	54,90	24,15
M	33,15	82,98	23,63
N	33,31	87,91	32,77
Ñ	22,12	75,00	21,23
O	22,90	77,55	20,77
Q	24	87,72	20,48
R	24,31	66,67	19,13
S	22,30	86,30	17,38
T	11,20	38,82	16,14
U	21,35	84,91	15,06
V	44,30	90,79	29,57
W	40,35	42,31	10,45
X	32,31	85,48	10,12
MDS (0,05)	4,93	8,50	5,83

4.6.1. Plantas en Maceta

Año 2003

En el primer muestreo, no hubo diferencia significativa entre los clones para los parámetros de Severidad e Intensidad a Mildiu. Sin embargo sí la hubo para Incidencia a Mildiu, donde destacan los clones A y J, por poseer el mayor nº de hojas afectadas por Mildiu, y los clones B y T por poseer el menor nº de hojas afectadas. Con respecto a severidad e intensidad a Mildiu, no hay una diferencia significativa entre los clones. Sin embargo destacan el clon B y el J. El primero por no presentar síntomas de Mildiu, y el segundo por poseer los valores medios más elevados. En el primer muestreo ninguno de los clones presentaron síntomas de Oídio ni de Botrytis.

En el segundo muestreo, los clones que presentaron un mayor porcentaje de incidencia a Mildiu fueron el Ñ, S, E, L y W. El porcentaje más bajo fue, al igual que en el primer muestreo, para el clon B. Mediante los parámetros de severidad e intensidad a Botrytis, se diferenciaron dos grupos de clones. Uno formado por 17 clones que no presentaron síntomas de dicha enfermedad, y otro formado por 7 clones que estaban afectados por Botrytis. Aunque, entre estos 7 no había diferencia significativa entre ellos, cabe destacar el clon J por poseer los valores medios más altos.

Para los coeficientes de Incidencia a Oídio y Botrytis destacaron los clones B y F. El clon B por presentar el menor porcentaje de incidencia a Oídio, y el clon F por presentar el menor porcentaje de incidencia a Mildiu sólo en el segundo muestreo, y de incidencia a Oídio y Botrytis.

Como conclusión de los análisis realizados en macetas este año, destacó el clon B por ser el más resistente a estas tres enfermedades (presentó los valores medios más bajos), y el clon J por ser el más sensible a estas tres enfermedades (valores medios más altos) (Tabla 6).

Año 2004

El año 2004 se caracterizó por presentar una primavera-verano muy calurosa, con ciertas precipitaciones esporádicas lo que hizo que la fecha de realización de los muestreos se adelantara dos o tres semanas y que el porcentaje de enfermedad fuese mayor con respecto al año 2003. A finales de mayo, ya existía un elevado porcentaje de hojas con síntomas de Mildiu,

y se realizó entonces el primer muestreo en las macetas. La evaluación de la enfermedad en hoja se realizó siguiendo la misma metodología que en el año anterior.

Para evaluar la enfermedad en racimo este año únicamente se utilizó el parámetro “Peso de la parte enferma / Peso del racimo total”. En el año 2003 se había utilizado también el parámetro “nº de racimos enfermos / nº de racimos totales”. Sin embargo, al hacer los análisis estadísticos nos dimos cuenta de que ambos parámetros estaban altamente correlacionados, es decir, que ambos nos daban la misma información. Por ello decidimos utilizar únicamente aquel que consideramos más exacto.

En cuanto a los resultados cabe señalar lo siguiente: Hubo diferencia significativa entre los clones tanto en el muestreo temprano como en el muestreo tardío, para los parámetros de Incidencia, Severidad e Intensidad a Mildiu. Para el parámetro Severidad también hubo diferencia significativa entre el muestreo temprano y el tardío, y para la interacción entre clon y muestreo. Esto significa, que algunos clones fueron más susceptibles a ataques tempranos y resistentes a los tardíos, otros más resistentes a los tempranos y más susceptibles a los tardíos, otros más sensibles a ambos, etc. Los clones más afectados fueron el G, V, K y D mientras que los más resistentes (en la época de muestreo no presentaban ningún síntoma) fueron los clones F, T, W, R, E, L, J y B. Los clones más resistentes lo fueron siempre independientemente de la época de muestreo (temprano o tardío). Dentro de los clones más susceptibles, destacan algunos por ser resistentes a ataques tempranos y muy susceptibles a ataques tardíos como el clon G. Por otro lado, y siguiendo dentro de los clones altamente sensibles, nos encontramos con el clon V, que fué susceptible a ataques tempranos y moderadamente resistente a los tardíos. Los clones J y W, que en el año 2003 fueron de los más sensibles, este año se comportaron como los más resistentes. Por el contrario los clones T y B ambos años presentaron muy pocas manchas o ningún síntoma de Mildiu, por lo que se pueden considerar como los más resistentes (Tabla 6).

El resto de los clones se comportaron de forma similar en ambos años. En el primer muestreo ninguno de los clones presentó síntomas de Oídio ni de Botrytis. En el caso de Oídio tampoco hubo síntomas en el segundo muestreo para ninguno de los clones. En el estudio de resistencia a Botrytis no hubo diferencia significativa (a nivel estadístico) entre los clones. Sin embargo, nos parece importante destacar que hubo 17 clones que tanto para el año anterior

como éste no presentaron síntomas, y 7 clones que en los dos años presentaron síntomas de Botrytis. Entre estos últimos habría que destacar el clon F que presentó los valores medios de incidencia a Botrytis más bajos.

Como conclusión de los análisis realizados en macetas, para cuantificación del nivel de resistencia a enfermedades destacaron los clones F, T y B por ser en ambos años los más resistentes a Mildiu, Oídio y Botrytis.

Año 2005

En el caso de enfermedades criptogámicas como Mildiu el proceso de infección y de contaminación en los clones y la velocidad de extensión del micelio del hongo en el interior de la planta depende del grado de susceptibilidad del huésped, del órgano infectado (más rápido en tejidos jóvenes, más lento en tejidos lignificados), pero también de la temperatura y de las precipitaciones. El año 2005 se caracterizó por presentar una primavera-verano muy calurosa, llegando alcanzar temperaturas superiores a 30 °C, lo que provocó una inhibición en la germinación de los esporangios. Esto, junto con las escasas precipitaciones recogidas, redujo la germinación de las oosporas y por lo tanto la aparición de esporangios y zoosporas que son los que se transportan (por el aire, agua) y provocan los diferentes ciclos de infección entre los clones. Como consecuencia de ello, la fecha de realización de los muestreos de este año se retrasó con respecto a los años anteriores y el porcentaje de enfermedad fue menor con respecto a los años anteriores.

La evaluación de la enfermedad en hoja y racimo se realizó siguiendo la misma metodología que en los años anteriores. En cuanto a los resultados obtenidos cabe señalar lo siguiente: Hubo diferencia significativa entre los clones tanto en el muestreo temprano como en el muestreo tardío, para los parámetros de Incidencia, Severidad e Intensidad a Mildiu. Para el parámetro Severidad también hubo diferencia significativa entre el muestreo temprano y el tardío, y para la interacción entre clon y muestreo. Esto significa que, al igual que en los años anteriores, algunos clones fueron más susceptibles a ataques tempranos y más resistentes a los tardíos. Otro grupo de clones fue, por el contrario, más resistente a los tempranos y más susceptible a los tardíos. También hubo un tercer grupo más sensible a ambos.

Durante el año 2005 el clon más afectado fue el R, mientras que los más resistentes (en la época de muestreo apenas presentaban ningún síntoma)

fueron los clones M, X, F, T, W, R, E, L, J y B. Los clones más resistentes lo fueron siempre, independientemente de la época de muestreo (temprano o tardío). Los clones V, K y D que se caracterizaron en los años anteriores por estar entre los más susceptibles, este año ocuparon una posición intermedia. Los clones J y W, que en el año 2003 fueron de los más sensibles, y en el 2004 los más resistentes, este año se comportaron también como los más resistentes. El resto de los clones se comportaron de forma similar en todos los años del estudio. En el caso del clon X en ambos muestreos presentó la menor severidad y la mayor intensidad, lo que significa que presentaba muchas manchas pero que estas eran de pequeño tamaño (Tabla 6). En el caso de las otras dos enfermedades evaluadas, Mildiu y Oídio, debido a las condiciones climatológicas de este año, poco propicias para el desarrollo estas enfermedades, ninguno de los clones se vio afectado.

Como conclusión se puede decir, después de estudiar durante tres años el nivel de resistencia a estas enfermedades en maceta, que destacaron los clones E, T, F, y B por ser los más resistentes a Mildiu.

4.6.2. Plantas en la parcela de selección

Año 2003

El porcentaje de incidencia en la parcela, para estas tres enfermedades, fue en general muy bajo. Este resultado era de esperar, teniendo en cuenta que estas plantas fueron tratadas. Sin embargo, a pesar de estos tratamientos, sí que pudimos sacar algunas conclusiones. En primer lugar que los tratamientos no fueron efectivos al 100%, particularmente en el caso del Mildiu, en el que se llegó a observar un 15% de incidencia. En el caso del Oídio la incidencia fue del 1%. El análisis de varianza realizado, demostró que había diferencia significativa para 4 de los 9 parámetros medidos (Incidencia a Oídio en hoja, Incidencia a Botrytis en racimo e Incidencia a Oídio en racimo de las dos formas, es decir, teniendo en cuenta el nº y el peso de los racimos).

Los clones F, B y A destacan, para nuestra sorpresa, por presentar la mayor incidencia de Oídio en hoja y racimo, mientras que en maceta fueron los más resistentes a Oídio. El resto de los clones de la parcela no se vieron afectados por Oídio. Los clones C, X, Q y H mostraron el mayor porcentaje de incidencia a Botrytis en racimo, mientras que los clones G, K, Q y Ñ el porcentaje de incidencia más bajo. Si comparamos los resultados obtenidos

en campo y maceta se puede concluir que el clon K mostró, tanto en maceta como en campo un bajo porcentaje de incidencia a Botrytis. El clon T, mostró además de un bajo porcentaje de incidencia a Botrytis, un bajo porcentaje de incidencia a Mildiu (Figura 12).

Año 2004

Como ya se ha explicado anteriormente aquí los muestreos se realizaron solamente en racimo. El porcentaje de incidencia en la parcela, para estas tres enfermedades, al igual que en el año anterior fue en general muy bajo. Este resultado era de esperar, teniendo en cuenta que estas plantas fueron tratadas. Sin embargo, a pesar de estos tratamientos, sí que pudimos sacar algunas conclusiones. En primer lugar que los tratamientos no fueron efectivos al 100%, particularmente en el caso del Mildiu, en el que se llegó a observar en racimo un 27% de incidencia, menor que en el 2003 que fue del 43%. En el caso de la Botrytis fue del 10%, y del Oídio la incidencia fue inferior al 1%.

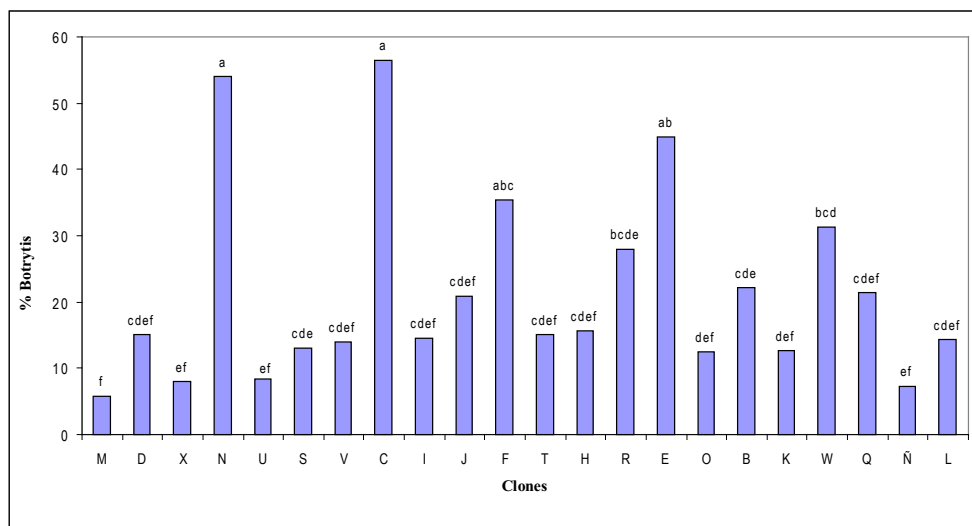


Fig. 12. Incidencia de Botrytis en los diferentes clones de Albariño en la parcela de selección durante los tres años de estudio.

El análisis de varianza realizado demostró que había diferencia significativa entre todos los clones con una probabilidad del 99% para la incidencia a Mildiu y del 95% para Incidencia a Botrytis. Los clones H, L,

S, W y C mostraron el mayor porcentaje de incidencia a Botrytis en racimo, mientras que los clones U, T, D, N, F, y J el porcentaje de incidencia más bajo. En el caso de los clones H y C ambos años fueron los más sensibles mientras que el clon T fue el más resistente. Si comparamos los resultados obtenidos en campo y maceta se puede concluir que en los dos casos el comportamiento de los clones F y T, fue idéntico y que ambos fueron los más resistentes a Botrytis y a Mildiu (Figura 12).

Año 2005

Como ya se ha explicado anteriormente aquí los muestreos se realizaron solamente en racimo. El porcentaje de incidencia en la parcela, para estas tres enfermedades, al igual que en maceta, fue en general muy bajo. Este resultado era de esperar, teniendo en cuenta que estas plantas fueron tratadas. Sin embargo, a pesar de estos tratamientos, se pudieron hacer algunas observaciones. En primer lugar que los tratamientos no fueron efectivos al 100%, particularmente en el caso del Mildiu, en el que se llegó a observar en racimo un 19% de incidencia, menor que en el 2003 y 2004 que fue del 43% y 23% respectivamente. En el caso de la Botrytis la incidencia fue del 5%, y menor del 5% para el Oídio, en ambos casos inferior a de las campañas anteriores.

El análisis de varianza realizado demostró que no había diferencia significativa entre los clones ni en la Incidencia a Mildiu ni a Oídio, pero si se observaron diferencias significativas, con una probabilidad del 99,9%, para la Incidencia a Botrytis. En el caso del Mildiu a pesar que no se diferenciaron significativamente los clones entre si, cabe destacar el comportamiento del clon M por presentar el mayor porcentaje de Mildiu en racimo. En cuanto a Oídio, aunque la diferencia entre los clones no fue significativa, al igual que en el caso anterior, es importante destacar que los únicos clones con síntomas de Oídio fueron F, K, D y L. Los clones C, N, E, W y H mostraron el mayor porcentaje de Incidencia a Botrytis en racimo, mientras que U, M, Ñ y X presentaban el porcentaje de Incidencia más bajo. Los clones C, H y W fueron durante los tres años los más sensibles: Entre los más resistentes, durante los tres años, destaca el clon U por estar siempre entre los menos afectados por Botrytis (Figura 12).

Si comparamos los resultados obtenidos en campo y maceta se puede concluir que el clon M fue el más afectado en racimo en el campo y en hoja ocupaba una posición intermedia. Los clones F, E y T, fueron los más resistentes en campo en racimo y en hoja.

4.7. Estudios en los vinos obtenidos de las microvinificaciones

4.7.1. Análisis químicos de los vinos

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los análisis químicos para cada uno de los tres años de estudio y para cada uno de los 22 vinos.

En el año 2004, los vinos de los clones B, C, F, N, Q y V, sufrieron problemas durante el proceso de fermentación, quedando un elevado nivel de azúcar residual, una acidez total elevada y grado alcohólico menor, acidez volátil elevada etc, tal y como se puede comprobar en la Tabla 7. En el año 2005 fue el vino del clon H el que presentó este tipo de problemas. La fermentación alcohólica fue similar para todos los vinos. Su densidad final oscilaba entre 0.995 y 0.992 y los valores de SO₂ libre también estaban dentro de lo normal. Diecinueve de los 22 clones presentaron el mayor grado alcohólico en el año 2005, uno (M) en 2004 y los dos restantes en 2003(R, V). El menor grado alcohólico lo presentaron 14 de los 22 clones en el año 2004 y 5 de ellos (E, H, J, M, W) en 2003. Los clones Ñ y O presentaron el mismo grado alcohólico en 2003 y 2004. Solo el clon U presentó el menor grado alcohólico en 2003, aunque este dato hay que tomarlo con reservas, ya que en el año 2004 no se pudo contar con vino de este clon. Los clones B y E estuvieron todos los años entre los de mayor grado alcohólico, a pesar de que en 2004 el vino del clon B tuvo problemas durante la fermentación, quedando una considerable cantidad de azúcar residual y no pudiendo entonces llegar a alcanzar el grado alcohólico que se esperaba. Por el contrario, el clon D estuvo siempre en el grupo de los de menor grado alcohólico. En cuanto a la Acidez total, 20 de los 22 clones, presentaron la acidez más baja en 2005 y los dos restantes (O y U) en 2003. La acidez más alta la presentaron 14 de los 22 clones en el año 2004, aunque en 6 de ellos (B, C, F, N, Q y V) pudo ser debido a los problemas ocurridos durante la fermentación. Seis de los clones estudiados (E, J, L, M, Ñ, W) presentaron la acidez total más alta en 2003.

Tabla 7. Medias y Desviaciones estándar de los diferentes parámetros químicos evaluados en los vinos

Clones	Año	Grado	Acidez	AzucarR	Avolatil	pH
B	2003	13,60	8,1	3,00	0,34	3,21
	2004	13,00	15,35	21,00	5,00	2,96
	2005	14,70	7,62	2,10	0,40	3,33
C	2003	13,00	8,90	3,00	0,31	3,19
	2004	12,10	14,20	21,00	5,00	3,03
	2005	14,40	6,79	4,90	0,43	3,36
D	2003	12,60	10,00	2,50	0,28	3,13
	2004	11,50	12,00	2,20	3,40	3,05
	2005	13,30	8,63	2,30	0,23	3,32
E	2003	13,20	11,55	2,60	0,20	3,09
	2004	13,90	8,55	2,50	1,70	3,18
	2005	14,30	7,27	2,80	0,42	3,29
F	2003	12,70	9,30	3,00	0,21	3,18
	2004	12,00	13,90	21,00	5,00	3,12
	2005	14,10	7,35	1,60	0,26	3,41
H	2003	12,80	10,80	2,50	0,25	3,07
	2004	13,00	11,85	4,00	0,69	3,13
	2005	13,20	9,99	15,00	3,22	3,25
I	2003	13,50	8,60	3,00	0,31	3,22
	2004	12,70	8,70	2,20	0,68	3,17
	2005	13,80	7,72	2,00	0,58	3,27
J	2003	13,30	8,70	3,60	0,39	3,18
	2004	13,60	8,60	2,30	0,54	3,13
	2005	13,80	6,72	3,40	0,26	3,27
K	2003	12,70	9,90	2,50	0,18	3,15
	2004	12,30	10,05	2,00	0,61	3,25
	2005	13,80	9,74	1,80	0,50	3,28
L	2003	13,00	9,00	3,40	0,55	3,21
	2004	12,10	8,70	2,50	0,61	3,41
	2005	14,30	7,20	4,90	0,47	3,42
M	2003	12,80	10,60	2,50	0,23	3,12
	2004	13,30	9,00	2,00	0,54	3,29
	2005	13,00	7,74	1,90	0,28	3,26
N	2003	12,70	9,30	4,00	0,30	3,21
	2004	11,20	14,35	21,00	3,60	3,00
	2005	13,70	7,99	1,70	0,49	3,36
Ñ	2003	12,50	9,90	3,00	0,22	3,16
	2004	12,50	9,37	2,00	0,90	3,25
	2005	13,50	7,95	3,50	0,44	3,28
O	2003	13,50	8,10	2,70	0,34	3,15
	2004	13,50	9,00	1,80	0,69	3,20
	2005	13,80	8,16	2,40	0,86	3,23
Q	2003	13,30	8,70	4,00	0,34	3,18
	2004	11,70	15,60	21,00	5,00	3,00
	2005	14,50	7,84	2,90	0,65	3,33
R	2003	13,90	8,85	3,50	0,46	3,14
	2004	12,70	12,60	3,00	3,13	3,27
	2005	13,70	8,58	2,00	0,16	3,27
S	2003	13,40	8,10	3,40	0,42	3,40
	2004	12,70	12,20	2,50	3,60	2,99
	2005	13,70	6,90	2,10	0,32	3,29
T	2003	13,30	10,00	2,50	0,27	3,14
	2004	12,50	11,60	3,50	0,98	2,97
	2005	13,30	8,41	1,90	0,31	3,23
U	2003	13,70	8,85	3,00	0,41	3,15
	2004
	2005	13,90	8,90	2,70	0,64	3,17
V	2003	13,50	9,50	3,50	0,18	3,17
	2004	11,60	12,85	21,00	5,00	2,89
	2005	13,40	7,71	1,70	1,31	3,30
W	2003	12,50	11,25	3,00	0,16	3,02
	2004	13,30	9,00	2,00	0,68	3,27
	2005	13,50	7,35	2,10	0,48	3,23
X	2003	13,50	9,00	2,40	0,41	3,25

El clon X presentó la misma acidez en 2003 que en 2004. Por lo que se refiere a la acidez volátil, como ya se ha dicho más arriba, seis de los clones estudiados presentaron en 2004 niveles elevados de acidez volátil debido a problemas durante la fermentación y uno (H) en 2005. Por otro lado, los clones D, R y S presentaron en el año 2004 niveles de acidez volátil superiores a 3, pero inferiores a 4. Por lo que se refiere al pH y sin tener en cuenta aquellos clones cuyos vinos presentaron problemas durante la fermentación, observamos que 19 de los 22 clones presentaron el pH más elevado en el año 2005, dos (W, X) en 2004 y uno (S) en 2003. Cinco de los clones presentaron el pH más bajo en el año 2004 (D, I, J, S, T), uno (X) en 2005 y los diez restantes en 2003. El clon L todos los años se encontraba en el grupo que presentaba el pH más elevado. Por el contrario, el clon T se encontraba siempre en grupo de clones con el pH más bajo.

4.7.2. Resultados de las catas y análisis organolépticos

En la Tabla 8 se muestran los resultados del análisis sensorial para cada uno de los 22 vinos, en cada uno de los tres años de estudio. Como ya se ha dicho en material y métodos, estas catas fueron realizadas por catadores de la bodega que además de describir los vinos, pretendían seleccionar aquellos con características particulares y típicas de los vinos de la Bodega. El conjunto de estas características olfativas y gustativas, es lo que denominamos en este trabajo “sello de la Bodega”. Ocho de los veintidós vinos estudiados mostraron, en alguno de los tres años, el denominado “sello de la Bodega”, y fueron los siguientes:

Los vinos del clon B, los tres años mostraron fondo frutal con aromas a melocotón, a pesar de que el del 2004 presentaba volátil. Los vinos de los años 2003 y 2005 presentaron también aromas a manzana madura. En 2005 se calificó como untuoso, equilibrado, largo, sabroso y dando en boca el “sello de la Bodega”

El vino del clon K presentó en 2003 nula intensidad, resultando ácido pero aceptable. En 2004 sin embargo, resultó amielado, con aromas de fruta sobremadura, con algo de piel de naranja. Equilibrado, con cuerpo pero corto y seco. Lo catadores lo calificaron como capaz de dar el “sello de la Bodega”. En 2005 sin embargo presentó media-baja intensidad de manzana golden, cítricos, herbáceo y maduro. Desequilibrado por acidez cítrica, pero aceptable, no corto y cálido.

Tabla 8. Resultados del análisis sensorial para cada uno de los 22 vinos, en cada uno de los tres años de estudio

	AÑO 2003		AÑO 2004		AÑO 2005	
	Fase olfativa	Fase gustativa	Fase olfativa	Fase gustativa	Fase olfativa	Fase gustativa
CLON						
B	Manzana madura, —	Secante. equilibrado	Volatil. Fondo fruta madura	- ^a	<u>Untuoso Equilibrado</u>	<u>Largo, sabroso</u>
C	Buena intensidad frutal	Amable Con estructura	Volatil. Fondo fruta madura	-	Basto, falta finura, graso, lácteos con fondo fruta verde	Bastante ligero, marcada acidez. Desequilibrado. No agradable
D	Etanal (almendra)	Muy ligero. Desequilibrado. Amargo	Frutos secos. Manzana verde	Acidez. Falta estructura. Ligero	Volátil	-
E	Ligero frutal. Evolucionado	Secante. Áspero.	Fruta verde. Manzana verde. Aceptable	Boca de fino. Falta alegría y jugosidad. Secante	Alcohólico, vinoso, colonia barata	Desequilibrado, presencia de azúcar
F	Muy poco intenso Fondo sucio	Ligero.	Pura volátil. No tiene fruta	-	Media intensidad. Fruta madura, manzana, cítrico, sencillo	Vino rancio, recuerda al fino. Retronasal de frutos secos
H	Fruta madura. Mantequilla	Marcada acidez cítrica	Muy bajo de intensidad, con algo de fruta	Azúcar marcado, acidez, ligero	Volátil	-
I	Cierta evolución. Fondo frutal	Buena estructura Largo	Baja intensidad, fruta, frutos secos	Equilibrado pero ligero. No destaca acidez	Acetato, pero a pesar de ello muy frutal, fruta ácida	Desequilibrado por el acetato. Empalagoso. Amargor de almendra, no de variedad
J	Defectuoso. Marcado etanal	Áspero. Secante.	Baja intensidad, manzana verde, frutos secos	Ligero, amargo y soso. Seco	Manzana verde, pero por la volátil no se puede describir	Rancio, etanal, almendra amarga
K	Nula intensidad	Ácido aceptable	<u>Amielados, fruta sobremadura, piel de naranja</u>	<u>Equilibrado, con cuerpo pero corto. Seco</u>	Media-baja intensidad de manzana golden, cítricos, herbáceo, maduro	Desequilibrado por acidez cítrica, pero no está mal, no corto, cálido
L	Herbáceos. Poco frutal	Ligero amargor pero goloso	Intenso de aromas, manzana madura y frutos secos, ligera volátil	Equilibrado, con cuerpo y largo. Seco	Volátil	-
M	Marcada intensidad herbácea	Duro. Ácido. Secante	Buena fruta, intenso y limpio	Desequilibrado, azúcar, ligero	Media-alta intensidad. Piel naranja, fruta en compota, mermelada, finura	Untuosidad. Predomina acidez málico. Fresco, bien
N	Frutas de hueso	Agradable aunque ligero	Volátil, siempre dío acético	-	Buena intensidad, muy frutal, manzana, naranja	Untuoso, goloso, largo
Ñ	Poca intensidad. Manzana	Con cuerpo pero áspero	Con volátil, pero bastante fruta madura	Tiene tanto azúcar que enmascara acidez	Mucha fruta hueso (melocotón),	Muy untuoso, buena retronasal frutal. Bastante

Tabla 8 (continuación)

CLON	AÑO 2003		AÑO 2004		AÑO 2005	
	Fase olfativa	Fase gustativa	Fase olfativa	Fase gustativa	Fase olfativa	Fase gustativa
R	<u>Buena intensidad. Frutal. Piña</u>	<u>Equilibrado y vivo Con estructura</u>	Buena fruta, cítrico, frutos secos	Azúcar, volátil	<u>Muy buena intensidad cítrica, pomelo, piel naranja, piña, tropicales</u>	<u>Mejor en nariz que en boca. Algo falto de cuerpo, pero algo</u>
S	Frutos secos. Falta frescura	Dulce y ligero	Volátil	-	Plátano (acetato isoamilo), piel naranja muy agradable	Untuoso, cremoso pero le falta cuerpo. Corto pero bien
T	Buena fruta	Le falta estructura	Yogur de melocotón	Desequilibrado por azúcar	<u>Un poco volátil pero buena intensidad de plátano y cítricos</u>	<u>Muy agradable, untuoso, denso, largo. El más completo</u>
U	<u>Fruta fresca mandarina, mango.</u>	<u>Ligeramente ácido</u>	Aguado, posible fruta	-	Pudo estar bien porque es intenso, pero tiene toque de fino	Empalagoso, picante. No está bien
V	<u>Muy intenso. Pomelo, pera, manzana</u>	<u>Algo ácido pero carnoso y vivo</u>	Volátil	-	Volátil	-
W	Fruta. Fondo de yogur	Muy ácido Agresivo	Intensidad de frutos secos	Desequilibrado por azúcar	Buena intensidad, cítrico, piel naranja. Falta complejidad	Ligero. Toque de etanal en retronasal. Falta estructura
X	Rancio. Humedad. Desagradable	Agridulce. Desequilibrado	<u>Intenso de aromas, manzana madura y frutos secos, ligera volátil</u>	<u>Equilibrado, falta de cuerpo</u>	No está mal. Manzana, piel naranja. Falta complejidad	Desequilibrado, empalagoso, desvaído

^aNo determinado

El vino del clon N presentó en 2003 aromas a frutas de hueso, resultando agradable aunque ligero. En 2004 desafortunadamente, presentó una elevada presencia de volátil, lo que impidió su descripción. En 2005 presentó de nuevo una buena intensidad, mostrándose muy frutal, con aromas a naranja, untuoso, goloso y largo. Tanto en 2003 como en 2005 presentó el “sello de la Bodega”.

El vino del clon R mostró en 2003 buena intensidad frutal con aromas a piñas, resultando además equilibrado, vivo y con estructura. En 2004 aunque presentó también aromas a buena fruta, cítricos y frutos secos, en boca se notaba la presencia de azúcar y volátil, debido a problemas ocurridos durante la fermentación. En 2005 de nuevo volvió a presentar el “sello de la Bodega” con una muy buena intensidad cítrica, destacando los aromas a pomelo, piel de naranja, piña y tropicales. En boca resultó algo peor que en nariz, con falta de cuerpo, pero largo. Este clon junto con el anterior fueron los dos que presentaron el “sello de la Bodega” en dos de los tres años de estudio, y en ambos fueron los años 2003 y 2005.

El vino del clon T presentó en 2003 aroma a buena fruta, aunque en boca le faltaba estructura. En 2004 mostró aroma a yogur de melocotón y en boca se mostró desequilibrado por azúcar. En 2005 fue cuando presentó el “sello de la Bodega”. A pesar de que tenía algo de volátil en la fase olfativa, mostró buena intensidad de plátano y cítricos. En la fase gustativa resultó muy agradable, untuoso, denso y largo, siendo catalogado por los catadores como el más completo de ese año.

El vino del clon U en 2003 presentó en la fase olfativa aromas a fruta fresca, mandarina y mango y aunque en la fase gustativa resultaba ligeramente ácido, presentaba el “sello de la Bodega”. En 2004, por problemas en la fermentación el vino final resultó aguado, aunque se podía percibir en él un fondo de fruta en la fase olfativa. El vino de 2005, aunque según los catadores pudo haber estado bien por su intensidad, predominaba en él un toque de vino fino y resultando en boca empalagoso y picante.

El vino del clon V, en 2003 presentó el “sello de la Bodega”, siendo descrito en la fase olfativa como muy intenso, con aromas a pomelo, pera y manzana.

En boca resultó algo ácido pero carnoso y vivo. En los años 2004 y 2005, problemas en la fermentación, hicieron que presentara una alta intensidad a volátil, lo que hacía imposible su cata.

El vino del clon X en 2003 resultó en la fase olfativa rancio, desagradable y con olor a humedad. En 2004 sin embargo presentó el “sello de la Bodega”, mostrándose intenso, con aromas a manzana madura y frutos secos, a pesar de presentar una ligera acidez volátil. En boca resultaba equilibrado pero con falta de cuerpo. El vino del año 2005 en la fase olfativa, a pesar de que le faltaba complejidad, presentó aromas a manzana y piel de naranja. En la fase gustativa resultó sin embargo desequilibrado, empalagoso y desvaído.

4.7.3. Resultado de los análisis de aromas

En la Tabla 9, se muestran los resultados para los tres años de estudio de los análisis de aromas.

Como se explicó en material y métodos, los análisis de aromas sólo se realizaron en los vinos del año 2004. En la Tabla 9 se muestran los resultados de los aromas varietales en forma libre. En la concentración de limoneno destacan los clones J, K, L y R, con concentraciones superiores a 4000 µg/L. En el extremo opuesto, con concentraciones por debajo de 220 µg/L, destaca el clon S. En la concentración de linalol destacan los clones J y T por presentar las concentraciones más altas (87.90-83.37 µg/L) y el clon S, por presentar la más baja (4.52 µg/L). En a-terpineol el clon con mayor concentración fue E (66 µg/L), seguido de los clones J y M (31.18, 32.23 µg/L), mientras que el de menor concentración fue S (4.52 µg/L), seguido del B (7.77 µg/L). En citronelol destacó el clon P (79.38 µg/L) con la mayor concentración y el clon S (0.48 µg/L) seguido del Q y B (3.57-3.66 µg/L). En concentración de nerol destacaron los clones Q, L y Ñ (261.32, 230.68 y 205.11 µg/L respectivamente) y los clones C, D, E, F, G, H, I, J y K en los que no apareció este compuesto. En geraniol el clon que presentó mayor concentración fue T (8.74 µg/L), mientras que en los clones B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M y N, no apareció este compuesto. En a-ionona los clones R y F (65.74-62.19 µg/L) fueron los que presentaron la mayor concentración, mientras que en B y E no apareció este compuesto.

Tabla 9. Aromas varietales. Compuestos en forma libre (concentración expresada en $\mu\text{g/L}$)

Clones	limoneno	linalol	a-terpineol	citronelol	nerol	geraniol	a-ionona	b-ionona
B	1184,78	24,10	7,77	3,66	116,47	0,00	42,45	0,00
C	1242,35	31,68	12,96	5,14	0,00	0,00	44,83	36,75
D	2911,25	24,24	13,20	6,87	0,00	0,00	49,93	42,07
E	4489,05	51,09	66,00	21,20	0,00	0,00	86,76	0,00
F	890,81	24,87	14,51	5,01	0,00	0,00	55,63	62,19
G	1240,89	32,46	15,39	4,44	0,00	0,00	31,40	46,06
H	3269,69	40,39	30,88	10,62	0,00	0,00	38,15	21,79
I	4290,12	65,14	21,74	30,63	0,00	0,00	31,43	18,29
J	4649,10	87,90	32,23	17,24	0,00	0,00	108,10	43,84
K	5494,35	38,12	22,38	44,90	0,00	0,00	0,00	22,00
L	5061,05	25,66	19,12	16,95	230,68	0,00	40,66	18,47
M	4408,95	49,70	31,18	17,56	13,45	0,00	25,65	22,45
N	1307,25	23,16	19,99	6,41	185,04	0,00	52,24	20,09
Ñ	2929,21	42,70	24,72	7,53	205,11	3,53	45,48	6,84
O	4027,13	51,96	27,28	18,02	16,26	2,73	48,12	11,32
P	3685,76	72,59	26,78	79,38	6,36	4,62	28,92	6,38
Q	1562,84	42,96	14,51	3,57	261,32	5,39	40,61	2,18
R	4546,76	62,65	17,39	26,66	17,61	2,56	39,45	65,74
S	216,09	4,52	1,89	0,48	22,29	0,49	3,98	0,39
T	4012,70	83,37	20,70	25,06	26,47	8,74	28,59	10,30
V	1563,34	26,39	17,56	4,28	125,34	6,48	49,87	4,70
W	3252,82	61,12	21,85	20,98	16,42	2,40	30,19	9,46
X	4000,35	58,55	29,49	20,84	31,11	5,28	39,48	4,92

En la Tabla 10 se muestran los resultados de los aromas varietales en forma ligada. En limoneno destacan los clones C, D y V (32.21, 32.68, 33.47 $\mu\text{g/L}$) con la mayor concentración, y los clones T y Ñ (12.58, 14.55 $\mu\text{g/L}$) con la menor concentración de dicho compuesto. En linalol los clones E, X, J y P presentaron las concentraciones más elevadas (17.19-20.17 $\mu\text{g/L}$), mientras que en el clon C no apareció este compuesto y en el B su concentración era muy baja (3.31 $\mu\text{g/L}$). En a-terpineol los clones X y J presentaron las concentraciones más elevadas (3.78 y 2.63 $\mu\text{g/L}$), mientras que en los clones C, F, N y T no apareció este compuesto. En citronelol el clon B presentó la concentración más elevada (6.86 $\mu\text{g/L}$) seguido de los clones F y N (6.02 y 6.03 $\mu\text{g/L}$), mientras que en el clon C no apareció este compuesto. En geraniol el clon G fue el que presentó la mayor concentración (4 $\mu\text{g/L}$), seguido de

Tabla 10: Aromas varietales. Compuestos en forma ligada (concentración expresada en $\mu\text{g/L}$)

Clones	limoneno	linalol	a-terpineol	citronelol	geraniol	a-ionona
B	20,29	3,31	0,41	6,86	2,93	3,37
C	32,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D	32,68	6,96	0,70	3,68	2,53	4,92
E	26,67	17,19	1,31	3,68	2,14	4,75
F	28,04	5,49	0,00	6,02	2,56	3,94
G	22,37	7,18	0,48	5,68	4,00	3,96
H	18,61	14,10	1,43	3,51	2,26	3,46
I	20,13	13,26	1,39	5,36	3,92	4,98
J	28,57	19,86	2,63	3,76	1,35	5,49
K	29,55	6,97	1,51	3,15	1,53	2,77
L	28,92	13,51	1,18	4,14	3,04	2,99
M	27,11	9,20	1,30	2,96	2,47	3,60
N	24,24	3,85	0,00	6,03	2,24	3,13
Ñ	14,55	16,63	1,25	3,31	3,42	3,21
O	23,43	14,90	0,73	5,48	0,00	3,76
P	24,00	20,17	2,19	4,46	3,28	4,93
Q	21,90	7,08	0,44	5,86	2,94	4,87
R	18,31	13,91	1,34	3,62	1,51	4,23
S	24,89	8,68	1,01	5,11	2,84	3,08
T	12,58	5,41	0,00	3,25	0,00	2,51
V	33,47	7,64	1,58	4,51	3,97	3,50
W	16,89	13,27	2,03	3,10	1,23	3,15
X	29,18	18,27	3,78	4,22	3,20	13,73

los clones V e I (3.97, 3.92 $\mu\text{g/L}$), mientras que en los clones C, O y T no apareció este compuesto. En a-ionona, el clon X fue el que presentó la mayor concentración (13.73 $\mu\text{g/L}$), mientras que en el clon B no apareció este compuesto.

En las Tablas 11A y 11B se muestran los resultados para los aromas fermentativos. Se observa que el clon K fue el que presentó las mayores concentraciones de alcoholes superiores, seguido del clon R. Por el contrario, los clones que presentaron la menor concentración de alcoholes superiores fueron B y V, seguidos de C. En cuanto a los Ésteres etílicos y acetatos, el clon

T destacó entre todos por presentar una altísima concentración de lactato de etilo frente al resto de los clones, seguido de L y W. Por el contrario, en doce de los 22 clones, no apareció este compuesto.

El clon V destacó frente al resto por presentar una concentración más elevada de decanoato de etilo, mientras que en ocho de los 22 clones no apareció este compuesto.

Tabla 11a. Resultado del análisis de aromas fermentativos ($\mu\text{g/L}$)

CLON	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Compuestos											
Alcoholes superiores											
1-propanol	8,89	9,29	37,93	87,59	14,59	15,33	30,27	62,51	52,16	121,11	46,80
2-metil-1-propanol	32,20	31,11	27,70	101,46	51,34	38,30	40,00	73,84	82,98	65,92	42,67
1-butanol	0,00	0,00	1,20	3,19	0,00	0,00	0,00	2,37	1,67	4,53	2,32
2-metil-1-butanol	4,97	4,76	9,70	18,48	7,60	6,34	14,85	17,84	17,43	20,75	19,69
3-metil-1-butanol	10,69	11,49	52,02	94,35	19,85	16,15	42,02	68,58	78,24	84,72	70,68
hexanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	0,94
trans-3-hexenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,30	0,00
Ésteres etílicos y acetatos											
propionato de etilo	1,37	1,10	2,24	0,71	2,13	0,81	0,68	1,14	0,43	1,37	1,07
butirato de etilo	0,00	0,00	0,17	0,21	0,00	0,00	0,00	0,30	0,28	0,43	0,23
acetato de isoamilo	2,35	2,39	9,28	0,00	2,89	2,93	0,80	0,30	0,11	0,00	3,53
hexanoato de etilo	0,00	0,00	0,46	0,39	0,00	0,00	0,00	0,27	0,26	0,54	0,26
heptanoato de etilo	0,71	0,69	0,64	0,67	0,86	0,53	0,50	0,51	0,53	0,68	0,47
octanoato de etilo	0,00	0,00	0,30	0,34	0,00	0,00	0,00	0,18	0,19	0,26	0,28
nonanoato de etilo	0,39	0,47	0,39	0,27	0,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00
decanoato de etilo	4,02	5,91	3,56	1,17	7,52	3,21	0,00	0,00	0,00	1,43	2,44
succinato de dietilo	2,88	3,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
acetato de 2-feniletilo	0,86	0,56	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00
dodecanoato de etilo	6,26	5,44	4,63	4,53	5,85	4,58	2,40	3,54	3,70	5,11	3,60
lactato de etilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	31,03	51,33
Ácidos											
ácido isopentanoico	0,63	0,00	1,02	1,39	0,00	0,00	0,00	0,73	1,11	1,55	0,00
ácido pentanoico	0,47	0,34	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ácido hexanoico	48,00	97,63	99,72	103,75	66,41	103,33	118,35	120,17	135,97	96,43	244,69
ácido octanoico	5,86	12,75	1,21	0,40	0,63	0,17	0,64	0,58	1,10	1,13	1,40

Por lo que se refiere a los ácidos, destacó el clon L por presentar una elevada concentración de ácido hexanoico (244.69 µg/L), frente a otros como el clon B que presentó una concentración cinco veces menor. El clon V destacó por presentar la mayor concentración de ácido propinoico. Los clones K, L y M por ser los únicos en los que apareció ácido isobutírico, frente al resto de los clones en los que no aparecía este compuesto. De la misma manera, los clones B, C y D presentaron una pequeña concentración de ácido pentanoico, frente al resto de los clones en los que no aparecía este compuesto.

4.8. Estudios y selección de levaduras autóctonas

Fundamentalmente en base al estudio de aislamiento, recuento y selección de cepas de levadura vínica autóctona de mostos de Albariño de la Bodega, realizados en vendimias anteriores, se llevó a cabo la selección de cepas de las que iban a ser utilizadas en los ensayos de vinificación en bodega durante la vendimia de 2006. Los criterios seguidos fueron los previstos, esto es, predominancia numérica del perfil de ADN mitocondrial, y resultado de los ensayos de exclusión competitiva realizados. A estos criterios se añadió el de supervivencia a la liofilización, ya que se conocía la supervivencia a la congelación de las cepas seleccionadas. Además se diseñó un plan de trabajo asequible al tiempo, la capacidad de la bodega y los laboratorios del CSIC. Como resultado del proceso se eligieron 4 cepas de *S. cerevisiae*, que a efectos de nomenclatura aparecen en la memoria como cepas 1, 2, 3 y 4.

4.8.1. Estudio de la imposición de 4 cepas distintas durante la fermentación de vinos blancos Albariños.

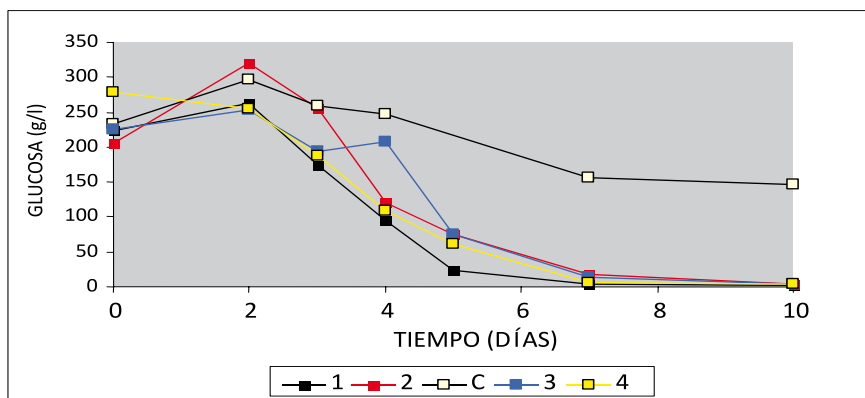
Las cepas 1, 2, 3 y 4 de la levadura *S. cerevisiae* fueron inicialmente aisladas en la Bodega. Con la finalidad de estudiar los efectos que estas cepas pueden ejercer sobre las propiedades organolépticas de los vinos, un mosto de Albariño suministrado por la Bodega se inoculó con cada una de estas cepas, para posteriormente llevar a cabo un análisis comparativo del perfil aromático de los vinos fermentados con las cepas ensayadas.

Para garantizar que las posibles diferencias observadas entre los vinos son una consecuencia directa de la cepa de levadura que lleva a cabo la fermentación fue necesario disponer de un sistema que permitiera identificar las cepas presentes en el vino a lo largo de todo el proceso de elaboración, para asegurar que las cepas inoculadas se imponían al resto de levaduras presentes en el mosto y eran las responsables del proceso fermentativo. Para ello se puso a punto un método de caracterización molecular de cepas de *S. cerevisiae* basado en la detección de polimorfismos en el ADN mitocondrial (mtADN) tras la restricción del ADN total con la enzima *Hinf*I. Esta enzima de restricción, con secuencia de reconocimiento (5'GANTC 3'), presenta un elevado número de puntos de corte en el ADN genómico, siendo mucho menor el número de secuencias de reconocimiento en el mtADN, con un 75 % de A y T en su secuencia. Por tanto, digestiones del ADN total con *Hinf*I provocan la rotura del ADN genómico en pequeños fragmentos que, en geles de agarosa, se visualiza como un fondo tenue sobre el que se pueden distinguir las diferentes bandas correspondientes al mtADN mucho menos fragmentado. Puesto que la molécula de mtADN presenta un alto grado de polimorfismo, que se corresponde con un patrón de bandas de restricción con *Hinf*I característico de cada cepa, la digestión de ADN total con esta enzima permite la caracterización molecular de las cepas vónicas.

Estudio de imposición de cepas durante fermentaciones en laboratorio

El mosto empleado en todos los experimentos realizados en este trabajo es el mismo que se utiliza en la Bodega para la elaboración de sus vinos. Todos estos vinos son de fermentación espontánea, aprovechando la carga microbiológica que presentan los mostos de forma natural. Puesto que existe un interés en la utilización de levaduras seleccionadas en la propia bodega para desarrollar nuevos procesos de vinificación, resulta fundamental conocer si estas levaduras son capaces de imponerse durante la fermentación al resto de las levaduras presentes en el mosto. Para ello se estudió el grado de imposición de las cepas 1, 2, 3 y 4 a escala de laboratorio, utilizando unos volúmenes de mosto de 200 ml. Una muestra de mosto se dejó sin inocular permitiendo que la fermentación transcurriera de forma espontánea. Durante el experimento se extrajeron muestras para seguir el proceso fermentativo mediante la medición de azúcares reductores así como para llevar a cabo la caracterización molecular de las colonias aisladas una vez concluida la fermentación.

Fig. 13. Progresión de la fermentación del mosto sin inocular (C) e inoculado con las cepas 1, 2, 3 y 4.



Como se puede observar en la Figura 13 la fermentación de los mostos inoculados transcurrió con una cinética similar, mientras que el consumo de azúcares fue mucho más lento en el caso del mosto fermentado de manera espontánea C. Mientras que a los 7 días el azúcar de los mostos inoculados con las cepas 1, 2, 3 y 4 era completamente fermentado, el porcentaje de azúcar remanente en el mosto sin inocular era todavía del 67.2 % con respecto al valor inicial. Esta diferencia de actividades fermentativas observadas entre los mostos inoculados y sin inocular parece indicar que las cepas 1, 2, 3 y 4 pueden estar participando activamente en la fermentación. En concreto en el mosto inoculado con la cepa 1 se registra una mayor rapidez el descenso de la glucosa, lo que podría ser indicio de su mejor adaptabilidad al medio, si se llegase a demostrar a nivel molecular su predominancia.

Para poder demostrar la participación de las cepas ensayadas en la fermentación se aislaron colonias provenientes de cada vino al final del proceso fermentativo y posteriormente se procedió a su identificación mediante la aplicación de técnicas moleculares basadas en la detección del mtADN. Los resultados obtenidos fueron concluyentes. De las 24 colonias aisladas al final de la fermentación del mosto inoculado con la cepa 1, todas presentaban un patrón de restricción del mtADN idéntico al de la cepa inoculada (Figura 14).

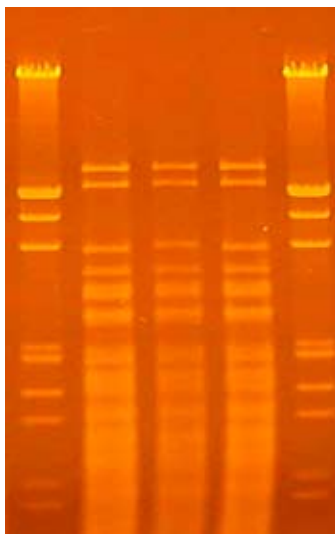


Fig. 14. Patrón de restricción del mtADN digerido con *HinfI* de *Saccharomyces cerevisiae* por triplicado. Las colonias de levadura fueron aisladas al final de la fermentación del mosto inoculado y control. Las carreras laterales λ son el ADN del fago λ digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*.

Idénticos resultados se obtuvieron con los vinos previamente inoculados con las cepas 2 y 4. En ambos casos el 100 % de las cepas identificadas se correspondían con las cepas previamente inoculadas en el mosto. Tras el análisis de 30 colonias provenientes del vino inoculado con la cepa 3, 28 de ellas fueron identificadas como esta misma cepa mientras que una segunda cepa, que no pertenecía a ninguna de las levaduras ensayadas en este experimento, fue también identificada.

Del vino resultante de la fermentación espontánea, proveniente del mosto que se dejó sin inocular, se analizaron 25 colonias, cada una de las cuales fue identificada como una cepa que no correspondía con ninguna de las cepas ensayadas 1, 2, 3 y 4. Los resultados obtenidos son bastante claros, las cepas 1, 2, 3 y 4 inoculadas en el mosto comercial son las que llevan a cabo la fermentación de estos mostos. Fundamentalmente estas levaduras se imponen a la cepa que lleva a cabo la fermentación del mosto sin inocular, identificada como mayoritaria después de la fermentación espontánea. En la Tabla 12 están representados los porcentajes de imposición obtenidos en estos experimentos.

Tabla 12. Porcentajes de imposición de las cepas inoculadas en las experiencias de laboratorio.

1	n	2	n	3	n	4	n
100%	24	100%	29	92.9%	28	100%	30

Estudio de imposición de cepas durante fermentaciones en bodega

Una vez demostrada la imposición de las cepas 1, 2, 3 y 4 en los procesos fermentativos realizados en el laboratorio, se procedió de una manera similar para determinar el grado de imposición de estas mismas cepas durante el desarrollo de la fermentación en bodega. Para ello, tanques con 30 L de mosto se inocularon con cada una de las cepas, y a diferentes tiempos del transcurso de la fermentación (fases inicial, tumultuosa y final) se extrajeron muestras para aislar colonias y proceder a su caracterización molecular. Aunque el objetivo inicial fue inocular todos los tanques de 30 L de mosto con 10^6 cel/ml de cada una de las cepas, el error experimental junto con una posible pérdida de viabilidad de las cepas durante el transporte de los inóculos desde las instalaciones en el Organismo del Grupo 1 hasta la Bodega, provocó que existieran algunas diferencias en lo que se refiere al número de células inoculadas (Tabla 13).

Tabla 13. Recuento de levaduras (en ufc/mL) durante la experiencia de vinificación controlada en la bodega en 2006. La fila denominada Control corresponde a los recuentos de la fermentación espontánea. Los recuentos son la media de tres determinaciones.

	FASE INICIAL	FASE TUMULTUOSA	FASE FINAL
CEPA 1	$2,25 \cdot 10^5$	$5,78 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^4$
CEPA 2	$1,2 \cdot 10^6$	$6,41 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^4$
CEPA 3	$1,18 \cdot 10^6$	$6,21 \cdot 10^7$	$4,1 \cdot 10^4$
CEPA 4	$1,85 \cdot 10^5$	$1,95 \cdot 10^7$	$< 10^2$
Control	$5,9 \cdot 10^4$	$9,7 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^4$

Población de levaduras presentes durante la fase inicial

A tiempo cero (fase inicial), el mosto sin inocular presentaba una población heterogénea de levaduras, distinguiéndose 4 cepas diferentes de las 22 colonias analizadas aisladas antes del comienzo de la fermentación.

Entre las cepas identificadas una de ellas era la mayoritaria en el mosto, apareciendo en 17 de las 22 colonias analizadas. Otra cepa aparecía en 3 ocasiones mientras que 2 cepas aparecían en una sola vez. Ninguna de estas levaduras se correspondía con las cepas 1, 2, 3 o 4. Sin embargo, cuando del tanque recién inoculado con la cepa 1 se aislaron y caracterizaron 30 colonias, la mayoría de las cepas identificadas correspondían a la cepa 1 inoculada. En este caso, puesto que todavía no ha comenzado la fermentación, no se trata de una imposición de la cepa 1 sobre la población de levaduras presente en el mosto, simplemente es el resultado de que ésta fue inoculada a una densidad por encima de la densidad de levaduras ya existentes en el medio. De hecho, de las 30 colonias analizadas genéticamente, 27 fueron identificadas como la cepa 1 mientras que 3 resultaron ser una cepa diferente que se correspondía con la cepa mayoritaria presente a tiempo cero en el mosto sin inocular.

Cuando se llevó a cabo el análisis molecular de las colonias aisladas en el tanque inoculado con la cepa 2, el resultado fue similar al observado anteriormente. En este caso, de las 26 colonias caracterizadas, 25 se identificaron como la cepa 2 mientras que tan solo una presentaba un polimorfismo diferente que no se correspondía con ninguno de los controles. Tras el análisis molecular de 30 colonias aisladas durante la fase inicial del mosto inoculado con la cepa 3 se observó que 29 de ellas presentaban el patrón de bandas del mtADN de la cepa 3, mientras que una de las colonias se correspondía con la cepa 2. Los resultados obtenidos del análisis del patrón de restricción del mtADN de las colonias aisladas del mosto inoculado con la cepa 4 no fueron tan homogéneos como los observados en el resto de los tanques previamente inoculados. En este caso tan solo 12 de las 24 colonias analizadas resultaron ser la cepa 4. La levadura previamente identificada como mayoritaria en el mosto, aparecía como segunda cepa más numerosa.

Población de levaduras presentes durante la fase tumultuosa

El mismo protocolo experimental se llevó a cabo para determinar la población de levaduras presentes en cada uno de los tanques en plena fermentación. Puesto que durante esta fase tumultuosa las levaduras presentan una dinámica de crecimiento exponencial, su identificación informará sobre la cepa o número de cepas que están desempeñando un papel principal en el proceso fermentativo hasta ese momento. En este sentido, la identificación durante esta fase de las cepas de interés previamente inoculadas informará

sobre su grado de imposición en detrimento de las cepas presentes en el mosto. En lo que se refiere a las cepas 1, 2 y 3 los resultados obtenidos fueron concluyentes. El 100% de las cepas analizadas fueron identificadas como las cepas inoculadas en cada caso.

Las cepas inoculadas 1, 2 y 3 se impusieron durante las fases iniciales de la fermentación principalmente a dos cepas que aparecían como mayoritarias en el tanque sin inocular. De las 21 colonias caracterizadas aisladas durante la fase tumultuosa del vino de fermentación espontánea, 8 colonias correspondían con la cepa que aparecía como mayoritaria en el mosto sin inocular de la fase inicial, mientras que 11 fueron identificadas como una cepa diferente que no se correspondía con ninguna de las levaduras ensayadas. Adicionalmente 2 cepas diferentes fueron identificadas.

A diferencia de los resultados obtenidos anteriormente, en los que se observaba una clara imposición de las cepas inoculadas con respecto a la población de levaduras presentes en el mosto, los resultados de imposición de la cepa 4 hasta la fase tumultuosa fueron bastante diferentes. En este caso, de las 26 colonias analizadas tan sólo una fue identificada como 4. Por el contrario, la cepa más abundante, que aparecía en 18 ocasiones, fue la cepa identificada como mayoritaria durante la fase inicial en el mosto sin inocular. En la población de colonias analizadas se pudieron distinguir 7 cepas diferentes más, una de las cuales tenía el mismo patrón de restricción que la cepa 3.

Población de levaduras presentes al final de la fermentación

De acuerdo con los resultados obtenidos en la identificación molecular de cepas, se puede concluir que la imposición de las cepas 1, 2 y 3 observada durante la fase tumultuosa, se mantiene hasta el final del proceso fermentativo. De las 30 colonias caracterizadas que fueron aisladas al final de la fermentación del mosto inoculado con la cepa 1, las 30 fueron identificadas como cepa 1. De modo análogo, 29 de las 30 colonias analizadas, provenientes del mosto inoculado con la cepa 2, resultaron ser esta misma cepa, mientras que la cepa 3 fue identificada como único integrante de las 30 colonias analizadas al final del proceso fermentativo del mosto inoculado con esta levadura. Por el contrario, no fue posible tener ningún resultado del vino inoculado con la cepa 4, puesto que no fue posible aislar ninguna colonia al final de la fermentación.

A diferencia de los resultados obtenidos a escala de laboratorio, donde tan sólo se pudo identificar una sola cepa al final de la fermentación espontánea, la población de levaduras fue mucho más heterogénea en el vino fermentado espontáneamente en bodega. De las 28 colonias analizadas, tan solo tres de ellas se correspondían con la cepa que llevó a cabo la fermentación espontánea del mosto en el laboratorio, y que también se encontraba presente como cepa mayoritaria en la fase tumultuosa del mosto inoculado con la cepa 4, y como segunda cepa en importancia, durante esta misma fase, en el mosto sin inocular. Curiosamente, la cepa 1 fue identificada en 13 ocasiones, la cepa 3, 6 veces, y la cepa 4 una sola vez. Adicionalmente, otras cepas diferentes a las cepas ensayadas fueron identificadas en menor medida.

La identificación de cepas al final de la fermentación espontánea en bodega que no aparecieron durante el experimento a escala de laboratorio puede ser consecuencia de las diferentes condiciones asépticas de ambos lugares. Mientras que en el laboratorio la recogida de muestras tenía lugar en campanas de flujo laminar bajo condiciones estériles, en la bodega se realizó bajo condiciones normales. Aunque durante el muestreo en bodega se intentaron mantener las máximas precauciones posibles, no se puede descartar una contaminación entre tanques, posiblemente durante el removido de los vinos antes de la toma de muestras durante la fase tumultuosa. Sin embargo, la población de levaduras presentes en el vino fermentado en bodega puede estar reflejando un proceso fermentativo normal. Cabe destacar que la población de levaduras presentes en la propia bodega es amplia y que parte de las levaduras presentes en el vino fermentado fueron previamente aisladas, como consecuencia de su abundancia. Un hecho importante en este sentido, es que no se detectó ninguna anomalía en las propiedades organolépticas de los vinos de fermentación espontánea. De hecho, éstos, junto con los vinos fermentados con la cepa 1, fueron los que más se ajustaban a las características organolépticas buscadas por la bodega. Cabe destacar que la cepa 1 también fue detectada como mayoritaria en los vinos de fermentación espontánea en bodega, por lo que esta cepa puede ser responsable de parte de las características deseadas en el producto final (Figura 15).

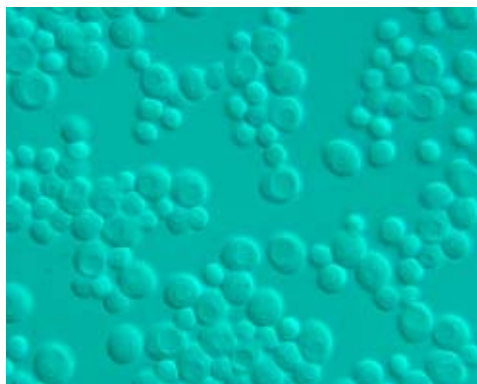


Fig. 15. Levadura seleccionada por el Organismo, cuyo empleo para vinificación en Albariño está patentado en cotitularidad con la Bodega, que produce en cantidad suficiente un *spin off* del Organismo, y que este año 2009 ha vinificado la totalidad de la cosecha de Albariño de la Bodega (1.000.000 L)

Se incluye una tabla (Tabla 14) que resume los porcentajes de imposición obtenidos para cada cepa en los aislamientos de colonias realizados durante las fases inicial, tumultuosa y final en bodega

Tabla 14. Porcentaje de imposición de las cepas inoculadas durante la experiencia de vinificación controlada en la bodega en 2006. La fila denominada C corresponde a los recuentos de la fermentación espontánea, no inoculada, en la que no se incluye porcentaje de imposición de perfil alguno. Los recuentos son la media de tres determinaciones.

	1	n	2	n	3	n	4	n
Inicial	90%	30	96.1%	26	96.7%	30	50%	24
Tumultuosa	100%	29	100%	26	100%	29	3.8%	26
Final	100%	30	96.7%	30	100%	30	n.d.	n.d.

4.8.2. Preparación de inóculos para la elaboración de vinos con la cepa 1

Los vinos fermentados con la cepa 1 fueron los más apreciados en la cata de los vinos elaborados en bodega. Con la intención de poder realizar vinos empleando esta levadura se determinó el grado de imposición de la cepa 1 en procesos fermentativos en el laboratorio que simularan el proceso de inoculación de levaduras durante la elaboración de vinos en bodega. Para ello se procedió tal y como se explicó en el apartado 3 de la sección Materiales

y Métodos (ver Figura 5). Excepto para el caso de la muestra I_3 de 200 ml, donde no se pudo aislar ninguna colonia debido a una estimación incorrecta a la hora de hacer las diluciones de la muestra, los resultados fueron positivos. Se analizaron 30 colonias de las muestras SD_{1-4} e I_{1-3} y todas ellas fueron identificadas como la cepa 1. A continuación se presenta la viabilidad de cada reinoculación (Tabla 15).

Tabla 15. Viabilidad de la experiencia del pie de cuba realizada en el laboratorio. Los recuentos son la media de tres determinaciones.

SD1	$1,3 \cdot 10^7$ ufc/mL
SD2	$1,76 \cdot 10^7$ ufc/mL
SD3	$1,6 \cdot 10^6$ ufc/mL
SD4	$3,6 \cdot 10^6$ ufc/mL
IN1	$4,2 \cdot 10^6$ ufc/mL
IN2	$6 \cdot 10^5$ ufc/mL
IN3	$7 \cdot 10^5$ ufc/mL

4.8.3. Conservación de cepas

Una vez demostrada la imposición de la cepa 1 en todas las condiciones ensayadas se procedió a su conservación como levadura seca activa. Junto con la cepa 1, también se conservaron las cepas 2, 3 y 4. Para determinar si las levaduras conservadas perdían viabilidad como consecuencia del tiempo de almacenamiento se realizaron recuentos de las colonias aisladas en placa a partir de los liofilizados recién obtenidos así como dos meses después de su obtención, comprobándose el mantenimiento de la viabilidad de manera correcta.

4.8.4. Determinación de compuestos volátiles de los vinos blancos Albariño producidos en bodega en 2006

En las Tablas 16, 17a, 17b, 18a, 18b se muestran los resultados obtenidos del análisis de los compuestos volátiles mayoritarios por inyección directa y de los compuestos volátiles minoritarios con etapas previas de extracción y concentración.

Compuestos volátiles mayoritarios

Los compuestos volátiles forman parte integrante de la complejidad aromática de los vinos, contribuyendo a la misma en mayor o menor medida, o de manera positiva o negativa, en función del compuesto, por lo que se decidió abordar el estudio de la evolución de los compuestos volátiles mayoritarios en los diferentes vinos estudiados, con el objetivo de conocer si existían diferencias debidas a la cepa de levadura. En la Tabla 16 se muestra la concentración de cada compuesto analizado, expresada en mg/L. La misma representa el valor medio obtenido de 3 réplicas experimentales diferentes. Un análisis del comportamiento individual de cada grupo de compuestos

Tabla 16. Compuestos volátiles mayoritarios (dados en mg/L)

Concentración mg/L	Acetaldehido	Metanol	1-Propanol	Isobutanol	2-Metil-1-Butanol	3-Metil-1-Butanol
CEPA 1						
Fermentación	311,4	51,3	48,2	17,8	23,4	108,5
Vino	185,3	32,6	57,0	18,8	24,3	208,7
CEPA 2						
Fermentación	118,5	32,9	70,8	8,9	8,7	115,4
Vino	91,3	47,2	149,2	15,2	24,1	190,7
CEPA 3						
Fermentación	519,3	71,2	30,8	17,1	34,1	83,9
Vino	210,3	56,0	41,6	17,6	22,4	197,5
CEPA 4						
Fermentación	243,5	53,7	33,3	6,4	13,9	82,0
Vino	191,4	44,1	69,8	14,2	17,2	229,5
CONTROL						
Fermentación	252,6	58,7	39,8	12,5	25,8	107,1
Vino	169,2	42,9	62,3	33,7	26,3	194,0

Tabla 17a. Compuestos volátiles minoritarios (dados en mg/L)

Concentración mg/L	Acetato de Isobutilo	Butanoato de Etilo	Acetato de Butilo	Acetato de Isopentilo	Hexanoato de Etilo	Acetato de Hexilo
CEPA 1						
Fermentación	0,58	0,85	0,58	2,53	1,09	0,58
Vino	nd	0,97	0,54	2,28	0,74	0,41
CEPA 2						
Fermentación	0,63	1,11	0,66	2,56	1,35	0,63
Vino	0,65	1,22	0,69	2,84	0,79	0,47
CEPA 3						
Fermentación	0,57	0,71	0,50	1,45	0,84	0,48
Vino	0,59	1,17	0,82	3,64	0,80	0,49

CEPA 4						
Fermentación	nd	0,78	0,55	1,54	0,96	0,61
Vino	nd	1,16	0,85	4,12	0,82	0,51
CONTROL						
Fermentación	0,58	0,72	0,61	1,72	0,85	0,56
Vino	0,65	0,57	0,98	3,71	0,76	0,55

Tabla 17b. Compuestos volátiles minoritarios (dados en mg/L)

Concentración mg/L	Hexanol	Octanoato de Etilo	Decanoato de Etilo	Acido Hexanoico	Acido Octanoico
CEPA 1					
Fermentación	0,37	0,67	0,45	13,40	9,93
Vino	0,13	0,69	0,11	10,59	8,72
CEPA 2					
Fermentación	0,10	0,67	0,29	8,81	10,29
Vino	0,28	0,68	0,28	11,72	10,22
CEPA 3					
Fermentación	0,45	0,79	0,74	11,74	10,37
Vino	0,47	0,64	0,09	14,03	10,81
CEPA 4					
Fermentación	0,75	0,48	0,77	14,14	9,15
Vino	1,45	0,69	0,15	16,02	10,46
CONTROL					
Fermentación	0,98	0,29	0,12	13,92	9,79
Vino	0,50	0,46	0,01	15,54	9,70

Tabla 18a. Compuestos volátiles minoritarios (terpenos libres, dados en mg/L)

Concentración mg/L	α -pineno	β -pineno	Limoneno	Linalool	Terpin-4-ol	α -Terpineol
CEPA 1						
Fermentación	0,057	0,043	0,268	0,132	nd	nd
Vino	0,124	nd	nd	0,283	nd	nd
CEPA 2						
Fermentación	nd	nd	nd	0,156	nd	nd
Vino	nd	nd	nd	0,030	nd	nd
CEPA 3						
Fermentación	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Vino	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CEPA 4						
Fermentación	nd	nd	nd	nd	nd	0,001
Vino	nd	nd	nd	0,01	nd	0,090
CONTROL						
Fermentación	nd	nd	nd	nd	0,062	0,041
Vino	nd	nd	nd	0,006	0,001	0,014

Tabla 18b. Compuestos volátiles minoritarios (terpenos libres y norisoprenoides, dados en mg/L)

Concentración mg/L	Nerol	Geraniol	β -Damascenona	α -ionona	2feniletanol+ β -ionona	Eugenol
CEPA 1						
Fermentación	0,010	0,054	0,146	0,076	6,106	nd
Vino	nd	0,169	0,576	0,212	16,146	nd
CEPA 2						
Fermentación	0,068	0,169	0,027	0,070	6,055	nd
Vino	0,001	0,025	0,035	0,014	4,198	0,008
CEPA 3						
Fermentación	0,021	nd	nd	0,052	0,172	0,003
Vino	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CEPA 4						
Fermentación	0,025	0,007	nd	0,112	0,334	0,003
Vino	nd	0,069	0,039	0,037	2,442	0,017
CONTROL						
Fermentación	nd	0,047	nd	0,107	13,170	0,031
Vino	0,031	0,117	0,033	0,066	0,683	0,166

analizados se describe a continuación: metanol: dependiendo de la concentración en que se encuentre, el metanol puede llegar a ser tóxico, por lo que su presencia en bebidas alcohólicas está limitada por legislación. La concentración presente en todos los vinos fue inferior al límite establecido por la O.I.V (150 mg/L) y osciló entre los 32,6 mg/L para el vino elaborado con la cepa 1 y 56 mg/L para el vino elaborado con la cepa 3. Su presencia proviene de la hidrólisis de las pectinas durante la fermentación (Aleixandre, 1988; Ribéreau-Gayon *et al*, 1980). Alcoholes superiores: 1- propanol, isobutanol, 2 metil-1 butanol y 3 metil-1 butanol se encuentran entre los compuestos que pueden intervenir negativamente en la constitución del aroma final del vino. En los vinos obtenidos con las diferentes cepas se detectaron en un rango comprendido entre 279,2 mg/L para el vino elaborado con la cepa 4 y 379,2 mg/L para el vino elaborado con la cepa 2. Estos valores se encuentran por debajo de 400 g/L, que se considera el umbral a partir del cual estos compuestos pueden aportar aromas desagradables al vino (Mafart, 1989). Los alcoholes isoamílicos 2-y 3-metil-1-butanol, fueron los alcoholes que se encontraron en mayor concentración en todos los vinos y los rangos de concentración obtenidos fueron muy similares a los encontrados por otros autores (Pueyo, 1994; Nicolossi *et al*, 1995; Pozo-Bayón *et al*, 2003, 2004;

Vilanova y Martínez, 2007). No se observaron diferencias relevantes entre las cepas estudiadas.

El contenido de acetaldehído en los vinos estudiados osciló entre 91,3 mg/L para el vino elaborado con la cepa 2 y 210,4 mg/L en el vino elaborado por la cepa 3. Se ha descrito que este compuesto puede aportar rasgos organolépticos negativos a concentraciones superiores a 200 mg/L, siendo el responsable de sabores y olores de oxidación que influyen, tanto en la estabilidad del color de los vinos al combinarse con los polifenoles, como en su estabilidad química y microbiológica, por su alta reactividad con el dióxido de azufre libre. Su producción a cargo de las levaduras está relacionada con la actividad alcohol-deshidrogenasa (Pérez-Coello *et al*, 1995). En el caso de los vinos analizados en este ensayo, el rango de producción fue variable, destacando sobre todo la concentración encontrada en los vinos elaborados con la cepa 3, que se encuentra en el umbral negativo descrito con anterioridad. Comparando las determinaciones realizadas después de la fermentación y en el vino final, este compuesto disminuye en todos los vinos, lo que puede atribuirse a fenómenos de reducción y/o combinación.

Compuestos volátiles minoritarios

En la Tabla 17a y 17b se presentan los resultados obtenidos en el estudio de los compuestos volátiles minoritarios más representativos presentes en los vinos. La mayor parte de estos compuestos son aromas fermentativos producidos por la actividad metabólica de las levaduras. Los ésteres tienen una gran importancia en el aroma, especialmente el butanoato y hexanoato de etilo y el acetato de hexilo. En la bibliografía existen numerosas referencias de cómo estos compuestos pueden contribuir a las notas frutales y florales muy apreciadas en el aroma de los vinos (Noble *et al*, 1980). En los vinos estudiados, la concentración de acetato de hexilo es muy semejante en todos, mientras que los ésteres etílicos de los ácidos grasos tales como butanoato y decanoato la concentración final se encontró muy relacionada con la cepa de levadura utilizada para llevar a cabo la fermentación. La concentración de butanoato de etilo fue desde los 0,572 mg/L encontrados en el vino elaborado con la cepa 3, hasta 1,215 mg/L, valor obtenido para el vino control. En cambio, la concentración de decanoato de etilo varió desde los 0,284 mg/L obtenidos para el vino control hasta los 0,008 mg/L presentes en el vino 3. La concentración de octanoato de etilo fue muy semejante en cada uno de

los vinos estudiados. La concentración de hexanoato de etilo es también muy similar en todos los vinos obtenidos, y se encuentra en el rango descrito por otros autores para vinos semejantes (Zamuz y Vilanova, 2006.).

Las concentraciones de los acetatos de isopentilo y acetato de hexilo en los vinos finales también se encuentran relacionadas con la cepa de levadura utilizada para llevar a cabo la fermentación. En el caso del acetato de isopentilo, que fue el éster que se encontró en mayor cantidad en todos los vinos, la concentración va desde los 2,28 mg/L encontrados en el vino elaborado con la cepa 1 hasta los 4,12 mg/L obtenidos en el caso del vino elaborado con la cepa 4. En el caso del acetato de hexilo, aunque el rango de variación fue más pequeño, el valor menor se encontró también para el vino elaborado con la cepa 1 (0,414 mg/L), mientras que el vino control fue el que presentó una mayor concentración (0,554 mg/L). Tratar de establecer una relación entre la concentración de ésteres encontrada y su repercusión en la calidad aromática final del vino es bastante complejo. Aunque todos estos compuestos aportan como sustancias puras diferentes descriptivos aromáticos individuales (ej: carácter afrutado y fresco relacionado con el octanoato de etilo y el hexanoato de etilo), mezclados en una solución compleja como es el vino, pueden modificar de forma significativamente apreciable el aroma global detectado (Swiegers *et al*, 2005). Ninguno de estos compuestos se encontró en mayor concentración en el vino elaborado con la cepa 1, y algunos ésteres (Tabla 2) presentaron una concentración menor en este vino. Esto indica que si han contribuido en algo en la calidad aromática descrita en el análisis sensorial de este vino, ha sido a nivel de interacción global y no por la aportación individual de cada compuesto.

Los ácidos grasos detectados en las condiciones analíticas utilizadas fueron el hexanoico y el octanoico. La concentración de ácido hexanoico presente en los vinos estuvo relacionada con la cepa de levadura utilizada y osciló entre los 10,59 mg/L obtenidos para el vino elaborado con la cepa 1 hasta los 16 mg/L del vino 4. Estos valores de concentración son más altos que los descritos por Puig-Deu *et al*. (1999) en vinos elaborados con uvas de variedades blancas, pero similares a los encontrados por Pueyo (1994), que publicó concentraciones de ácido hexanoico de hasta 18,7mg/L. El ácido hexanoico suele encontrarse en mayor concentración en vinos procedentes de viñedos no sometidos a sobreexplotación. El umbral de percepción se ha calculado entre los 8 y 9 mg/L. (Lambrechs y Pretorius, 2000). Estos mismos

autores han descrito que su presencia en concentraciones elevadas puede comunicar al vino aromas desagradables a agrio, vinagre, rancio o picante. Precisamente, fue el vino elaborado con la cepa 1 el que presentó una menor concentración de ácido hexanoico, aunque, al igual que para los compuestos anteriores, es extremadamente complejo poder deducir su aportación al aroma global del vino. El ácido octanoico se encontró también en menor concentración en el vino elaborado con la cepa 1. En ninguna de las muestras se ha detectado la γ -butirolactona.

En las Tablas 18a y 18b se representa el contenido de terpenos libres presente en los vinos estudiados. El contenido de los terpenos libres en el vino es considerado principalmente como un factor positivo de la calidad y un componente del aroma primario. Esto es debido a que los terpenos contribuyen al aroma varietal, aportando, entre otros descriptivos, diversas connotaciones positivas, como aromas florales y herbáceos. En los vinos estudiados se identificaron un total de 12 compuestos, que incluyen 10 terpenos y 2 norisoprenoides. De forma general, los vinos presentaron un elevado contenido de terpenos libres, observándose importantes diferencias entre cepas, como se puede deducir del análisis de la composición global de terpenos para cada uno de los vinos: cepa 1 (0,576 mg/L), cepa 2 (0,064 mg/L), control (0,335 mg/L), cepa 3 (nd) y cepa 4 (0,096 mg/L). Esto indica que la cepa de levadura utilizada ha influido significativamente en la concentración de terpenos del vino, a pesar de haber sido elaborados con el mismo mosto. Cabe destacar la elevada concentración de terpenos presentes en el vino elaborado con la cepa 1, que es mucho mayor a la encontrada en el resto de los vinos y que podría estar directamente relacionada con la calidad sensorial del mismo. El linalool fue el monoterpeno más abundante, 0,283 mg/L en el vino elaborado con la cepa 1, en el que presentó niveles similares a los descritos por otros autores para otros vinos (Armada y Falqué, 2007). En el resto de los vinos se encontró una concentración de linalool aproximadamente 10 veces menor. El otro terpeno libre más abundante fue el geraniol, que presentó en el vino 1 una concentración de 0,169 mg/L. Al igual que en caso anterior, la concentración de geraniol en el resto de los vinos fue significativamente menor. Como se comentó anteriormente, los terpenos libres son aromas fundamentalmente promovidos por la variedad de uva. En forma glicosilada (conjugados con un azúcar) no pueden expresar su potencialidad aromática. La presencia de una mayor actividad glicosidasa por parte de la levadura 1 podría explicar la mayor concentración de estos compuestos en forma libre en

los vinos elaborados con esta cepa. Sin embargo, *S. cerevisiae* y otras especies relacionadas no son por lo general buenas productoras de enzimas, aunque es un carácter asociado a cepa que se ha encontrado en diferentes levaduras de fermentación (Villena *et al*, 2007). Otra hipótesis que podría explicar la mayor presencia de terpenos en el vino A con respecto a los otros vinos es que este vino presentó también una mayor concentración de manoproteínas. Las manoproteínas son compuestos derivados de la pared celular de las levaduras que han adquirido una gran relevancia en enología en los últimos años por sus diferentes aplicaciones (Waters *et al*, 1994). Entre ellas se ha descrito la capacidad de estas macromoléculas para retener los compuestos volátiles del vino (Charlier *et al*, 2007). El análisis de la concentración de glicoproteínas de estos vinos, expresado como mg manosa/L de vino, ha permitido comprobar que el vino elaborado con la cepa 1 presenta una concentración mayor de manosa polimérica que el resto de los vinos (dato no presentado). Este resultado ayudaría a soportar la hipótesis de que las manoproteínas pueden estar participando activamente en la retención de algunos compuestos aromáticos del vino, como los terpenos.

Finalmente, la presencia de norisoprenoides es considerado un factor de calidad y típico de cada variedad de uva. Su presencia en el vino se ha relacionado con notas aromáticas de tabaco, fruta y té, y juega un papel importante en el aroma global del vino, porque su umbral de percepción es muy bajo (Rodríguez-Bustamante y Sánchez. 2007). Muchos se derivan de la degradación hidrolítica de los carotenoides. Los norisoprenoides detectados en los vinos (α -ionona y β - damascenona), al igual que en el caso de los terpenos, se encontraron en una concentración más de 10 veces superior en el vino 1 que en el resto de los vinos. De forma similar, podrían estar involucrados en la génesis de los caracteres sensoriales que han permitido destacar los vinos elaborados con la cepa 1 de los otros vinos.

4.8.5. Escalado en bodega durante la vendimia 2007

Preparación del pié de cuba

Para la preparación del pié de cuba se comenzó por determinar, junto con el personal de la Bodega, el conjunto de depósitos que podrían emplearse en

bodega que permitiesen aproximadamente el nivel de reemplazamiento de volumen ensayado en el laboratorio.

Se comenzó por la preparación de un inóculo de la cepa 1, según la metodología descrita en el Apartado 1 de la presente memoria. Se trasladó el inóculo a la bodega, y se inoculó un depósito de 50 L de mosto Albariño, en el que se tomó una muestra cuando entró en fermentación tumultuosa, de la que se aislaron 30 colonias para estudiar su mit-ADN con la metodología descrita en el Apartado 1. Se confirmó su predominancia frente a la microbiota indígena. A continuación se inoculó, con los 50 L anteriores un depósito de 2500 L, y cuando entró en fermentación tumultuosa se tomó una muestra de la que se aislaron 30 colonias y a las que se le estudió el patrón de mit-ADN, comprobando nuevamente que el 100% de las colonias aisladas pertenecían a la cepa 1.

Inoculación y seguimiento de depósito de 30000 L

Con estos 2500 L se inoculó el depósito de 30000 L, del que se tomó una muestra nada más inocular y en fermentación tumultuosa. La cepa 1 inoculada fue la única aislada en los dos casos y en la fermentación que fue seleccionada por la bodega como la productora del Albariño más adecuado al gusto y diseño esperado, con el denominado “sello bodega”, por lo que se dio por concluido el estudio.

4.9. Patentes o equivalentes. Transferencia y divulgación de la experiencia y los resultados

Con el objeto de que el estudio pudiese reportar beneficios no sólo para el CSIC y la Bodega, si no para todo el sector vitivinícola gallego, nacional e internacional, se han realizado no sólo tareas de transferencia, si no también de divulgación.

4.9.1. Patentes

Ha sido seleccionada una levadura ecotípica idónea para la vinificación de mosto Albariño según el criterio de la Bodega. Como modo de proteger la explotación de los resultados obtenidos, el empleo de la levadura para vinificación ha sido patentado de forma conjunta entre el CSIC y la Bodega implicada en el proyecto (**referencia patente P2008015000**), es producida

por un *spin off* del CSIC, la empresa Biópolis S.L., y en la vendimia de 2009 se ha vinificado toda la producción de Albariño de la Bodega (1.000.000 de litros).

Han sido seleccionados 22 clones de la variedad Albariño, a partir de los 115 clones iniciales.

4.9.2. *Divulgación de la experiencia y los resultados*

Por vivir en una sociedad basada en el conocimiento, y dado el interés que los temas de cultura científica tienen para el consumidor en el sentido de que aportan la seguridad como valor de interés para los mismos, a parte de los artículos científicos y de divulgación en revistas especializadas publicados hasta ahora, se ha llevado a cabo una actividad de difusión en medios que ha permitido dar noticia de los conceptos científicos manejados en el estudio y del interés del empleo de los mismos para otras bodegas del sector, gallegas o no. Como resultado del mismo se han iniciado contactos con otras bodegas para realizar estudios a medida de las necesidades de las mismas. Para ello ha sido de mucho interés el haber conseguido una importante presencia en medios, con lo que se ha podido salvaguardar primero el interés de la Bodega implicada, y después plantear que con un esquema de estudio similar se podrían realizar estudios de mejora de la calidad de vinos en otras bodegas.

La Excm. Sra. Carmela Arias, Académica de Honor de la Real Academia Gallega de Ciencias, dijo en su discurso de toma de posesión (Arias, 2000): “Al avance científico se une el tecnológico, cada vez más difícil de diferenciar, puesto que se apoyan mutuamente, en ocasiones desde la raíz misma de los procesos”. Son palabras perfectas para definir el trabajo recogido en este estudio, resultado de la relación sinérgica de los grupos de trabajo tanto de la Bodega Terras Gauda S.A. como del CSCI. Tal vez sea la primera vez que una bodega española reciba un galardón académico-científico de estas características.

AGRADECIMIENTOS

La actividad realizada ha sido financiada, además de por la Bodega Terras Gauda S.A., por la Xunta de Galicia (PGIDIT04TAL035E), y por

el propio CSIC (PIE 2004 7 0E 214), entidades a las que los autores están muy agradecidos. Para la consecución del objetivo de difusión en medios los premiados desean así mismo dar las gracias a la Oficina de Prensa del CSIC y a Dña. María J. Sánchez, de Sánchez Pardo Asociados. Y finalmente agradecer a la Real Academia Gallega de Ciencias la concesión del Premio de Investigación de la convocatoria de premios del año 2009, por el gran honor que éste les supone.

BIBLIOGRAFIA

Abela y Sainz de Andino, E. (1885). El Libro del Viticultor. Ed. Tipografía de Manuel G. Hernández. Madrid. España.

Aldave, L. (1999). El aroma varietal y glicosilado de los mostos y vinos de las variedades Española moscatel de Alejandría, Albariño y Verdejo. Estudio de distintas aplicaciones tecnológicas para obtener vinos más aromáticos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

Aleixandre, J. L. (1988). La calidad aromática de los vinos blancos jóvenes. *Viña y Vino*, 50, 72-78.

Allègre, M., Daire, X., Héloir, M-C., Trouvelot, S., Mercier, L., Adrian, M., Pugin, A. (2006). Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytopathol.*, 173, 832-840.

Arias, C. (2000). Discurso como académico de honor na Real Academia Galega de Ciencias da Excm. Sra. ADN. Carmela Arias y Diaz de Rabago Condesa de FENOSA. *Revista Real Academia Galega de Ciencias Vol. XIX*, 152-157.

Armada, L., Falqué, E. (2007). Repercusión of the clarification treatment agents before the alcoholic fermentation on volatile composition of white wines. *Eur. Food Research and Technology*, 225, 553-558.

Baggiolini, M. (1952). Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Stn. Fed. Essais Agric*, Lausanne.

Bauer, F.F., Pretorius, I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making wine. A review. *South African J. Enol. Viticulture*, 21, 27-51.

Bayonove, C., Cordonnier, R (1971). Recherches sur l'arome du muscat. III Étude de la fraction terpénique. *Annales de Technologie Agricole*, 20, 347-355.

Belancic, A., Agosin, E., Ibacache, A., Bordeu, E., Baumes, R., Razungles, A., Bayonove, C (1997). Influence of sun exposure on the aromatic composition of chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandría and Moscatel rosada. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 181-186.

Bertrand, A. (1981). Formation de substances volatiles au cours de la fermentation alcoolique. Incidence sur la qualité du vin. Reims: Proc. Colloque Société Française Microbiologie.

Boso, S., Santiago, J.L., Martínez, M.C. (2004a). Intravarietal agronomic variability in the cv. albariño (*Vitis vinifera*, L.). *American J. Enol. Vitic.*, 55, 279- 282.

Boso, S., Santiago, J.L., Martínez, M.C. (2004b). Resistance of eight different clones of the grape cultivar Albariño to *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*, 88, 741-744.

Boso, S., Santiago, J.L., Rodríguez, E., Martínez, M.C. (2005a). Primeros resultados de la caracterización de clones de Albariño (*Vitis vinifera* L.) realizada por el CSIC para Bodegas Terras Gauda S.A.. *La Semana Vitivinícola*, 3087, 3430-3434.

Boso, S., Santiago, J.L., Vilanova, M., Martínez, M.C. (2005b). Ampelographic and agronomic characteristics in different clones of cultivar Albariño (*Vitis vinifera* L.). *Bulletin de l'OIV*, 78 (889-890), 143-158.

Boso, S., Alonso-Villaverde, V., Rodríguez, E., Gago, P., Santiago, J.L., Martínez, M.C. (2007a). Characteristics of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Albariño clones resulting from two clonal selection processes. *HortScience*, 42, 97-100.

- Boso, S., Santiago, J.L., Martínez, M.C. (2007b). Influence of rootstock on resistance of *Vitis* cv. Albariño clones to downy mildew. *Europ. J. Hortic. Sci.*, 72, 179-185.
- Boso, S., Santiago, J.L., Martínez, M.C. (2008). The influence of 110 Richter and SO4 rootstocks on the performance of scions of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño. *Spanish J.Agric. Res.*, 6, 96-104.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Visón L.F., Kunkel R.E (1996). Principles and practices of Winemaking. Chapman and Hall, New York, 603.
- Brown, M.V., Moore, J.N., Fenn, P., Mcnew, R.W. (1999). Inheritance of Downy mildew resistance in table grapes. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 124, 262-267.
- Carballeira, L., Cortés, S., Gil, M.L., Fernández, (2001). SPE-GC determination of aromatic compounds in two varieties of white grape during ripening. *Chromatographic supplement* 53, 350-355.
- Carrascosa, A.V., Muñoz, R. y González, R. (2005). Microbiología del vino. AMV Ediciones, Madrid.
- Carrascosa, A.V. (2007a). Los orígenes de la microbiología enológica española. *La Semana Vitivinícola*, 3162, 809-813.
- Carrascosa, A.V. (2007b). El Instituto de Fermentaciones Industriales y los orígenes de la microbiología enológica española. *La Semana Vitivinícola*, 3169, 1371-1375.
- Carrascosa, A.V. (2009). Origen de la microbiología enológica riojana. *Zubía* 27, 221-232.
- Casares, A. (1843). Observaciones sobre el Cultivo de la vid en Galicia. Ed. Imprenta de la Viuda e Hijos de Compañel. Santiago de Compostela. España.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., Gunata, Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry*, 100, 22-30.
- Charoenchai, C., Fleet, G.H., Henschke, P.A., Todd, B.E.N. (1997). Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian J. Grape and Wine Res.*, 3, 2-8.
- Ciani, M. (1997). Role, enological properties and potential use of non-Saccharomyces wine yeast. *Recent Research Develop. Microbiol.*, 1, 317-331.
- Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterisation and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21, 149-155.
- Cordonnier, R., Bayonove, C.(1981). Étude de la phase préfermentaire de la vinification. Extraction et formation des certains composés de la arôme. Cas des terpenols, des aldéhydes et alcools en C6. *Conn. Vigne. Vin* 15, 269-286.
- Cortés, S. (1997). Determinación de monoterpenos, ácidos y azúcares para la optimización de la fecha de vendimia. Tesis de Licenciatura, Universidad de Vigo, Spain.
- Degré, R., Thomas, D.Y., Ash, J., Maihio, T. K., Motin, A., Dubord, C. (1989). Wine yeast strain identification. *Amer. J. Enol. Vitic*, 40, 309-315.

Delcroix, A., Günata, Z., Sapis, J.C., Salmon, J.M., Bayonove, C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking : effect on terpenols content of Muscat wine. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 45,291-296.

Di Stefano, R. (1991). Proposition d'une méthode de préparation de l'échantillon pour la détermination des terpenes libres et glycosides des raisins et des vins. *Bulletin de l'O.I.V.*, 64, 219-223.

Diario Oficial De Las Comunidades Europeas (DOCE), 1990. Métodos Oficiales de Análisis. Acidez total. Método volumétrico con patrón de coloración.

Eichhorn, K.W., Lorenz, D.H. (1977). Pha'nologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Nachrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig)*, 29, 119-120.

Estévez, P., Gil, M.L., Falqué, E. (2004). Effects of seven yeast strains on the volatile composition of Palomino wines. *Inter. J. Food Science & Techn.*, 39, 61-69.

Fernández, E., Cortés, S.M., Castro, M., Gil, M., Gil, M.L (1999). Distribution of free and glycosidically bound mono-terpenes and norisoprenoides in the skin and pulp of Albariño grapes during 1998 maturation. En: Aline Lonvaud Funel(Ed), *Oenologie 99*, 6^o Symposium International d'œnologie. Bordeaux (pp. 161-164). Paris : TECDOC.

Fernández-Crespo, D. (1897). *Cartilla Vitícola*. Imprenta Antonio Villamaría. Lugo. España.

Flanzy, C.(2000) *Enología Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. AMV Ed.-Mundi Prensa, Madrid, Spain.

Fleet G.H., Heard G.M. (1993). Yeast growth during fermentation. In: Fleet G.H., Ed., *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 27-55.

Galet, P. (1995). *Précis de pathologie viticole*, 2^o ed., Imp. JF, Montpellier.

Galet, P. (2000). *Précis de viticulture.*, 7^o ed., Imp. JF, Montpellier.

García de los Salmones, N. (1908). *Organización del Servicio Agrícola Provincial de la Diputación Foral de Navarra*. Pamplona. España.

García de los Salmones, N. (1915). *Apuntes de Viticultura y Enología*. Ed. Imprenta librería y encuadernación de N. Aramburu. Pamplona. España.

Gil, M. (2000). *Influencia del sistema de conducción sobre la composición de la uva Albariño*. Tesis de licenciatura, Universidad de Vigo, Spain.

Gil, J.V., Mateo, J.J., Jiménez, M., Pastor, A., Huerta, T. (1996). Aroma compounds in wine as influenced by apiculata yeasts. *J. Food Sci.*, 61, 1247-1266.

Gómez, E., Martínez, A., Laencina, J. (1994) Localization of free and bound aromatic compounds among skin, juice and pulp fractions of some grapes varieties. *Vitis* 33, 1-4

Günata, Y.Z., Bayonove, C., Baumes, R., Cordonnier, R. (1985a) The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fraction of some grape aroma components. *J. Chromatography*, 331,83-90.

Günata, Y.Z., Bayonove, C., Baumes, R., Cordonnier, R. (1985b) The aroma of grapes. Localization and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv. Muscat during maturation of the fruit. *J.Sci.f.Food Agric.* 36, 857-862.

- Heard G.M., Fleet G.H. (1985). Growth of natural yeast flora during fermentation of inoculated wines. *Applied Environ. Microbiol.*, 50, 727-728.
- Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martín-Álvarez, M., Cabezado, D. (1990). The influence of the yeast and type for culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Amer J. Enol. Vitic.*, 41, 313-318.
- Huetz de Lemps, A. (1967). *Vignobles et Vins du Nord-Ouest de L'Espagne*. Tomos I-II. Institut de Géographie. Faculté des lettres. Bordeaux. Francia.
- Iñigo, B., Bravo, F. (1977). Estudio de mostos y vinos de Galicia. *A.T.A.* 17(2), 268-276.
- Jackson, D.I., Lombard, P.B (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality-A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(4), 409-430.
- Labrada, J.L. (1804). *Descripción económica del Reyno de Galicia*. Imprenta de Don Lorenzo José Riesgo Montero. Ferrol. España.
- Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. A review. *South African J. Enol. Vitic.*, 21, 97-129.
- Li, H. (1993). Studies on the resistance of grapevine to powdery mildew. *Plant Pathol.*, 42, 792-796.
- López-Tamames, E., Carro-Mariño, N., Günata, Y.Z., Sapis, C., Bausmes, R., Bayonove, C., (1997). Potential aroma in several varieties of Spanish grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1729-1735.
- Loureiro, M.D., Martínez, M. C., Boursiquot, J.M., This, P.(1998). Molecular marker analysis of *Vitis vinifera* Albariño in some similar grapevine cultivars. *Journal of the Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 123, 842-848.
- Mafart, P. (1989). Influence de la flore de fermentation sur la flaveur des vins et sélection des souches. *Revue des Oenologues*, 12, 25-28.
- Marais, J.S (1983). Terpenes in the aroma of grapes and wines : A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 4(2), 49-60.
- Marais, J.S., Van Wyck, C.J (1986). Effect of grape maturity and juice treatments on terpene concentrations and wine quality of *V. vinifera* L. cv. Weisser Riesling and Bukettraube. *South African Journal of Enology and viticulture*, 7(1), 26-34.
- Martínez, M.C. (2002). *El Albariño. Ilustraciones sobre la variedad Albariño (Vitis vinifera L.)*. Servicio Publicaciones Diputación Provincial de Pontevedra, Vigo (ISBN: 84-8457-098-3; Dep.Legal: VG-205-2002).
- Martínez, M. C., Mantilla, J.L.G. (1993). Descripción y comparación ampelográfica de cepas de *Vitis vinifera* L., cv. Albariño adultas (procedentes de estaquillado de cepas viejas), de propagación in vitro y de semilla, cuando tienen un año. *Vitis*, 32, 245-246.
- Martínez, M.C., Mantilla, J.L.G. (1994a). Estudio ampelográfico de cepas de *Vitis vinifera* L., cv. Albariño procedentes de micropropagación in vitro, en comparación con plantas de semilla y adultas de dos años y no sometidas a poda. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales*, 9, 201-211.

- Martínez, M.C., Mantilla, J.L.G. (1994b). Comparative study of juvenility resulting from in vitro propagated *Vitis vinifera* L., cv. Albariño vines when subjected to different pruning systems. J. Intern. Sci. de la Vigne et du Vin, 28, 111-130.
- Martínez, M.C., Mantilla, J.L.G., Loureiro, M.D. (1994). Descripción ampelográfica sobre hoja adulta de cepas de *Vitis vinifera* L. denominadas Albariño. Viticultura y Enología Profesional, 34, 30-40.
- Martínez, M.C., Grenan, S. (1999). A graphic reconstruction method of an average leaf of vine. Agronomie, 19, 491-507.
- Martínez, M.C., Boso, S., Santiago, J.L. (2005). Los clones de Albariño (*Vitis vinifera* L.) seleccionados en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Departamento de Publicaciones del CSIC, Biblioteca de Ciencias, Nº 19. Madrid. España.
- Martínez, M.C., Boso, S., Santiago, J.L. (2006). La colección de variedades de vid de la Misión Biológica de Galicia (CSIC). Interés científico e industrial. Agricultura, Revista Agropecuaria, 886, 510-512.
- McMahon, H., Zoecklein, B.W., Fugelsang, K., Jasinky, Y. (1999). Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. J. Industrial Microbiol. Biotech., 23, 198-203.
- Mateo, J.J., Di Stefano, R. (1997). Description of the β -glucosidase activity of wine yeasts. Food Microbiology, 14, 583-591.
- Melero, R. (1992). Fermentación contralada y selección de levaduras vínicas. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 32, 371-379.
- Nicolosi, C., Cataldi, M. C., Campisi, S. (1995). La componente aromática di uno spumante champenois prodotto da uve Nerello Mascalese. Ind. Bevande., 24, 247.
- Nurgel, C., Erten, H., Canbas, A., Cabaroglu, T., Selli, S. (2003). Fermentative aroma in wines from *Vitis vinifera* cv. Kalecik Karasi in relation with inoculation with selected dry yeasts. J. Intern. Sci. de la Vigne et du Vin, 3, 155-161.
- Noble, C.A., Flath, A.R., Forrey, R. (1980). Wine headspace analysis. Reproducibility and application to varietal classification. J. Agric. Food Chem., 28, 346-353.
- Office International de la Vigne et du Vin (OIV). (1983). Code des caractères descriptifs des variétés et espèces de *Vitis*. Ed. Dedon, Paris, France.
- Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV). (2007). 2nde Ed. de la Liste des Descripteurs OIV pour les Variétés et Espèces de *Vitis*. http://news.reseauconcept.net/images/oiv/client/Code_descripteurs_2ed_FR.p df. [Consulta 7-Abril-2008].
- Pacottet, P. (1928). Viticultura. Enciclopedia Agrícola (2º Edición). Ed. Salvat. Barcelona. España.
- Pérez, J. L. (1992). Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Perez-Coello, M. S., Gonzalez-Viñas, M. A. (1995). Nuevas tendencias en el análisis de los vinos por cromatografía de gases. C. T. A., 16, 39-45.
- Peynaud, E., Blouin, J. (1996). In : Le gout du vin. Le grand livre de la dégustation (3rd ed) Paris : Dunod.

- Pozo-Bayón, M. A. (2002). Influencia de distintas variables tecnológicas en la composición volátil y fenólica y en las características espumantes de vinos espumosos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pozo-Bayón, M. A., Polo, M. C., Martín-Alvarez, P. J., Pueyo, E. (2004). Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar parellada. *Food Chemistry*, 86, 416-419.
- Pozo-Bayón, M. A., Pueyo, E., Martín-Alvarez, P. J., Martínez-Rodríguez, A., Polo, M. C. (2003). Influence of yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 54, 273-278.
- Pueyo, E. (1994). Identificación, origen y modificaciones de los compuestos que influyen sobre las características espumantes de los vinos Cava. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.
- Puig-Deu, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Torre-Boronat, M. C. (1999). Quality of base and sparkling wines as influenced by type of fining agent added prefermentation. *Food Chemistry*, 66, 35-42.
- Quecedo, C.R., Somavilla, J.F., Arroyo, V., Iñigo, B. (1976). Agentes de fermentación de mosto de uva de la zona de Galicia. *A.T.A.*, 16, 123-129.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeasts. *Applied Environ. Microbiol.* 58, 2948-2953.
- Razungles, A., Günata, Z., Pinatel, S., Baumes, R., Bayonove, C. (1993). Étude quantitative de composés terpéniques, norisoprénoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sciences des Aliments*, 13, 59-72.
- Razungles, A., Baumes, R., Dufour, C., Sznaper, C., Bayonove, C (1998). Effect of sun exposure on carotenoid and C13-norisoprenid glycosides in Syrah berries (*Vitis Vinifera L.*) *Science des Aliments*, 18, 361-373.
- Riberéau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudrau, P. (1980). Componentes volátiles y odoríferos. *Ciencias y Técnicas del vino*. Tomo 1. Ed. Hemisferio sur, 617.
- Riberéau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2000). *Handbook of enology*. Vol 1. The Microbiology of wine and vinifications. Wiley & Sons. England.
- Regodón, J. A., Pérez, F., Valdés, M.E., de Miguel, C., Ramírez, M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol.*, 14, 247-254.
- Rodríguez-Bustamante, E., Sanchez, S. (2007). Microbial production of C-13-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. *Critical Reviews in Microbiology*, 3, 211-230.
- Rodríguez-Navas, M. (1904). *Ampelografía moderna o tratado acerca de la vid*. Libro primero: La vid. Ed. Baillo-Bailliere e hijos. Madrid. España.
- Romano, P., Caruso, M., Capece, A., Lipani, G., Paraggio, M., Fiore, C. (2003). Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneous fermented grape musts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 311-315.
- Rosi, I., Vinnella, M., Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeast of enological origin. *J. Applied Bacteriol.*, 77, 519-527.

- SAS Institute Inc. (2000). SAS OnlineDoc, version 8. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape and Wine Resear.*, 11, 139-173.
- This, P., Jung, A., Boccacci, P., Borrego, J., Botta, R., Constantini, L., Crespan, M., Dangl, G.S., Eisenhald, C., Ferreira-Monteiro, F., Grando, S., Ibáñez, J., Lacombe, T., Laucou, V., Magalhaes, R., Meredith, C.P., Milan, N., Peterlunger, E., Regner, F., Zulini, L., Maul, E. (2004). Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 1448-1458.
- Ugliano, M.J., Bartowsky, E., Maccharty, J., Moio, L., Henschke, P. (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* Yeast Strains. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6322-6331.
- Versini, G., Orriols, I., Dalla Serra, A. (1994). Aroma components of Galician Albariño, Loureira and Godello wines. *Vitis*, 33, 165-170.
- Vilanova, M., Martínez, C. (2007). First study of determination of aromatic compounds of red wine from *Vitis vinifera* cv. Castañal grown in Galicia (NW Spain). *Eur. Food Research Technol.*, 224, 431-436.
- Vilanova, M., Masneuf-Pomarède, I. (2005). Characterization of yeast strains from Rías Baixas (NW Spain) and their contribution to the fermentation of Albariño wine. *Ann. Microb.*, 55, 23-26.
- Vilanova, M., Sieiro, C. (2006). Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. *J. Industrial Microbiol. Biotech.*, 33 (11), 929-933.
- Vilanova, M., Vilariño, F. (2006). Influence of geographic origin on aromatic descriptors of Spanish Albariño wine. *Flavour Fragr. J.* 21: 373-378.
- Villena, M.A., Iranzo, J.F.U., Perez, A.I.B. (2007). Beta-Glucosidase activity in wine yeasts: application in enology. *Enzyme Microbiology Tech.*, 40, 420-425.
- Wang, Ch., Li, O. (2004). Study on the relationships between genetic resistance to powdery mildew in grapevine. XXVIII Congreso Mundial de la Viña y el Vino. 2ª asamblea general de la OIV, Viena (Austria). 4-7 Julio 2004.
- Waters, E.J., Pellerin, P., Brillouet, J.M. (1994). A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, 23, 185-191.
- Zamuz, S., Vilanova, M. (2006). Volatile composition of the *Vitis vinifera* Albariño musts according to geographic areas from Rias Baixas DO (Spain). *Italian J. Food Sci.*, 3, 323-328.