



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO HORMONAL Y LA CALIDAD  
FENÓLICA DE LA UVA (CVS. TEMPRANILLO Y GRACIANO) EN  
CONDICIONES DE RIEGO DEFICITARIO*

*MARÍA NICULCEA*

*PAMPLONA 2013*





Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO HORMONAL Y LA CALIDAD FENÓLICA DE LA UVA (CVS.  
TEMPRANILLO Y GRACIANO) EN CONDICIONES DE RIEGO DEFICITARIO*

Memoria presentada por D<sup>a</sup> María Niculcea para aspirar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas por la Universidad de Navarra

Fdo. María Niculcea

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Grupo de Fisiología del Estrés en Plantas (Departamento de Biología Ambiental), Unidad Asociada al CSIC, EEAD, Zaragoza e ICVV, Logroño, Facultades de Ciencias y Farmacia y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> DIRECTOR

Dra M<sup>a</sup> Carmen Antolín Bellver

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> DIRECTOR

Dr. Manuel Sánchez-Díaz



*Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de diversas entidades:*

*Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (beca predoctoral, 2009-2013)*

*Fundación Universitaria de Navarra (PIUNA 2011)*

*Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN BFU2011-26989)*



*A Teodora y Jorge,*

*gracias.*





## AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Mari Carmen Antolín Bellver por aceptarme y guiarme durante el largo camino de esta tesis doctoral. Por su valiosa dirección, por sus conocimientos sin ningún tipo de limitación, por sus consejos y por su disposición durante todo el desarrollo de la tesis.

Al codirector de esta tesis Dr. Manuel Sánchez-Díaz por haberme permitido integrarme en el Departamento, por el apoyo recibido durante este periodo, por transmitirme sus conocimientos, y no en último lugar, por preocuparse siempre de mi familia.

A los doctores, Jone Aguirreolea, Juan José Irigoyen, Fermín Morales, Nieves Goicoechea, Inmaculada Pascual y Gorka Erice por sus consejos, atención y ayuda amable.

A los doctores Belén Ayestarán Iturbe (Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja y CSIC) y Aurelio Gómez-Cadenas (Departamento de Ciencias Experimentales, Universitat Jaume I, Castellón) y a sus respectivos grupos de trabajo, por su colaboración en los análisis realizados en sus departamentos y por su ayuda en la discusión de los resultados.

A los técnicos del departamento: Amadeo Urdiain, Mónica Oyárzun y Laura González, por su labor en los invernaderos y en los laboratorios. A Carmentxu, por su cariño, paciencia y por estar siempre y acompañarme en los buenos y malos momentos durante todos estos años.

A mis compañeros de trabajo, Álvaro, Carolina, Johan, María Laura, María Fernanda, Marouane, Tefide, Urtzi y especialmente a Javier y Sandra por la colaboración y la amistad.

A mi hija Teodora y a mi marido Jorge por ser mi mayor apoyo en este largo viaje que llevamos haciendo desde hace mucho tiempo y por estar siempre a mi lado.

A mis padres, hermanos, abuela, cuñados y sobrinos por el amor, apoyo y comprensión.

A mi nueva familia adquirida en España, simplemente GRACIAS.

A mi amiga Ana por haberle conocido. A Alba y Luis y a su hija Ibón, por la gran amistad que nos une desde hace tantos años. A mis amigos de Huesca, que sin ellos no habría emprendido este camino, Cristina, Joaquín y Javier por todo el apoyo, consejos y sobre todo por la amistad, y a los de Pamplona, Natacha, Enrique y Carlos por la calurosa acogida.

Y a todas aquellas personas que, aunque no están nombradas explícitamente aquí, han formado parte de mi vida profesional o personal hasta este momento.

GRACIAS A TODOS

## ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico

ANOVA: Análisis de la varianza

CH: Contenido hídrico

CHR: Contenido hídrico relativo

DAA: días después de la antesis (*days after anthesis*)

DEEMM: Dietil etoximetilén malonato

DI: Riego deficitario (*deficit irrigation*)

ED: Riego deficitario pre-envero (*early deficit*)

E-L: Escala de estados fenológicos en vid de Eichhorn y Lorenz

GPC: Cromatografía de permeación en gel (*Gel Permeation Chromatography*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (*High-Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (*HPLC-Diode-Array Detection*)

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada con espectrometría de masas (*HPLC-Mass Spectrometry*)

IAA: Ácido indol-3-acético

JA: Ácido jasmónico

LD: Riego deficitario post-envero (*late deficit*)

MeJA: Ácido metil jasmónico

MF: Materia fresca

MS: Materia seca

MT: Materia turgente

OPA: *o*-ftaldialdehído

$\Psi$ : Potencial hídrico

$\Psi_{pd}$ : Potencial hídrico al amanecer

PAL: Fenilalanina amonio liasa

PC: Capacidad de la maceta (*pot capacity*)

PPFD: Radiación fotosintéticamente activa (*photosynthetic photon flux density*)

PRD: Desecamiento parcial de las raíces (*partial root-zone drying*)

RDI: Riego deficitario regulado (*regulated deficit irrigation*)

SA: Ácido salicílico

SDI: Déficit hídrico sostenido (*sustained deficit irrigation*)

SE: Error estándar

STS: Estilbeno sintasa

UV-Vis: Ultravioleta- visible

WUE: Eficiencia en el uso del agua (*water use efficiency*)

***INDICE***

---



1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
<b>1.1. El ciclo de la vid .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Fenología .....	3
1.1.2. Ciclo vegetativo .....	5
1.1.3. Maduración de la uva .....	8
<b>1.2. Composición de la uva .....</b>	<b>10</b>
1.2.1. Metabolitos primarios .....	10
1.2.1.1. Azúcares .....	10
1.2.1.2. Ácidos orgánicos .....	11
1.2.1.3. Compuestos nitrogenados .....	12
1.2.1.4. Polisacáridos .....	16
1.2.2. Metabolitos secundarios .....	16
1.2.2.1. Fenoles simples .....	18
1.2.2.2. Flavonoides .....	18
1.2.2.3. Estilbenos .....	22
<b>1.3. El riego en la vid .....</b>	<b>24</b>
1.3.1. Concepto de riego deficitario .....	25
1.3.1.1. Riego deficitario regulado y Déficit hídrico sostenido.....	26
1.3.1.2. Desecamiento parcial de las raíces .....	26
1.3.2. Respuestas fisiológicas y agronómicas al riego deficitario .....	27
1.3.3. Respuestas de los diferentes genotipos .....	28
1.3.4. Efectos del déficit hídrico sobre la baya .....	29
1.3.4.1. Crecimiento de la baya .....	30
1.3.4.2. Composición y calidad de la uva .....	31
<b>1.4. Balance hormonal en la vid .....</b>	<b>33</b>
1.4.1. Efectos del déficit hídrico sobre el balance hormonal .....	33
1.4.2. Papel de las hormonas en la maduración de la baya .....	34
<b>1.5. Planteamiento del estudio .....</b>	<b>37</b>
<b>1.6. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>39</b>
2. OBJETIVOS .....	57

3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	61
<b>3.1. Material vegetal .....</b>	<b>63</b>
3.1.1. Cultivares de <i>Vitis vinifera</i> L. ....	63
3.1.2. Obtención de esquejes fructíferos .....	64
3.1.3. Desarrollo de las plantas .....	66
<b>3.2. Diseño experimental .....</b>	<b>70</b>
3.2.1. Tratamientos .....	70
3.2.2. Control del estado hídrico del suelo .....	72
3.2.3. Determinaciones fisiológicas .....	74
<b>3.3. Medidas de estado hídrico en la planta .....</b>	<b>76</b>
3.3.1. Potencial hídrico foliar .....	76
3.3.2. Contenido hídrico relativo .....	77
<b>3.4. Caracterización de la baya .....</b>	<b>78</b>
3.4.1. Tamaño de la baya .....	78
3.4.2. Volumen de la baya .....	78
3.4.3. Contenido hídrico de la baya .....	78
<b>3.5. Análisis de la composición de la uva .....</b>	<b>79</b>
3.5.1. Preparación de extractos .....	79
3.5.2. Análisis de compuestos fenólicos .....	79
3.5.2.1. Análisis por HPLC .....	79
3.5.2.2. Análisis por espectrofotometría .....	81
3.5.3. Análisis de compuestos nitrogenados .....	81
<b>3.6. Cuantificación de hormonas en bayas .....</b>	<b>83</b>
3.6.1. Procedimiento de extracción y purificación .....	83
3.6.2. Separación y cuantificación de hormonas .....	84
<b>3.7. Parámetros de calidad de la uva .....</b>	<b>85</b>
<b>3.8. Parámetros de crecimiento y producción .....</b>	<b>86</b>
3.8.1. Producción de materia seca .....	86
3.8.2. Determinación del área foliar .....	86
3.8.3. Componentes de la producción .....	86
<b>3.9. Tratamiento estadístico .....</b>	<b>87</b>
<b>3.10. Referencias metodológicas .....</b>	<b>88</b>



4. CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOSITION OF <i>Vitis vinifera</i> L CV. TEMPRANILLO AND GRACIANO SUBJECTED TO DEFICIT IRRIGATION DURING BERRY DEVELOPMENT .....	91
5. EFFECTS OF WATER DEFICIT IRRIGATION ON HORMONAL CONTENT AND NITROGEN COMPOUNDS IN DEVELOPING BERRIES OF <i>Vitis vinifera</i> L. CV. TEMPRANILLO .....	121
6. INVOLVEMENT OF BERRY HORMONAL CONTENT IN THE RESPONSE TO PRE-AND POST-VERAISON WATER DEFICIT IN DIFFERENT GRAPEVINE ( <i>Vitis vinifera</i> L.) CULTIVARS .....	165
7. DISCUSIÓN GENERAL .....	205
8. CONCLUSIONES .....	215



## ***1. INTRODUCCIÓN GENERAL***

---



## **1.1. EL CICLO DE LA VID**

### **1.1.1. Fenología**

Baggiolini (1952) dividió el ciclo anual de la vid en diez estadios de referencia y Baillod y Baggiolini lo completaron en 1993 hasta dieciséis fases, desde la yema de invierno hasta la caída de las hojas (Figura 1.).

- A. Yema de invierno: yema del año precedente, casi recubierta por las escamas protectoras.
- B. Yema de algodón: se separan las escamas de la yema que comienza a hincharse. La borra queda muy visible.
- C. Punta verde: la yema continúa hinchándose y alargándose, presenta una punta verde constituida por la extremidad del joven brote.
- D. Salida de hojas: aparición de hojas rudimentarias en roseta. Su base está todavía protegida por la borra, progresivamente desplazada fuera de las escamas.
- E. Hojas extendidas: primeras hojas totalmente abiertas, presentan los caracteres varietales. Pequeño pámpano netamente visible.
- F. Racimos visibles: aparecen inflorescencias rudimentarias en la extremidad del brote, seguidas de cuatro a seis pequeñas hojas.
- G. Racimos separados: los racimos se espacian a lo largo del brote, pero sus órganos florales continúan aglomerados.
- H. Botones florales separados: los botones florales se presentan netamente aislados. Es la aparición de la forma típica de la inflorescencia.
- I. Plena floración: los capuchones de las flores se desprenden por la base y caen, dejando visibles los estambres y el pistilo.

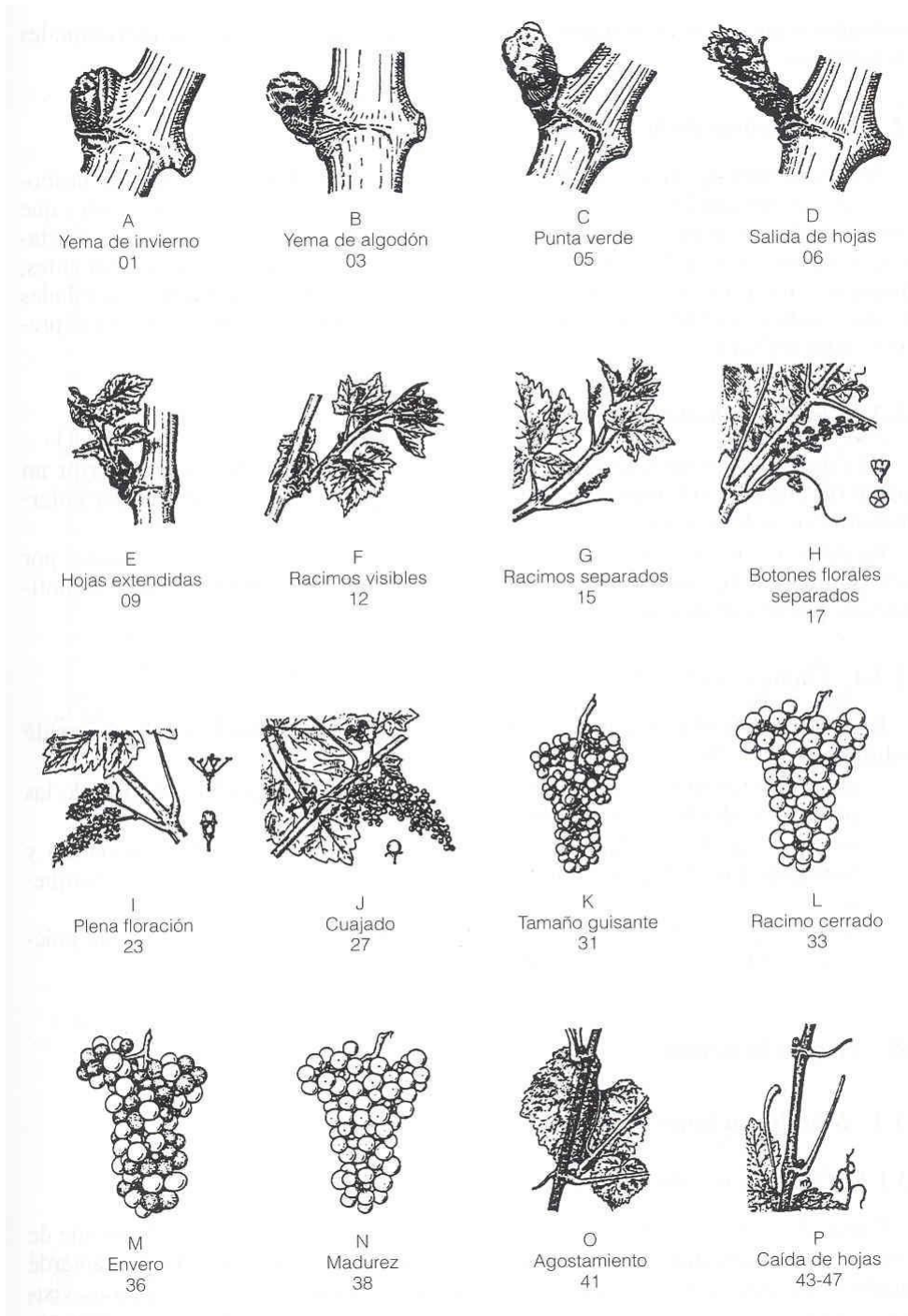


Figura 1. Estadios fenológicos de la vid (Baillod y Baggiolini 1993) (adaptado de Keller 2010).

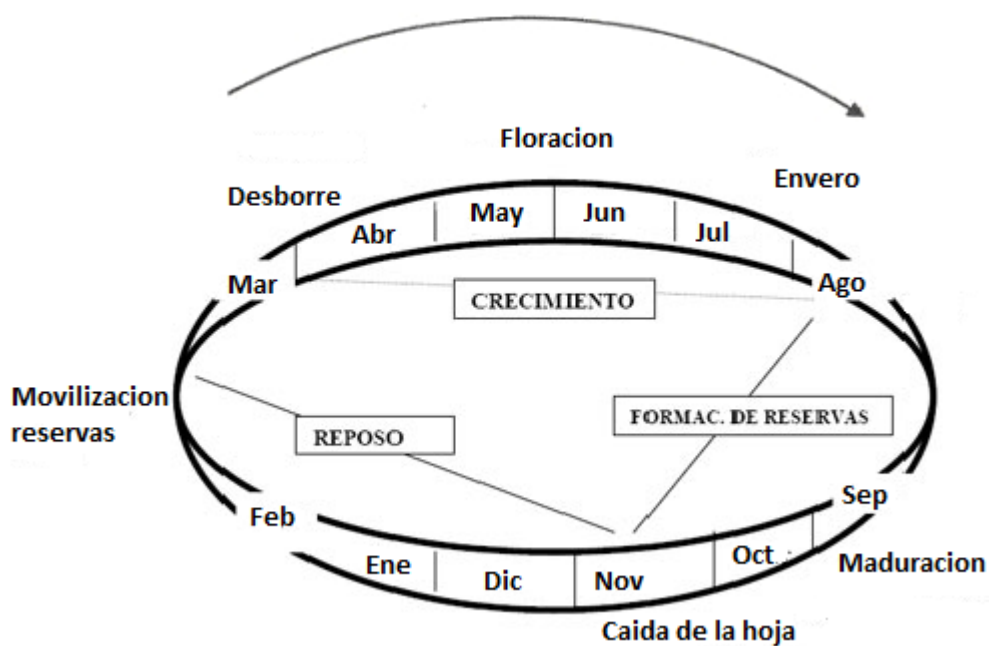
- J. Cuajado: después de la fecundación el ovario comienza a engrosar. Los estambres marchitos pueden, a menudo, permanecer durante un cierto tiempo.

- K. Tamaño guisante: las bayas alcanzan la talla de un guisante. El raquis queda visible. El racimo coge la forma típica del cultivar.
- L. Racimo cerrado: las bayas empiezan a tocarse y el racimo tiende a cerrarse progresivamente. Cierre lento o más rápido o incluso incompleto para algunos cultivares.
- M. Envero: las bayas empiezan a cambiar de color según el cultivar. Primera fase de maduración. En variedades coloreadas, el final del envero se alcanza cuando todas las bayas están rojizas.
- N. Madurez: las bayas alcanzan su máximo desarrollo. El aumento de los azúcares y la disminución de la acidez se estabilizan.
- O. Agostamiento: los sarmientos principales cogen un aspecto leñoso y parduzco (este fenómeno se inicia en la floración y se completa después de la cosecha).
- P. Caída de hojas: las hojas amarillean, oscurecen y caen progresivamente.

### **1.1.2. Ciclo vegetativo**

En la vid existen cambios morfológicos que ocurren anualmente en un orden cronológico y que permiten dividir el ciclo anual en diferentes fases (Figura 2). Tras el reposo invernal aparece una exudación a nivel de las heridas de poda denominada “lloro” que representa el inicio de la actividad radicular así como la movilización de las reservas de la planta. La cantidad de líquido depende de factores tales como el patrón, la edad de la cepa y la velocidad de recalentamiento, y puede durar de unos días a unas semanas (Martínez de Toda 1991, Hidalgo 1993, Reynier 2005).

Las yemas latentes empiezan a desborrar cuando la temperatura se sitúa alrededor de 10°C (Reynier 2005, Salazar y Melgarejo 2005). El desborre constituye la primera manifestación visible de crecimiento donde comienza el alargamiento de los brotes (pámpanos) que da lugar a la aparición de las primeras hojas seguido de la aparición de los entrenudos, inflorescencias y yemas. Su formación y diferenciación se denomina “organogénesis” y se produce en el extremo apical del pámpano. La diferenciación de nudos y entrenudos de la base del pámpano tiene lugar en el ciclo anterior, durante la formación de la yema.



**Figura 2.** Ciclo vegetativo y reproductor anual de la vid (adaptado de Salazar y Melgarejo 2005).

Las raíces inician su crecimiento anual al comienzo del crecimiento de los brotes, con un máximo en el momento del cuajado. Una segunda fase de crecimiento radicular ocurre tras la vendimia.

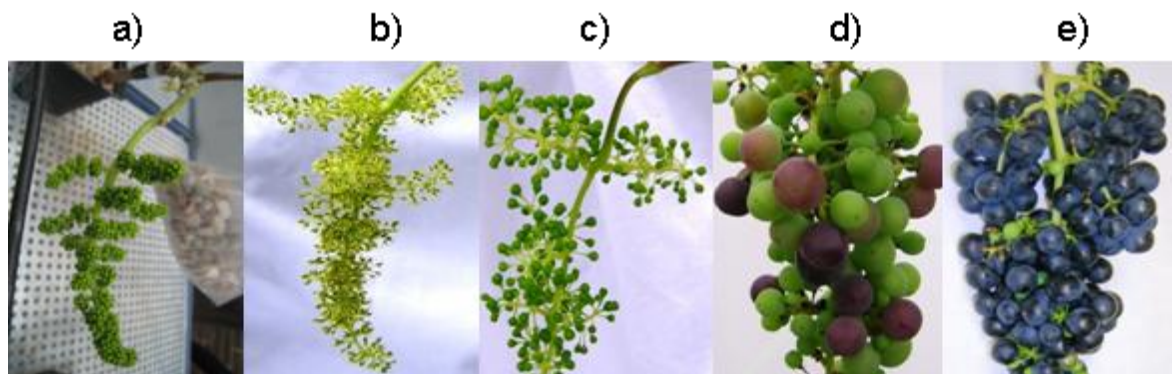
Al final de la primavera o comienzo del verano, cuando las temperaturas medias superan los 15 o 16°C se produce la floración. La polinización en la vid puede ser llevada a cabo por insectos, por el viento o bien por autopolinización. La fertilidad de las yemas aumenta según el vigor de la madera, el tipo de abonado o de portainjerto. La transformación de la flor en fruto



se denomina “cuajado” y se calcula como el porcentaje de flores que se transforman en bayas (Martínez de Toda 1991, Reynier 2005).

El desarrollo de la baya empieza con la polinización y continúa hasta el final de la maduración (Figura 3). Tiene su origen y es consecuencia de la acción y estímulo hormonal triple de la polinización, la fecundación y la formación de semillas así como del aporte de nutrientes de la planta. Se distinguen tres periodos (Reynier 2005):

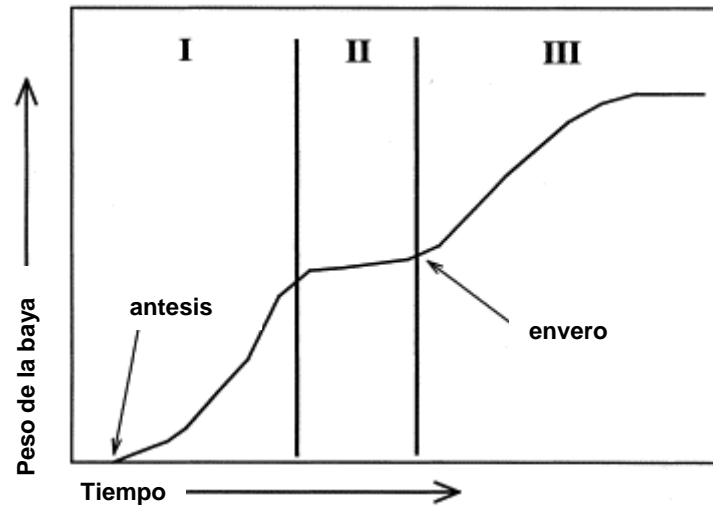
- Periodo herbáceo: durante el cual la baya, verde y dura crece y se comporta como un órgano clorofílico en crecimiento.
- Periodo de maduración: durante el cual la baya cambia de color, alcanza su máximo tamaño y se comporta como un sumidero de azúcares.
- Periodo de sobremaduración: durante el cual la uva se pasifica.



**Figura 3.** Fases del desarrollo del fruto en *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo. a) Botones florales separados, b) Floración, c) Cuajado, d) Envero, e) Maduración.

El crecimiento de la baya depende del equilibrio entre el desarrollo de los órganos vegetativos y el de los racimos (Salazar y Melgarejo 2005). Su crecimiento muestra una curva de doble sigmoide característica de las bayas (Coombe y McCarthy 2000); en la fase I, se inicia un crecimiento rápido y se produce inmediatamente después del cuajado. Se debe al aumento del número de células y la expansión de las ya existentes. La división celular en el pericarpio se

completa entre los 30 y 40 días tras el cuajado. La fase III de crecimiento se da tras una fase de reposo (fase II), coincidente con el envero (inicio de la maduración) (Figura 4). El desarrollo en esta fase se debe al crecimiento, y no a la multiplicación de las células del pericarpio.



**Figura 4.** Curva de desarrollo del peso de la baya. I, II y III se refiere a las tres fases de crecimiento de la baya (adaptado de Kennedy y col. 2000).

En las últimas fases del desarrollo comienza el proceso de “agostamiento” de los pámpanos en el que se producen modificaciones anatómicas y bioquímicas (acumulación de lignina y de sustancias de reserva), que aseguran la supervivencia invernal. El agostamiento permite la perennidad de la planta y su multiplicación y concluye con la caída de las hojas y la entrada de la planta en la fase de reposo.

### 1.1.3. Maduración de la uva

El envero es el inicio de la maduración de la uva y se inicia tras un periodo de crecimiento herbáceo en la baya. En el envero se inician los cambios que acabarán con la maduración, desaparece la clorofila y la baya se hace más elástica. Se inicia la síntesis de compuestos polifenólicos y se produce una desorganización de las células de la pulpa por rotura de las



## **1.2. COMPOSICIÓN DE LA UVA**

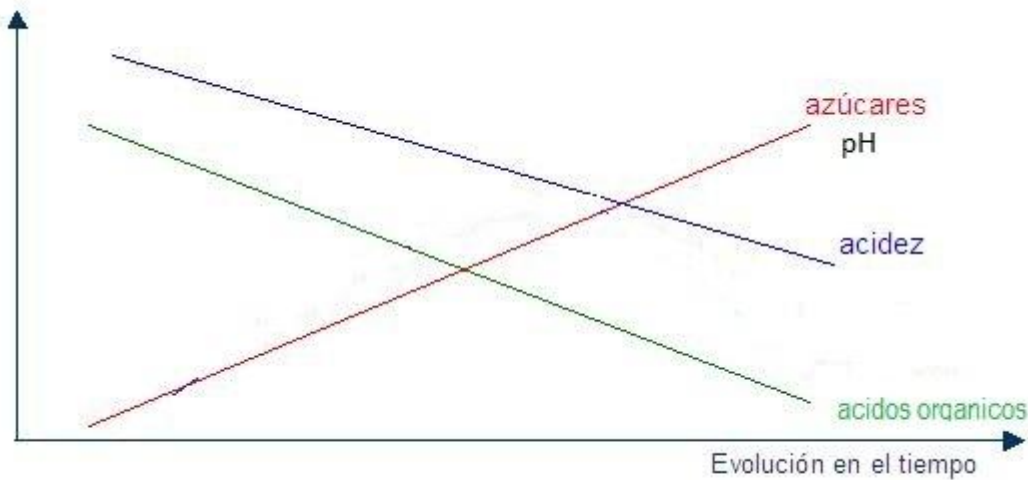
La calidad de la vid, como ocurre con la mayoría de las plantas, depende principalmente de sus metabolitos. El metabolismo vegetal se divide en dos tipos: metabolismo primario y secundario, a partir de los cuales se derivan compuestos con funciones completamente diferentes dentro de la planta (revisado por Ali y col. 2010).

### **1.2.1. Metabolitos primarios**

El metabolismo primario participa directamente en el crecimiento, desarrollo y reproducción de las especies vegetales. Las vías asociadas a este metabolismo dan lugar a los siguientes compuestos: azúcares, sustancias nitrogenadas (aminas y aminoácidos), polisacáridos y ácidos orgánicos.

#### *1.2.1.1. Azúcares*

Durante la maduración, la concentración de los azúcares aumenta, mientras que la de los ácidos orgánicos disminuye a medida que lo hace la acidez y el pH del pericarpio aumenta (Figura 6). Los azúcares de la uva son principalmente, glucosa y fructosa, y puede considerarse que durante el crecimiento de las bayas predomina la glucosa; en la maduración las proporciones de glucosa y fructosa son similares y en uvas sobremaduradas la fructosa es el principal azúcar. La cantidad de azúcares en las bayas puede verse afectada por el tipo de cultivar, la madurez y la salud de las bayas (Crippen y Morrison 1986), así como por las condiciones ambientales durante la maduración (Reynier 2005). Además, las altas concentraciones de azúcares pueden incrementar los compuestos volátiles y aromáticos.



**Figura 6.** Evolución de distintos metabolitos primarios durante la maduración de la uva (tomado de Mullins y col. 1992)

#### 1.2.1.2. Ácidos orgánicos

En la uva, la composición de ácidos orgánicos es muy importante, ya que influye de forma notable en las propiedades organolépticas del mosto, en su control microbiológico y constituye un parámetro crítico en la estabilización del vino. Los ácidos principales de la uva son: tartárico, málico, cítrico, ascórbico y fosfórico, con cantidades mínimas de otros. Los ácidos tartárico y málico constituyen más del 90% del total, siendo el tartárico el ácido específico de la uva. Se sintetiza y acumula en los primeros estadios del fruto y el descenso de concentración en la maduración se explica casi totalmente por el crecimiento del volumen total de la baya, aumentando la dilución. Se diferencia del ácido málico en que puede salificarse fácilmente, con potasio o calcio. El ácido málico se encuentra libre, casi no salificado y su concentración depende de las condiciones de cultivo, aumenta con el vigor de la planta y disminuye con temperaturas elevadas.

### *1.2.1.3. Compuestos nitrogenados*

El nitrógeno es el segundo componente más abundante en el vino tras los azúcares, y dado su papel como nutriente para las levaduras, el contenido en nitrógeno es el factor metabólico más determinante en la tasa de fermentación del vino (Treeby y col. 1998, Herbert y col. 2005). Las sustancias nitrogenadas de la uva están presentes principalmente en el hollejo y las pepitas, mientras que la pulpa es relativamente pobre en nitrógeno. El nitrógeno de la uva se encuentra en forma mineral (nitrógeno amoniacal) y en diferentes formas orgánicas, entre las que destacan aminoácidos, aminas, péptidos y proteínas. El contenido de nitrógeno total de la baya en la madurez depende de la variedad, del patrón, de las condiciones ambientales y de cultivo y en particular, de la fertilización nitrogenada (Bell y Henschke 2005).

En la madurez de la uva, la pulpa contiene el doble de sustancias nitrogenadas que en el envero. A partir de esta etapa, la concentración de amonio decrece ligeramente, mientras que la fracción de nitrógeno orgánico aumenta. Entre el envero y la vendimia, el amonio se transforma en aminoácidos que, a su vez, forman oligopéptidos y proteínas. Al final, la pulpa y por lo tanto el mosto, contiene el 20-30% del nitrógeno total de la baya, repartiéndose el resto entre las pepitas y el hollejo. Las pepitas maduran fisiológicamente antes que el fruto, al cual le ceden el 15-20% del nitrógeno.

#### *Aminas*

Las aminas son bases nitrogenadas de bajo peso molecular que se forman durante los diversos procesos metabólicos en todos los organismos vivos, procedentes de la descarboxilación de los aminoácidos (Figura 7) (Brink y col. 1990). El estudio de las aminas es relevante porque abundan en alimentos derivados de procesos fermentativos, como es el caso del vino. En este contexto, las aminas se forman durante la fermentación maloláctica, aunque

también las levaduras pueden sintetizar aminas durante la fermentación alcohólica (Herbert y col. 2005). Por lo tanto, una elevada concentración de aminas como histamina, tiramina y feniletilamina en el vino puede ocasionar alteraciones en la salud humana (Ancín-Azpilicueta y col. 2008).

### Aminoácidos

Los aminoácidos presentes en la uva constituyen una importante fuente de nitrógeno asimilable para las levaduras que los utilizan como fuente de nitrógeno durante la fermentación alcohólica. Los aminoácidos forman parte de enzimas y proteínas, pero también pueden ser metabolizados a lactonas, alcoholes superiores, aldehídos, fenoles y ácidos orgánicos. Los aminoácidos suponen el 30-40% del nitrógeno total del vino y contribuyen en gran medida al aroma, sabor y apariencia del mismo (Hernández-Orte y col. 2003). Los aminoácidos más abundantes en la uva son la arginina y la prolina incrementándose su contenido de 2 a 6 veces durante la maduración (Stines y col. 2000). La acumulación de aminoácidos tiene lugar en el pericarpio y en las semillas.

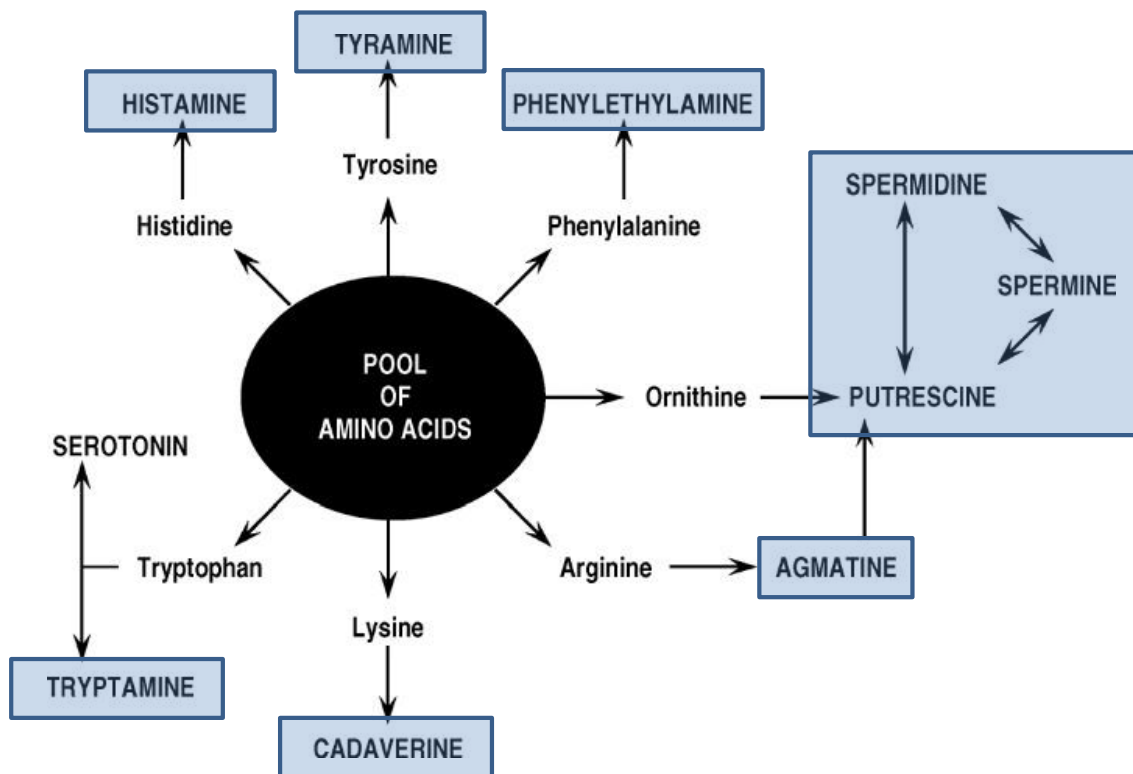


Figura 7. Biosíntesis de aminas (tomado de Ancín-Azpilicueta y col. 2008).

La glutamina representa casi el 50 % de la totalidad de aminoácidos, seguido de la arginina (6-44%), y de otros aminoácidos como alanina, ácido glutámico,  $\alpha$ -aminobutírico, prolina, serina o treonina. La glutamina es la forma mayoritaria en que se transporta el nitrógeno por el floema hacia la baya. Una vez allí, la glutamina puede actuar como precursor para la biosíntesis de otros aminoácidos como la arginina y la prolina, vía glutamato (Figura 8). La arginina, a su vez, es precursora de otros aminoácidos como la ornitina, ácido aspártico y ácido glutámico. El ácido aspártico constituye una forma de reserva de ácido oxalacético, el cual según las necesidades puede ser transformado en azúcares o en ácido málico a lo largo de la maduración. El contenido de aminoácidos libres aumenta cuando se aproxima el momento de la maduración debido al descenso de la síntesis de proteínas; además se observa una acentuada subida de la concentración de prolina una o dos semanas antes de la vendimia. No obstante, la concentración de prolina fluctúa mucho de un año a otro en función de las



condiciones del cultivo, mientras que la de arginina permanece más estable (Bell y Henschke 2005).

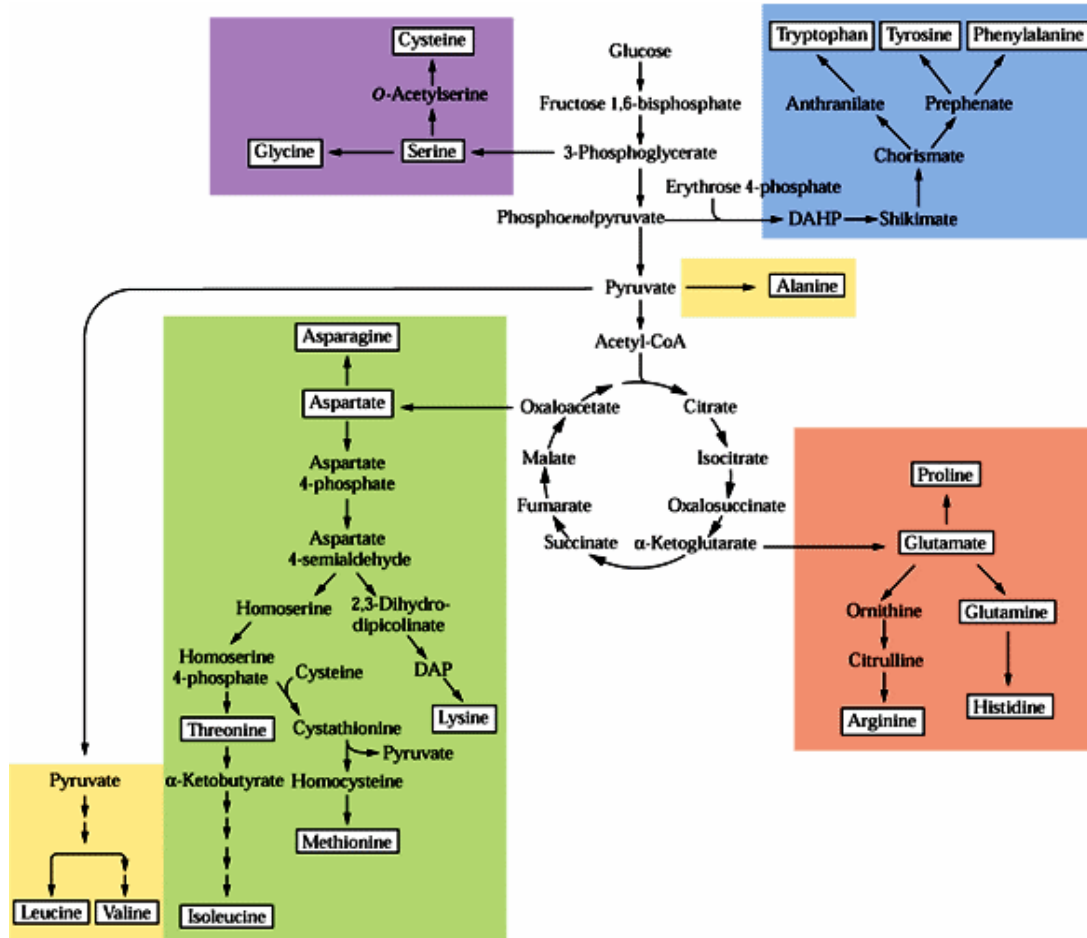


Figura 8. Biosíntesis de aminoácidos (tomado de Buchanan y col. 2000)

La concentración de aminoácidos de la uva depende de numerosos factores como son la fertilización, las condiciones climáticas y la duración de la maceración del hollejo en el mosto (Etiévant y col. 1988, Bell y Henschke 2005).

#### **1.2.1.4. Polisacáridos**

Los polisacáridos son biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuadran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales. Los polisacáridos del vino se originan en las paredes celulares primarias de las bayas y de los microorganismos que actúan durante la vinificación. Los principales polisacáridos procedentes de las bayas son complejos proteína-arabinano y proteína-arabinogalactano, homogalaturanos ramnogalacturonanos; por otra parte, los polisacáridos que proceden de las levaduras son mananos y manano-proteínas. Los polisacáridos de la uva juegan un papel muy importante en las propiedades tecnológicas y de calidad del vino. Se consideran como coloides protectores que pueden modificar algunos procesos durante la vinificación como son la cristalización de tartrato (Gerbaud y col. 1997), la retención de compuestos aromáticos (Chalier y col. 2005), la estabilización del color (Escot y col. 2001) o la agregación y precipitación de taninos (Guadalupe y col. 2007).

#### **1.2.2. Metabolitos secundarios**

El metabolismo secundario sintetiza una gran variedad de compuestos que participan en importantes funciones ecológicas en las plantas como son la respuesta contra depredadores, parásitos y enfermedades, las reacciones de competencia entre especies, y forman también componentes que facilitan los procesos de reproducción (pigmentos, aromas, etc.).

En la vid, los compuestos fenólicos (genéricamente llamados polifenoles) constituyen un grupo grande y complejo de metabolitos que determinan en gran medida ciertas características de la uva y del vino, como son la apariencia, el sabor, la astringencia y el aroma (Adams 2006). Además contribuyen a la pigmentación de diferentes órganos y juegan un papel

relevante contra diferentes tipos de factor de estrés biótico y abiótico. Los compuestos fenólicos se encuentran en el fruto (hollejo y semillas) y en el tallo, y en el vino, aparecen también como productos del metabolismo de las levaduras. Los tres grupos principales de compuestos fenólicos presentes en la uva son los fenoles simples, los flavonoides y los estilbenos (Figura 9).

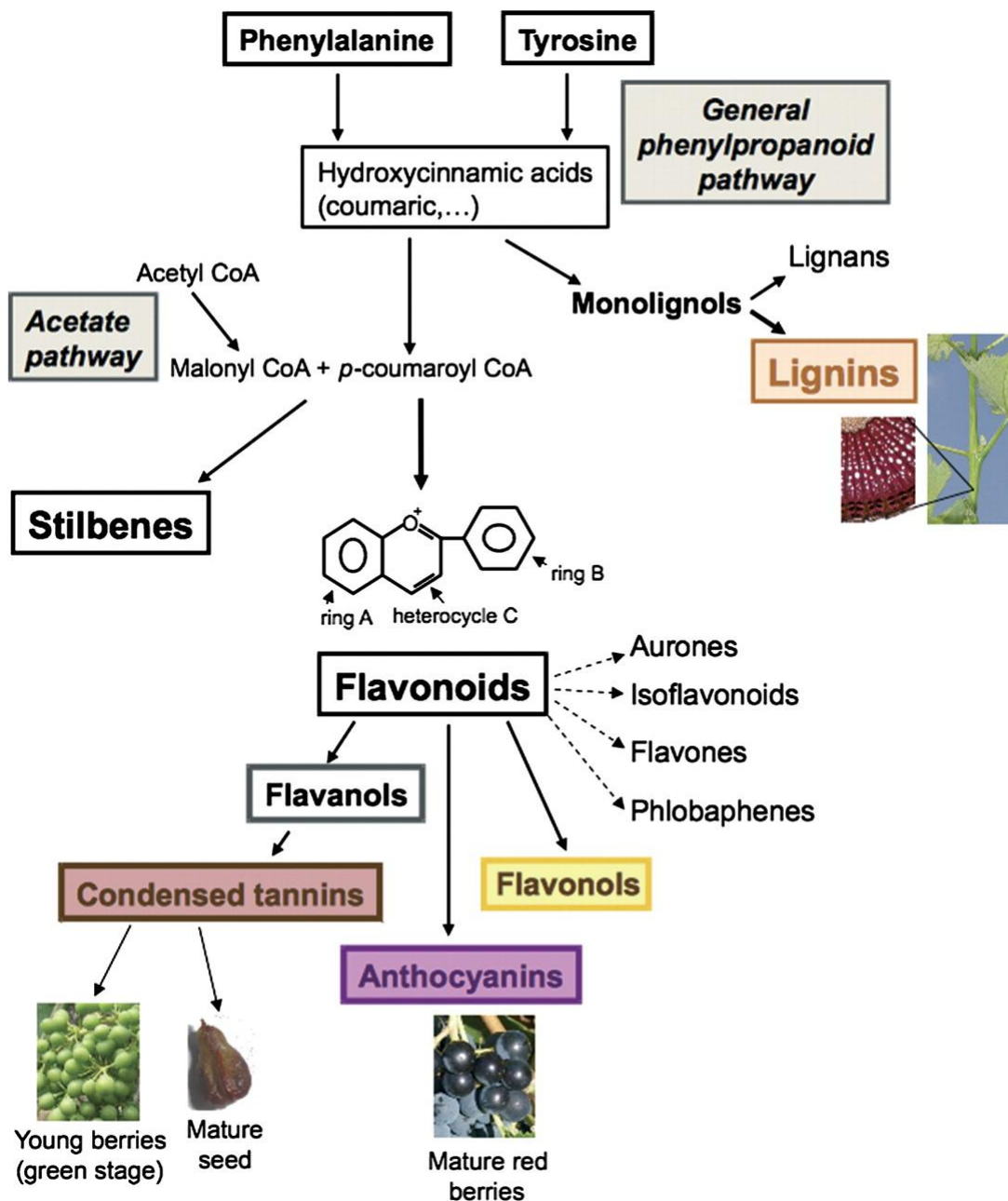


Figura 9. Ruta general de la biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas (tomado de Hichri y col. 2011).

### 1.2.2.1. Fenoles simples

Los fenoles simples se sintetizan a partir de la fenilalanina y son derivados de los ácidos hidroxinámicos e hidroxibenzoicos (Figura 10). Los ácidos hidroxicinámicos constituyen, por su abundancia, el tercer tipo de compuestos fenólicos en la uva, donde suelen aparecer en forma de ésteres (hidroxicinamatos). Están presentes en las vacuolas de las células del hollejo junto con taninos y antocianinas y de la pulpa. Los ácidos hidroxicinámicos más abundantes son el ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinapínico, ácidos *cis* y *trans*-caftárico y ácido cutárico, siendo los ácidos *cis* y *trans*-caftárico los que predominan en bayas maduras.

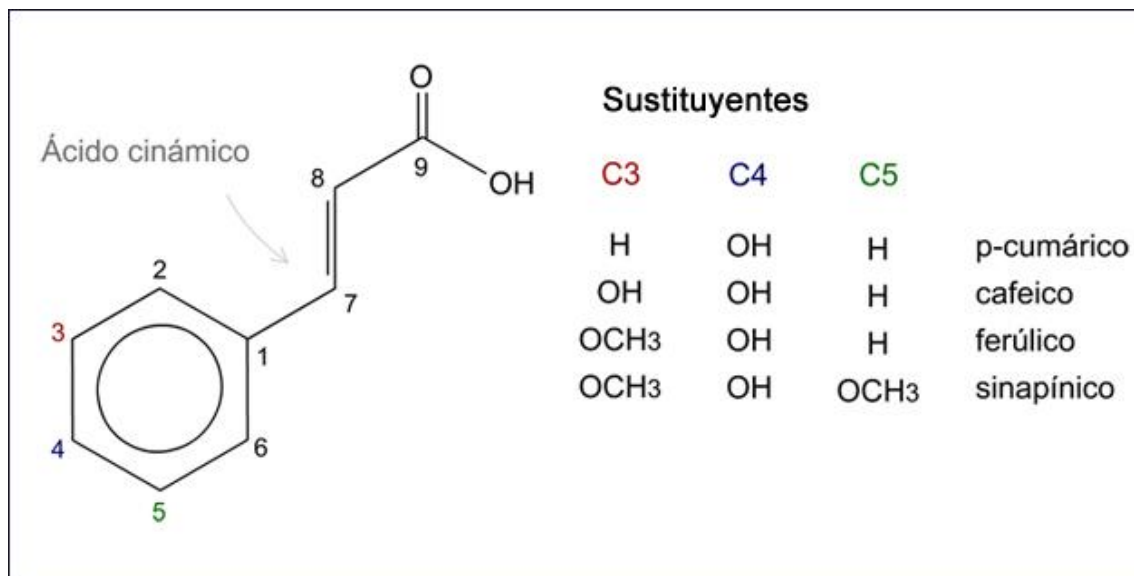


Figura 10. Estructura química de algunos ácidos hidroxicinámicos presentes en la uva.

### 1.2.2.2. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos responsables en gran manera de la calidad de la uva y el vino. El color, aroma y sabor del vino tinto están estrechamente relacionados con el contenido en antocianinas, flavonoles y proantocianidinas (o taninos condensados) de la uva

(Kennedy y col. 2001, Downey y col. 2006). Además, estos últimos años, los flavonoides han concentrado gran atención debido a sus potenciales efectos saludables (Aron y Kennedy 2008). Los flavonoides se encuentran principalmente en el hollejo y las semillas. Se dividen en diferentes familias o subgrupos como son: flavonas, flavonoles, dihidroflavonoles, flavanoles (flavan-3-oles), antocianidinas y proantocianidinas. Todos estos compuestos presentan estructuras similares con el mismo esqueleto básico pero con diferentes estados de oxidación del anillo de pirano central y se sintetizan a partir de la vía de los fenilpropanoides (Vogt 2010) (Figura 11).

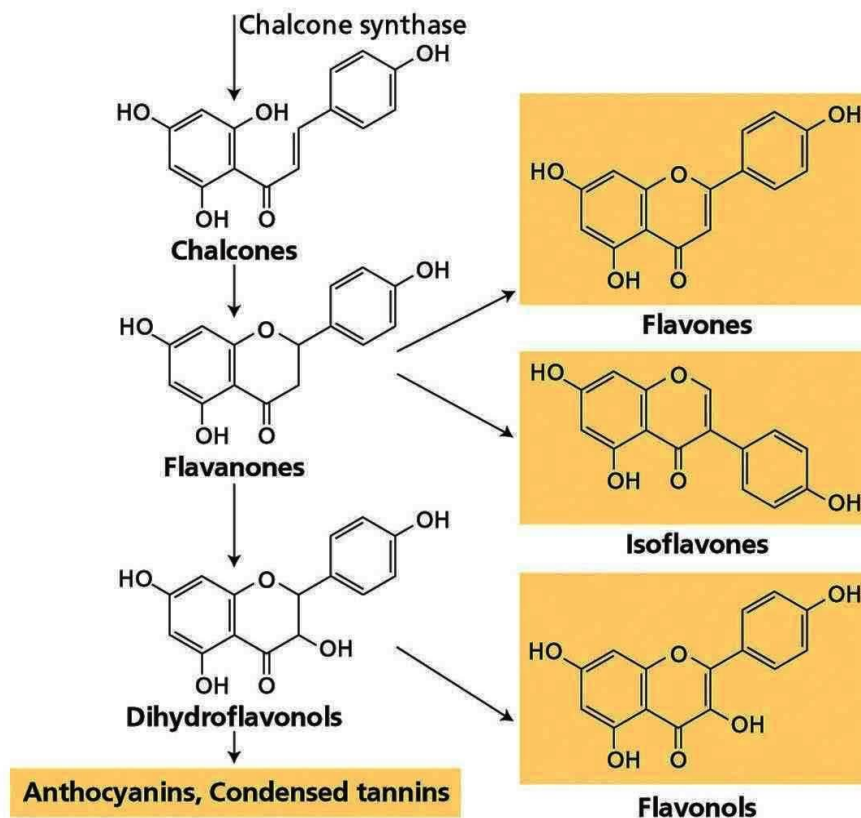


Figura 11. Estructura química general de los flavonoides.

### Antocianinas

Las antocianinas son los pigmentos responsables del color rojo-rosado de la uva y se localizan en el hollejo, en las tres o cuatro primeras capas de células a partir del enviro. Son derivados glicosidados y sus correspondientes agliconas se denominan “antocianidinas”

(Andersen 2008). En *Vitis vinifera* las principales antocianinas son 3-O-monoglucósidos, en los que la glucosa puede estar unida al ácido acético (antocianinas acetiladas), o al ácido *p*-cumárico (antocianinas cumariladas). Las antocianinas más comunes son 3-O-monoglucósidos de delphinidina, petunidina, peonidina, cianidina y malvidina (Figura 12).

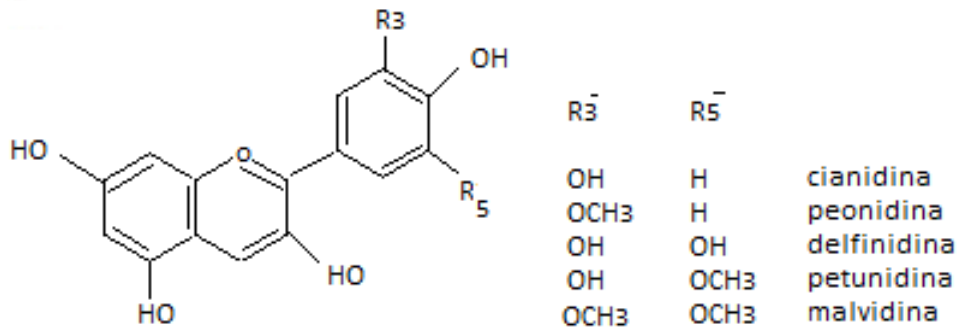


Figura 12. Estructura química de las antocianinas.

El contenido y la composición de antocianinas de la uva determinan en gran medida la calidad del vino porque cada uno de los componentes individuales aporta diferentes características a la estabilización del color. Esta composición depende de diversos factores ambientales como son el nivel de nitrógeno (Hilbert y col. 2003) y de otros nutrientes (Yokotsuka y col. 1999), el aclareo de racimos (Guidoni y col. 2002) o el estado hídrico de la cepa (Esteban y col. 2001).

### Flavonoles

Los flavonoles se localizan en el hollejo de uvas tintas y blancas y actúan como protectores contra la radiación ultravioleta porque son capaces de eliminar los radicales libres (Downey y col. 2003b). Aunque no tienen color, los flavonoles contribuyen al color del vino porque actúan como copigmentos junto con las antocianinas (Boulton 2001). Su estructura química general se ilustra en la figura 13. En la uva, los flavonoles se encuentran en forma de

3-O-glucósidos de quercetina, miricetina, kaempferol, isohamnetina, laricitrina y siringetina (Mattivi y col. 2006, Talcott y Lee 2002).

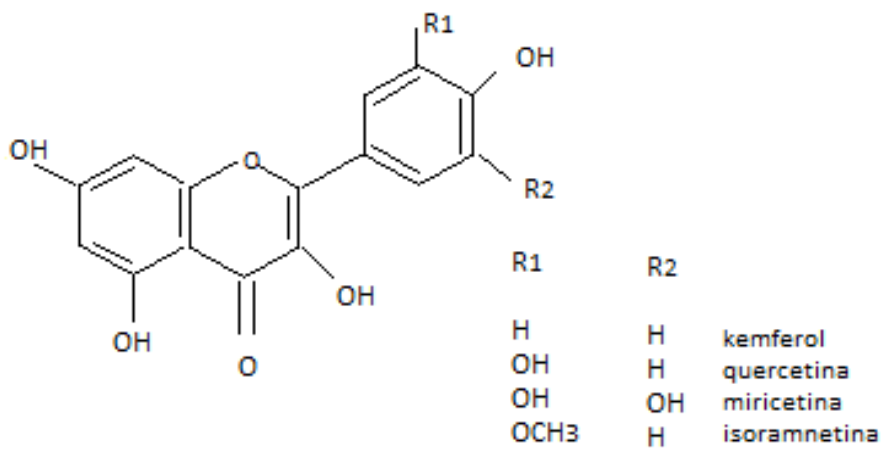


Figura 13. Estructura química de los flavonoles.

### Flavonoles

Los flavonoles (flavan-3-oles) conforman la clase más abundante de flavonoides de la uva e incluyen monómeros, oligómeros y polímeros (también denominados proantocianidinas o taninos condensados). Se encuentran en los tres compartimientos de la baya, es decir, en el hollejo, la pulpa y las semillas (Kennedy y col. 2001, Aron y Kennedy 2008). Las unidades de flavan-3-oles están formadas por catequina, epicatequina, epicatequina-3-O-galato y epigallocatequina (Figura 14). Estos compuestos se acumulan en las etapas tempranas del desarrollo de la uva y durante la maduración su concentración en el hollejo va descendiendo (Downey y col. 2003a). Los taninos presentes en la uva juegan un papel esencial en la calidad y conservación de los vinos, al conferirles propiedades de astringencia, color y estructura (Waterhouse 2002).

Las proantocianidinas (o taninos condensados) se sintetizan en la antesis (Bogs y col. 2005) pero su acumulación y organización se modifica durante el proceso de maduración tanto en las semillas (Kennedy y col. 2000) como en el hollejo (Gagné y col. 2006). La síntesis de

proantocianidinas tiene lugar en el citoplasma y después se acumulan en la vacuola. Posteriormente, la polimerización ocurre en las paredes celulares, lo cual mantiene la integridad y estructura del hollejo (Huang y col. 2005). Las proantocianidinas del hollejo ejercen bastante influencia durante el proceso de vinificación porque son los compuestos que primero se liberan al mosto (Adams 2006).

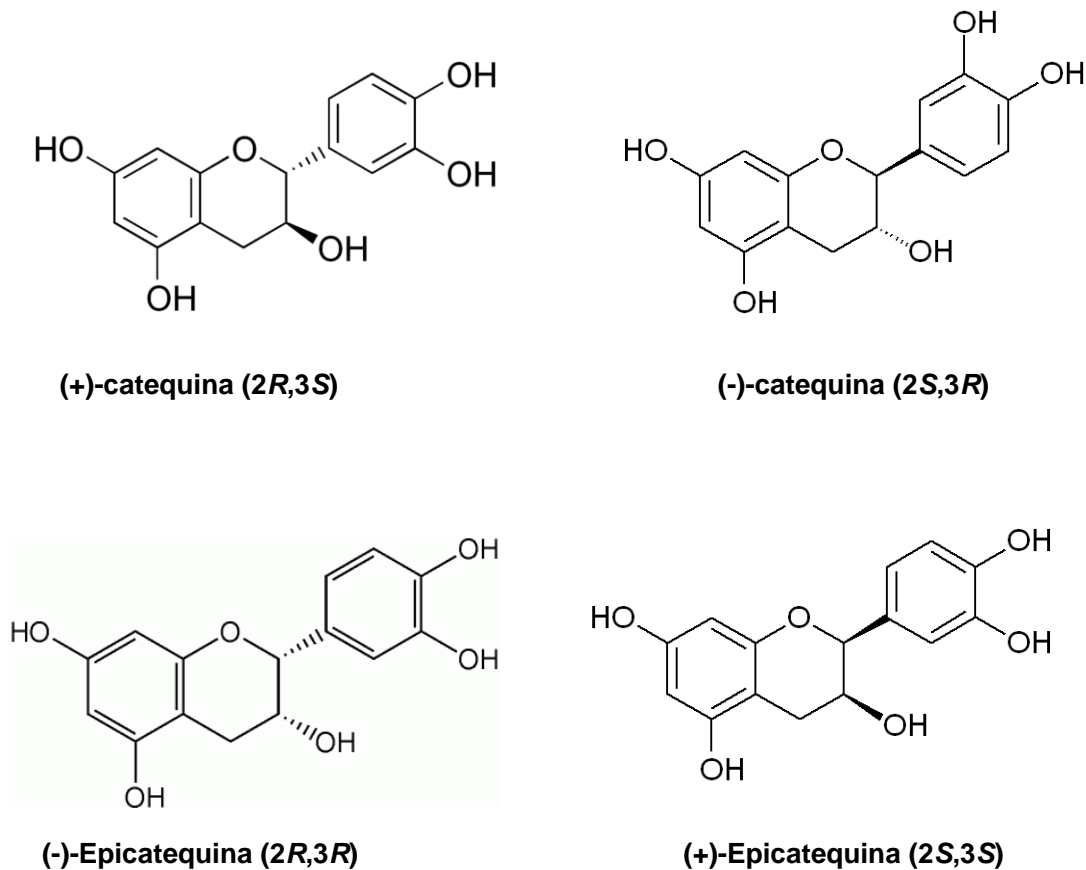


Figura 14. Estructura química de los principales flavanoles.

### 1.2.2.3. Estilbenos

Los estilbenos constituyen un grupo de sustancias no flavonoides que se sintetizan de forma natural en muchas especies vegetales, incluida *Vitis vinifera* L. a través de la ruta de los fenilpropanoides y de la vía acetato-malonato (Gatto y col. 2008). Entre los estilbenos, el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno, Figura 15) ha sido identificado como el compuesto más



activo de este grupo (Bavaresco y col. 2008) al que, además, se le han atribuidos diversos beneficios para la salud humana (revisado en Pervaiz 2003 y Das y col. 2010). El resveratrol se localiza en el hollejo y las semillas, y se extrae fundamentalmente durante la fermentación de vinos tintos, aunque también se encuentra, en niveles más bajos, en vinos blancos.

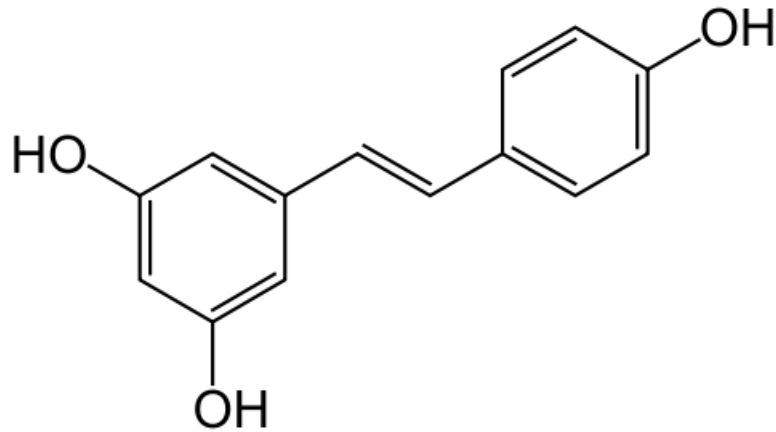
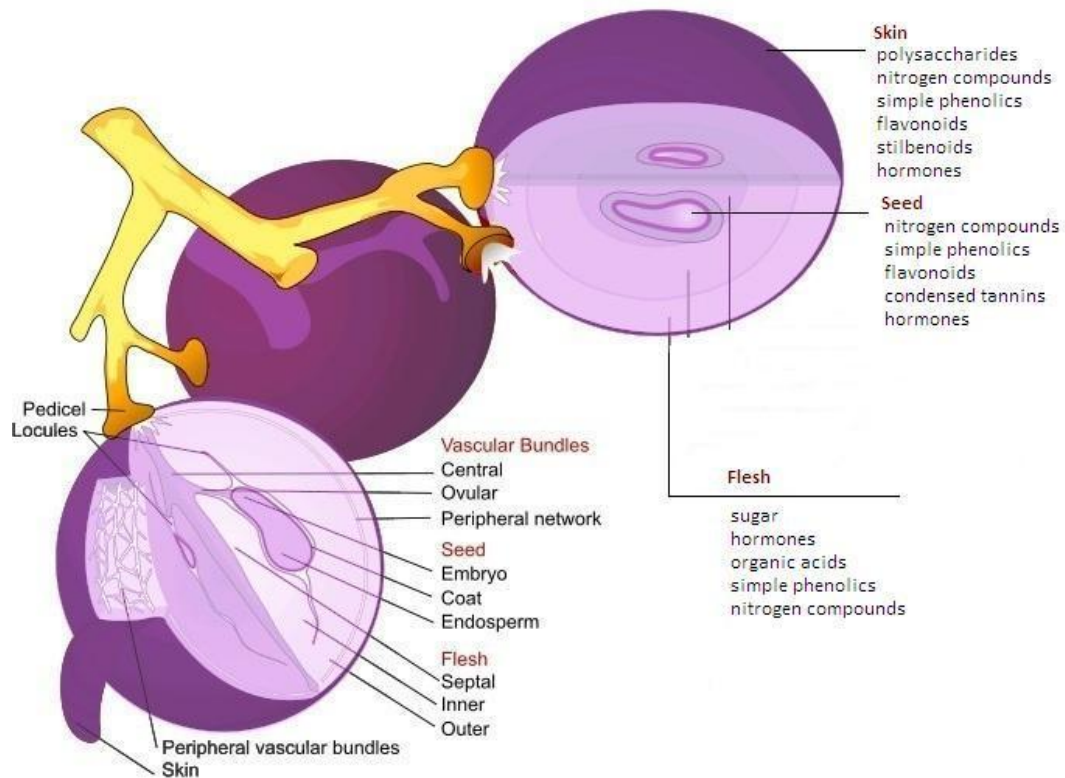


Figura 15. Estructura química del resveratrol.

La síntesis de estilbenos puede ser constitutiva o inducida por factores bióticos y abióticos, pero la vid acumula concentraciones crecientes de estilbenos en ausencia de cualquiera de estos estímulos durante la maduración (Gatto y col. 2008).

Para finalizar este apartado y a modo de recopilación, en la figura 16 se ha representado la estructura de la baya con la localización de los compuestos descritos.



**Figura 16.** Estructura y localización de los principales componentes de la baya (adaptada a partir de una imagen creada por Philip Greenspun illustration Project).

### 1.3. EL RIEGO EN LA VID

Actualmente, la mayoría de las regiones de producción vitivinícola del planeta experimentan algún grado de sequía estacional. Los modelos climáticos globales actuales predicen un incremento de la aridez en un futuro próximo, por lo que el déficit de agua puede convertirse en el factor más limitante para la producción y la calidad de la uva, y en consecuencia, del vino (IPCC 2007). Además, se prevé que la frecuencia de fenómenos extremos como olas de calor o lluvias torrenciales aumente, lo que puede conducir a un desprendimiento masivo de hojas, lo que a su vez provocaría un desequilibrio fuente/sumidero en la planta y finalmente, una maduración incompleta de la baya debido a la falta de hidratos de carbono disponibles. Sin embargo, estos efectos, probablemente, no se

presentarán con la misma intensidad en todas las variedades de vid (Jones y col. 2005, Schultz 2007).

Por otro lado, la FAO presiona para que se reduzca el consumo de agua en los cultivos de regadío ([www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html), Cominelli y col. 2009), por lo que este nuevo escenario requiere un manejo del viñedo que se adapte a la situación, en especial, en lo relativo al riego, de manera que se pueda obtener una producción estable, manteniendo o incluso mejorando la calidad de la uva (Dry y Loveys 1998, Medrano y col. 2003, Chaves y col. 2007). La búsqueda de variedades adaptadas a la estación de crecimiento y que muestren mayor resistencia al estrés ambiental puede ser otro aspecto crítico para optimizar la maduración de la uva.

### **1.3.1. Concepto de riego deficitario**

El riego deficitario (*deficit irrigation*, DI) es una estrategia de riego propuesta hace años para mejorar el aprovechamiento del agua y reducir su consumo (Williams y Matthews 1990). Este sistema es una práctica común en varias áreas del mundo, especialmente en las regiones secas, donde se busca maximizar la eficiencia en el uso del agua (WUE, definida por Geerts y Raes -2009- como el cociente entre la masa de producto de mercado y el volumen de agua consumida en su cultivo). Es posible aplicar diferentes estrategias de DI como son las siguientes (revisado en Ruiz-Sánchez y col. 2010):

- Riego deficitario regulado (*regulated deficit irrigation*, RDI)
- Déficit hídrico sostenido (*sustained deficit irrigation*, SDI).
- Desecamiento parcial de las raíces (*partial root-zone drying*, PRD)

#### 1.3.1.1. Riego deficitario regulado y Déficit hídrico sostenido

En sentido amplio, tal y como establecen English y Raja (1996), el riego deficitario regulado (*regulated deficit irrigation, RDI*) consiste en una sub-irrigación deliberada y sistemática del cultivo. Así, la cantidad de agua aplicada es inferior a la necesaria para satisfacer las exigencias de las plantas durante ciertos períodos del ciclo vital, cuando la producción y la calidad de la cosecha apenas resultan afectadas, mientras que se utiliza el riego completo durante el resto del ciclo, cuando la producción y calidad son más sensibles a su carencia.

Por otra parte, el déficit hídrico sostenido (*sustained deficit irrigation, SDI*) se basa en el mantenimiento de un cierto nivel de déficit hídrico uniformemente a lo largo de todo el ciclo vital para evitar que se produzcan períodos de sequía severa en algún momento crítico del desarrollo, lo que podría tener efectos negativos irreversibles sobre la producción (Goldhamer y col. 2006).

#### 1.3.1.2. Desecamiento parcial de las raíces

La posibilidad de controlar el vigor de la cepa mediante el sistema de desecamiento parcial de las raíces (*partial rootzone drying, PRD*), fue propuesta, en primer lugar, por el grupo de Loveys en Australia (revisado por Loveys y col. 2000). Posteriormente, el PRD se introdujo en Estados Unidos, Argentina, China, Chipre, Francia, España y Reino Unido y se ha aplicado con éxito no sólo a la vid sino a una alta variedad de cultivos (Dry y col. 2001). En este sistema se divide el sistema radical en dos zonas, una de las cuales se riega normalmente mientras que la otra permanece seca. Además, cada cierto tiempo se alternan el lado húmedo y el seco para evitar la muerte de las raíces del lado seco (revisado por Kang y Zhang 2004 y por Bravdo

2005). Así, se utiliza la mitad de agua en el riego de las cepas, con lo que se obtiene una mejoría en la WUE sin una reducción significativa en la producción ni en la calidad de la uva (Loveys y col. 2004).

### **1.3.2. Respuestas fisiológicas y agronómicas al riego deficitario**

La vid es un cultivo bien adaptado a las condiciones de clima semiárido de la Cuenca Mediterránea debido a que posee un profundo sistema radical y a que desarrolla una estrategia fisiológica de evitación de la sequía que consiste en obtener un eficiente control estomático de la transpiración y del embolismo en el xilema (Lovisolo y col. 2002), que además es capaz de ajustar osmóticamente (Patakas y col. 2008).

Una de las primeras respuestas de la vid al déficit hídrico moderado es el cierre estomático, el cual restringe la pérdida de agua y la tasa fotosintética (Chaves y col. 2003). En los primeros estadios del estrés, se observan también efectos sobre el metabolismo fotosintético (Lawlor y Tezara 2009) y en la expresión de una gran cantidad de genes (Chaves y col. 2009). Cuando el déficit hídrico se prolonga en el tiempo, las plantas exhiben mecanismos de aclimatación que incluyen la inhibición del crecimiento y la osmorregulación; éstos son elementos clave para el mantenimiento del estado hídrico de la planta y de la capacidad de asimilación de carbono durante la escasez de agua (revisado por Chaves y col. 2010).

Diversos experimentos realizados en ambientes diferentes (invernadero y campo) han mostrado que la fotosíntesis de la vid es bastante resistente al déficit hídrico (Flexas y col. 2002, Souza y col. 2003, 2005a, Chaves y col. 2007) ya que comienza a descender a potenciales hídricos más negativos que la conductancia estomática. Por ello, la WUE generalmente

aumenta en las plantas que crecen bajo estrés hídrico (Loveys y col. 2004, Souza y col. 2005b, Marsal y col. 2008).

### 1.3.3. Respuestas de los diferentes genotipos

*Vitis vinifera* L. se caracteriza por tener una gran variabilidad genética con cientos de variedades cultivadas por todo el mundo (Galet 2000, Shultz 2003). En los países de Europa, como Francia, España o Portugal se cultiva un gran número de variedades nativas de *Vitis vinifera*, cuyas respuestas fisiológicas se han ido conociendo estos últimos años para poder mejorar sus características de calidad de la uva.

En base al comportamiento del potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) en condiciones de déficit hídrico, los cultivares de vid se han clasificado como isohídricos o anisohídricos (Schultz 2003, Vanderleur y col. 2009). Los cultivares isohídricos pueden mantener prácticamente constante el  $\Psi$  en un amplio rango de humedad atmosférica o edáfica. Estos cultivares muestran una estrecha co-regulación de la conductancia foliar y la conductividad hidráulica que les permite evitar la cavitación (Lovisol y col. 2010). Entre las variedades que muestran este comportamiento se encuentran Garnacha, Tricadeira, Preta y Tempranillo. Por otra parte, en los cultivares anisohídricos el  $\Psi$  desciende acusadamente conforme lo hace la disponibilidad hídrica del suelo o aumenta la demanda de humedad atmosférica. El descenso en el  $\Psi$  se consigue mediante ajuste osmótico o con cambios en la elasticidad de la pared (Patakas y col. 2008). Este comportamiento se ha observado en cultivares como Chardonnay, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Syrah, Riesling, Cariñena, Muscat o Thompson seedless. Finalmente, algunos cultivares se han revelado como isohídricos o anisohídricos dependiendo de las condiciones ambientales (revisado por Lovisol y col. 2010).

Aunque como se ha indicado anteriormente, la vid es relativamente tolerante a la sequía, existe una cierta variabilidad genética dentro de la especie (Gaudillère y col. 2002). Así, se ha observado un amplio rango en la WUE entre los diferentes cultivares (Bota y col. 2001), cuyas diferencias se han atribuido a variaciones en la conductancia estomática (Schultz 2003, Soar y col. 2006), en la conductancia hidráulica de la raíz y en la expresión de acuaporinas (canales de agua) en respuesta al déficit hídrico (Vandeleur y col. 2009). Estas variaciones pueden tener profundas implicaciones en el manejo del riego de los cultivares, en particular en lo relativo al momento y cantidad de agua aplicada, para optimizar la relación fuente-sumidero, con el objetivo de conseguir incrementar la calidad del fruto en cada una de las variedades (Medrano y col. 2003).

Otros aspectos importantes en la respuesta de las diferentes variedades de vid al déficit hídrico están relacionados con la morfología, anatomía y bioquímica foliar. Así, variaciones en la composición de ceras epicuticulares, la composición lipídica o el grosor del mesófilo son factores relevantes en la respuesta adaptativa a la carencia de agua de las plantas en general (Syvertsen y col. 1995, Boyer y col. 1997, Cameron y col. 2006), y de la vid en particular (Schultz 1996, Moutinho-Pereira y col. 2007).

#### **1.3.4. Efectos del déficit hídrico sobre la baya**

El déficit hídrico afecta al desarrollo de la baya, su metabolismo y su composición final. Por ello, el tiempo y la intensidad de la falta de agua determinan la magnitud de las alteraciones que se producen en el color y el sabor del vino. Es interesante comprobar que recientes estudios muestran que el déficit hídrico estimula los mecanismos de fotoprotección de la baya (Deluc y col. 2009). En general, un déficit hídrico moderado tiene un efecto positivo sobre la calidad del vino en variedades tintas (Bravdo y col. 1985), lo cual puede utilizarse para

manipular las características sensoriales del vino. Sin embargo, estos efectos del déficit hídrico no son universales, sino que dependen de numerosos factores fisiológicos y ambientales como son la climatología de la zona, el tipo de suelo, la variedad utilizada, o el momento de aplicación de la restricción hídrica (Chaves y col. 2010, Ruiz-Sánchez y col. 2010).

#### *1.3.4.1. Crecimiento de la baya*

Existen numerosos estudios que abordan los efectos del déficit hídrico sobre el desarrollo de la baya (revisado por Ollat y col. 2002 y Keller 2005). Como se ha indicado en la Sección 1.1.2. de la presente Memoria, la uva es un fruto no climatérico que muestra una curva de crecimiento en forma de doble sigmoide. Durante la fase I, la baya importa hidratos de carbono que se utilizan para el desarrollo de las semillas, la proliferación y expansión celular y la síntesis de ácidos orgánicos (Coombe y McCarthy 2000). En esta etapa, la baya está conectada al tallo a través del xilema exclusivamente, por lo que los efectos del déficit hídrico sobre el crecimiento parecen deberse a cambios en el suministro de agua desde el xilema, lo que posiblemente induzca un descenso en la turgencia de las células del mesocarpo (Thomas y col. 2006). La consecuencia es la reducción en la expansión de la baya. Otra posibilidad, es que el ácido abscísico (ABA) que se sintetiza en condiciones de déficit hídrico limite la división celular, produciéndose así bayas de menor tamaño. Estudios recientes muestran que cuando el déficit hídrico ocurre antes del envero se produce una maduración temprana que se manifiesta en una aceleración de la acumulación de azúcares y antocianinas y en la disminución de la concentración de ácido málico (Castellarin y col. 2007a, b).

La fase III de crecimiento de la baya se inicia con el envero, y se caracteriza por el reblandecimiento y la coloración de la baya, así como por un resurgimiento del crecimiento. Cuando el déficit hídrico ocurre tras el envero, se observa una reducción en el tamaño final de

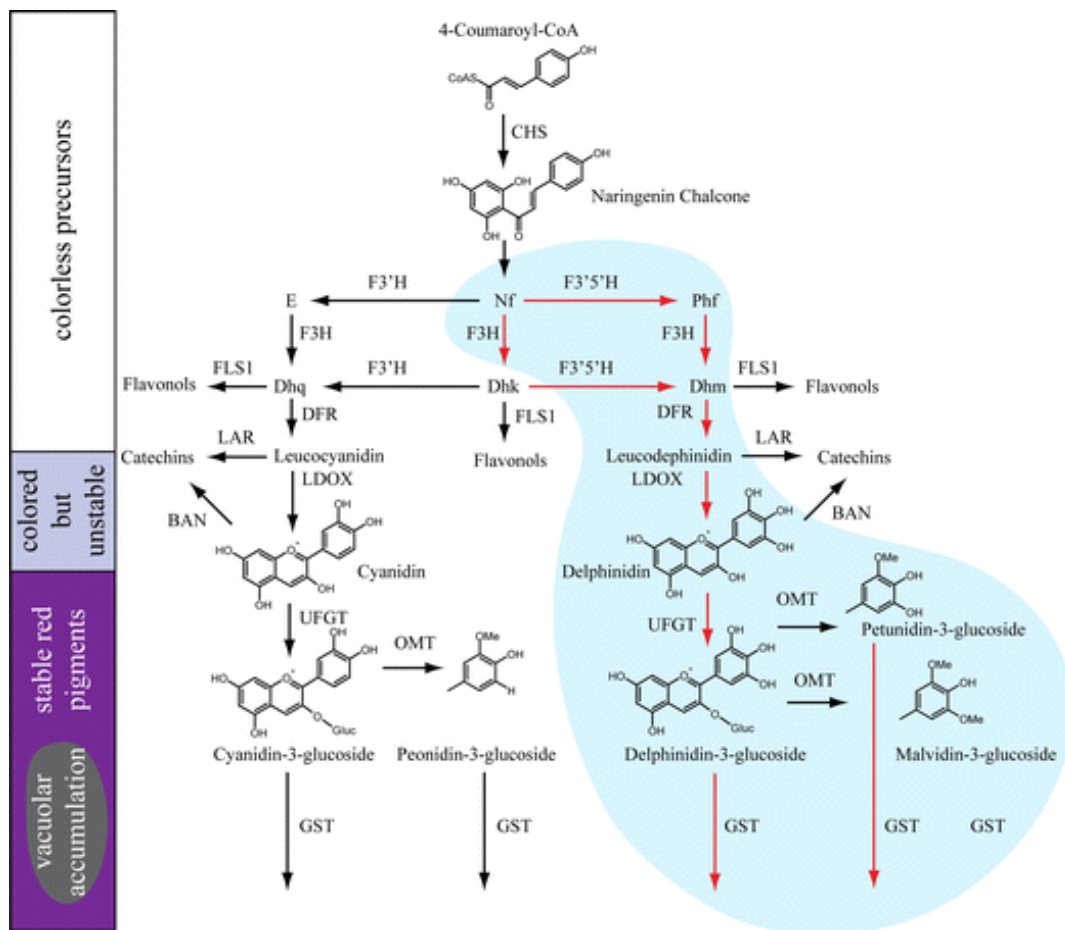


la baya que parece ser resultado de varios mecanismos. En esta etapa, la conexión entre la baya y la planta se da a través del floema y un descenso de la fotosíntesis podría disminuir la cantidad de fotoasimilados necesarios para el crecimiento de la baya en esta fase (Wang y col. 2003, Thomas y col. 2006). Por otra parte, el déficit hídrico post-envero aumenta la proporción de semillas y hollejo con respecto a la pulpa (Roby y Matthews 2004), y el grosor del hollejo aumenta debido probablemente a la inhibición de la actividad pectin-metilesterasa (Deytieux-Belleau y col. 2008). Este aumento en la proporción de hollejo tiene como resultado una mayor cantidad de compuestos fenólicos extraíbles durante la maceración del mosto (ver apartado 1.3.4.2).

#### *1.3.4.2. Composición y calidad de la uva*

Numerosos estudios muestran que el déficit hídrico reduce el crecimiento de la baya (ver apartado 1.3.4.1.), pero no la concentración de polifenoles totales, antocianinas y flavanoles que suele aumentar (Peterlunger y col. 2005, Sivilotti y col. 2005). Recientemente se ha mostrado con análisis proteómicos y metabolómicos que las bayas sometidas a estrés hídrico sufren cambios metabólicos que influyen en la composición y calidad de la baya (Castellarin y col. 2007a, b, Deluc y col. 2009, Grimplet y col. 2009).

El déficit hídrico mejora la acumulación de antocianinas pero también produce cambios en su composición porque estimula la hidroxilación de la molécula (Figura 17). Castellarin y col. (2007a, b) mostraron que la restricción hídrica aceleraba la acumulación de antocianinas así como la expresión de algunos genes responsables de su biosíntesis. Sin embargo, los efectos sobre la concentración de antocianinas suelen ser más evidentes que los que se observan en las concentraciones de flavonoles (Kennedy y col. 2002, Grimplet y col. 2007) o proantocianidinas (Downey y col. 2006, Ollé y col. 2011).



**Figura 17.** Cambios en la síntesis de compuestos fenólicos durante el desarrollo de la baya en respuesta al déficit hídrico. La activación de algunos genes (flechas rojas) indujo la acumulación de antocianinas con predominio de las formas tri-hidroxiladas (sombra azul) (tomado de Castellarin y col. 2007a).

Menos claros resultan los efectos del déficit hídrico sobre la síntesis de resveratrol. Mientras que Vezzuli y col. (2007) observaron sólo pequeñas alteraciones en la concentración de este compuesto, Grimplet y col. (2007) detectaron un aumento en la abundancia de RNAm que codifica para la enzima estilbeno sintasa (STS), lo que sugiere un aumento en la concentración de resveratrol, tal y como se ha mostrado recientemente en bayas de Cabernet Sauvignon sometidas a déficit hídrico (Quiroga y col. 2012).

La influencia del estrés hídrico sobre los aromas no está muy estudiada. Sin embargo, dos importantes estudios sugieren que la falta de agua altera algunos atributos sensoriales del vino

como la concentración de carotenoides y sus derivados (Chapman y col. 2005, Bindon y col. 2007). Chapman y col. (2005) mostraron que el déficit hídrico estimuló la biosíntesis de compuestos volátiles en Cabernet Sauvignon, lo cual pudo deberse a un mayor flujo de carbono hacia vías metabólicas alternativas (por ejemplo, la síntesis de aminoácidos que son precursores de ésteres volátiles) y la síntesis de carotenoides, lo que dio lugar a un aroma más afrutado en esta variedad.

## **1.4. BALANCE HORMONAL EN LA VID**

### **1.4.1. Efectos del déficit hídrico sobre el balance hormonal**

Las hormonas vegetales, aunque suelen encontrarse en concentraciones extremadamente bajas, están directamente relacionadas con muchos aspectos del desarrollo y crecimiento vegetales. En condiciones de sequía las plantas pueden sentir e iniciar respuestas y/o adaptaciones ante la falta de agua antes de que haya comenzado a descender el potencial hídrico de la planta lo que ha consolidado el concepto de “señal no hidráulica” para describir el papel que desempeñan las hormonas en plantas sometidas a déficit hídrico (revisado por Davies y col. 2005).

De todas las señales implicadas en la respuesta al déficit hídrico, ha sido el ácido abscísico (ABA) quién mayor atención ha recibido como elemento central en el proceso de señalización de las células (Hartung y col. 1999, Wilkinson y Davies 2002, Davies y col. 2005). En plantas sometidas a déficit hídrico, el ABA se sintetiza en las raíces, se transporta por el xilema y llega a la parte aérea donde provoca el cierre de estomas y el cese del crecimiento. Además, otros compuestos como los precursores de la síntesis de ABA (Jiang y Hartung 2008), los conjugados con ABA (Wilkinson y Hartung 2009), una baja concentración de citoquininas (Stoll y col. 2000)

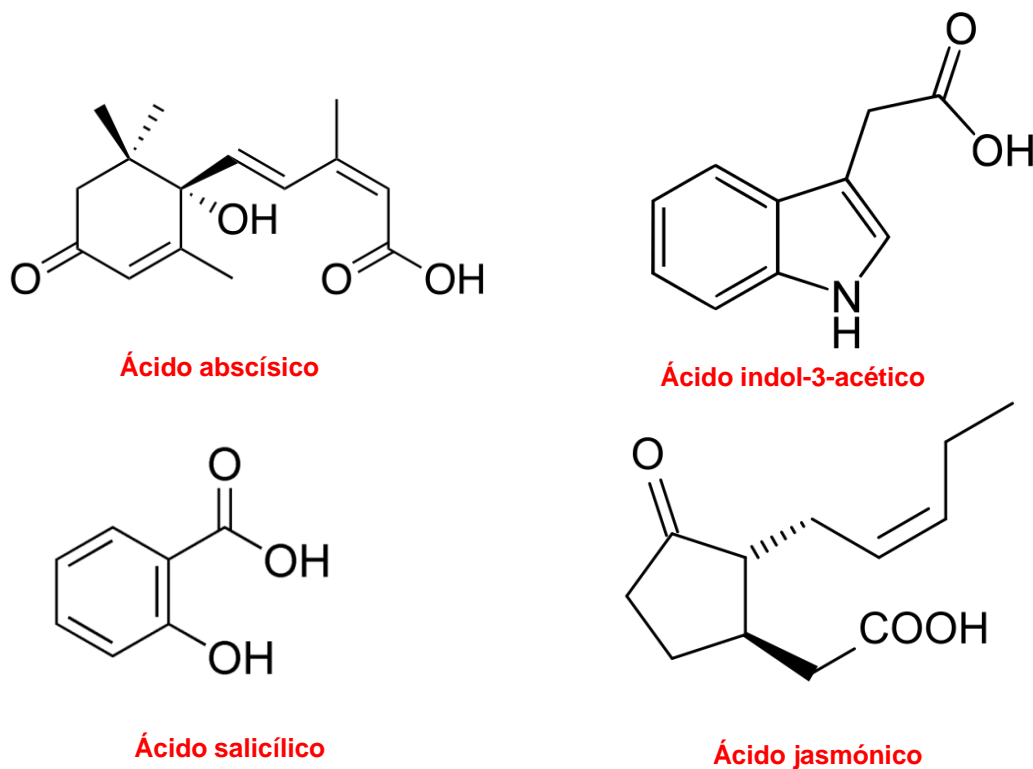
o los cambios en la composición mineral o en el pH del xilema (Davies y col. 2002) podrían actuar también como señales no hidráulicas en la regulación hídrica a nivel foliar (revisado por Schachtmann y Goodger, 2008). La mayoría de las evidencias apuntan a que el pH de la savia xilemática es el factor más importante en la regulación de las respuestas estomáticas y de crecimiento en condiciones de déficit hídrico (Wilkinson 2004).

#### **1.4.2. Papel de las hormonas en la maduración de la baya**

Los mecanismos que controlan la maduración de los frutos no climatéricos como la uva no se conocen completamente (Davies y Böttcher 2009). Estos últimos años se ha sugerido que algunas hormonas vegetales como el ABA y las poliaminas desempeñan un papel relevante en algunos aspectos de la maduración de la uva, lo que en última instancia afecta a la producción (Gény y col. 1997, Antolín y col. 2008) y a la composición fenólica de la baya (Antolín y col. 2006, Deluc y col. 2009). Estudios más recientes revelan un complejo sistema de señalización hormonal que se activa en el envero, a través de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de hormonas como ABA, auxinas, etileno y brasinoesteroides, y en menor grado, giberelinas y citoquininas (Symons y col. 2006, Pilati y col. 2007, Koyama y col. 2010) (Figura 18).

Al comienzo de la maduración (envero) se ha detectado un aumento en la concentración de ABA de la baya, que ha llevado a sugerir que esta hormona funcionaría como una señal activadora de la maduración (Antolín y col. 2003), pero hasta el momento no ha sido posible distinguir con claridad si dicho incremento de ABA es una consecuencia del comienzo de la maduración o si forma parte del mecanismo esencial del proceso (Wheeler y col. 2009). Asimismo, se han observado cambios en las concentraciones de catabolitos del ABA durante la maduración de la baya (Owen y col. 2009). Por otra parte, estudios muy recientes han

demostrado que el ABA es el único iniciador de la biosíntesis de antocianinas en cultivos celulares de bayas de Cabernet Sauvignon (Gagné y col. 2011). El papel crucial del ABA en la maduración de la uva se ha puesto de manifiesto en diversos estudios con aplicación exógena de ABA (Deytieux-Belleau y col. 2007, Quiroga y col. 2009, Lacampagne y col. 2010, Sandhu y col. 2011, Quiroga y col. 2012). Los resultados muestran que la aplicación de ABA induce la acumulación de antocianinas, flavonoles y proantocianidinas en la uva.



**Figura 18.** Estructuras químicas de algunas de las hormonas más relevantes en la maduración de la uva.

La importancia de las auxinas en el cuajado y posterior crecimiento del fruto es un tema bien conocido en diferentes frutos, incluida la vid (Gény y col. 2005). Así, la aplicación exógena de auxinas puede retrasar la acumulación de antocianinas y, en algunos casos, la maduración de la uva (Ban y col. 2003, Jeong y col. 2004, Böttcher y col. 2010a, b). En estudios recientes se ha observado que la concentración de ácido indol-3-acético (IAA) es elevada en las flores y que después desciende drásticamente, permaneciendo baja durante el resto del desarrollo de la baya (Böttcher y col. 2010a). Además se ha detectado que se incrementan los niveles de los

conjugados de IAA, lo cual sugiere un posible mecanismo de control para mantener bajos los niveles de auxinas durante la maduración (Böttcher y col. 2010b). Por otra parte, estos mismos autores han informado de que la aplicación exógena de auxinas justo antes del envero produce un aumento en el tamaño de la baya debido a la capacidad de estas hormonas para estimular la división celular.

Las oxilipinas constituyen un grupo de derivados bioactivos de los ácidos grasos que desempeñan importantes funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La mayoría de las investigaciones se han centrado en los jasmonatos, que incluyen el ácido jasmónico (JA) y su metil éster, el metil jasmonato (MeJA). El papel de los jasmonatos en la defensa de las plantas frente al ataque de los herbívoros y a infecciones por patógenos se conoce bastante bien pero estos últimos años se han acumulado evidencias que sugieren que los jasmonatos pueden tener también un papel destacado en la resistencia de las plantas a los factores de estrés abióticos (Peña-Cortés y col. 2005). Los jasmonatos se han detectado en los frutos desde hace tiempo, pero si intervienen o no en el proceso de maduración es una cuestión que aún no está resuelta. En vid, se ha observado que la aplicación exógena de JA promueve algunos cambios relacionados con la maduración de la baya (Kondo y Fukuda 2001), lo que apunta que estas moléculas podrían tener algún papel relevante en dicho proceso.

El ácido salicílico (SA) es un compuesto fenólico implicado en la regulación de las respuestas de las plantas a factores de estrés bióticos y abióticos así como en muchos procesos de desarrollo, incluyendo la maduración del fruto (Klessig y Malamy 1994, Davies 2004). Además, el SA exhibe una elevada capacidad para alargar la vida de los productos hortícolas tras la cosecha (Asghari y Aghdam 2010). Se ha observado que la aplicación exógena de SA retrasa la maduración del fruto al provocar alteraciones en ciertos aspectos como son el reblandecimiento del fruto, su contenido en azúcares o la biosíntesis de etileno. En la vid se ha

detectado que el tratamiento de las bayas con SA retrasa o inhibe la maduración cuando la aplicación se realiza antes del envero (Kraeva y col. 1998), posiblemente debido a la inhibición de los efectos del ABA sobre la baya (Raskin 1992). Estudios más recientes han demostrado que la aplicación de SA en cultivos celulares de uva estimula la síntesis de estilbenos porque se induce la expresión de genes que codifican para algunas enzimas de la síntesis del resveratrol, como son la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la estilbeno sintasa (STS) (Kiselev y col. 2010).

## **1.5. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO**

Tal y como se ha descrito a lo largo de esta Memoria, durante los últimos años se han publicado numerosos estudios acerca de los efectos del déficit hídrico tanto en vides cultivadas en macetas como en campo. Los resultados son enormemente diversos, lo cual puede deberse a la gran variedad de diseños experimentales y formas de adaptar el sistema de riego al viñedo, o bien a la interacción de múltiples factores con el crecimiento y desarrollo reproductivo de la vid. Por tanto, con la pretensión de unificar criterios, controlar variables y, en definitiva obtener unos datos contrastables, este estudio se ha realizado con esquejes fructíferos de vid cultivados en macetas bajo condiciones controladas. Se pretende así monitorizar con exactitud el estado hídrico del suelo, así como el momento del desarrollo en las diferentes variedades ensayadas.

En este trabajo, además de continuar profundizando en la relación entre la síntesis de polifenoles y el balance hormonal de la baya en la variedad Tempranillo, se ha incluido la variedad Graciano, la cual es también originaria de España y tradicionalmente se ha utilizado para mejorar mezclas de vino de otras variedades debido a su potencial aromático y a que confiere a los vinos una alta calidad (Cirami y col. 2000). Sin embargo, aunque su composición fenólica ha sido bien caracterizada (Núñez y col. 2004), su capacidad de adaptación al

suministro hídrico y la posible relación entre los cambios hormonales producidos por el riego deficitario y su calidad fenólica no se han estudiado.



## 1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams DO, 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 249-256.
- Ali K, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, 2010. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochemistry Reviews* 9: 357-378.
- Ancín-Azpilicueta C, González-Marco A, Jiménez-Moreno N, 2008. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 257-275.
- Andersen OM, 2008. Recent advances in the field of anthocyanins. Main focus and structures. En: *Recent advances in polyphenol research*, vol. 1. (Eds. F Daayf, V Lattanzio). Blackwell Publishing Ltd. Reino Unido, pp. 167-201.
- Antolín MC, Ayari M, Sánchez-Díaz, 2006. Effects of partial rootzone drying on yield, ripening and berry ABA in potted Tempranillo grapevines with split roots. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12: 13-20.
- Antolín MC, Baigorri H, De Luis I, Aguirrezábal F, Gény L, Broquedis M, Sánchez-Díaz M, 2003. ABA during reproductive development in non-irrigated grapevines cv. Tempranillo. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: 169-176.
- Antolín MC, Santesteban H., Santa María E, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, 2008. Involvement of abscisic acid and polyamines in berry ripening of *Vitis vinifera* (L.) subjected to water deficit irrigation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14: 123-133.
- Aron PM, Kennedy JA, 2008. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 52: 79-104.
- Asghari M, Aghdam MS, 2010. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science & Technology* 21: 502-509.
- Baggiolini M, 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue Romande d'Agriculture, de Viticulture et d'Arboriculture* 8: 4-6.

- Baillod M, Baggiolini M, 1993. Les stades repères de la vigne. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* 28: 7-9.
- Ban T, Ishimaru M, Kobayashi S, Shiozaki S, Toto-Yamamoto N, Horiuchi S, 2003. Abscisic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid affect the expression of anthocyanin biosynthetic pathway genes in "Kyoho" grape berries. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 778: 586-589.
- Bavaresco L, Vezzuli S, Civardi S, Gatti M, Battilani P, Pietri A, Ferrari F, 2008. Effect of lime-induced leaf chlorosis on Ochratoxin A, trans-Resveratrol, and  $\epsilon$ -Viniferin production in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berries infected by *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56: 2085-2089.
- Bell SJ, Henschke PA, 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian journal of Grape and Wine Research* 11: 242-295.
- Bindon KA, Dry PR, Loveys BR, 2007. Influence of plant water status on the production of C<sup>13</sup>-norisoprenoid precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grape berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 4493-4500.
- Bogs J, Downey MO, Harvey JS, Ashton AR, Tanner GJ, Robinson SP, 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiology* 139: 652-663.
- Bota J, Flexas J, Medrano H, 2001. Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. *Annals of Applied Biology* 138: 353-361.
- Böttcher C, Harvey K, Forde CG, Boss PK, Davies C, 2010b. Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17: 1-8.

- Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C, 2010a. Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amino synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *Journal of Experimental Botany* 61: 3615-3625.
- Boulton R, 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine. A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 67-87.
- Boyer JS, Wong SC, Farquhar GD, 1997. CO<sub>2</sub> and water vapor exchange across leaf cuticle (epidermis) at various water potentials. *Plant Physiology* 114: 185-191.
- Bravdo B, 2005. Physiological mechanisms involved in the production of nonhydraulic root signals by partial rootzone drying – A review. *Acta Horticulturae* 689: 267-275.
- Bravdo B, Hepner Y, Loinger C, Tabacman H, 1985. Effect of irrigation and crop level on growth, yield and wine quality of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 36: 132-139.
- Brink ten B, Damink C, Joosten HMLJ, Huis in 't Veld JHJ, 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11: 73-84.
- Buchanan BR, Gruissem W, Jones RL, 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Cameron KD, Teece MA, Smart LB. 2006. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiology* 140: 176-183.
- Castellarin S, Matthews MA, Gaspero GD, Gambetta GA, 2007a. Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 227: 101-112.
- Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G, 2007b. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruit of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment* 30: 1381-1399.

- Chalier P, Angot B, Delteil D, Doco T, Gunata Z, 2005. Interactions between aroma compounds and whole mannoproteins isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry* 100: 22-30.
- Chapman DM, Roby G, Ebeler SE, Guinard JX, Matthews MA, 2005. Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different water status. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11: 339-347.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C, 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103: 551-560.
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, 2003. Understanding plant response to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chaves MM, Santos TP, Souza CR, Ortuño MF, Rodrigues ML, Lopes CM, Maroco JP, Pereira JS, 2007. Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology* 150: 237-252.
- Chaves MM, Zarrouk O, Francisco R, Costa JM, Santos T, Regalado AP, Rodrigues ML, Lopes CM, 2010. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany* 105: 661-676.
- Cirami R, Ewart A, Furkaliev J, 2000. The viticultural and oenological evaluation of Graciano, Gramon and Harslevelu. *The Australia Grapegrower & Winemaker* 436: 20-23.
- Cominelli E, Galbiati M, Tonelli C, Bowler C, 2009. Water: the invisible problem. *EMBO Reports* 10: 671-676.
- Coombe BG, McCarthy MG, 2000. Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 131-135.
- Crippen DD Jr., Morrison JC, 1986. The effects of sun exposure on the phenolic content of Cabernet Sauvignon berries during development. *American Journal of Enology and Viticulture* 37: 243-247.

- Das S, Vasanthi HR, Das DK, 2010. Resveratrol: Biochemistry and functions. En: *Plant phenolics and human health. Biochemistry, nutrition and pharmacology* (Ed. CG Fraga). John Wiley & Sons, Inc. (Estados Unidos).
- Davies C, Böttcher C, 2009. Hormonal control of grape berry ripening. En: *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology* (Ed. KA Roubelakis-Angelakis), Springer: Dordrecht Heidelberg Londres Nueva York, pp. 229-261.
- Davies PJ, 2004. *Plant hormones: physiology, biotechnology and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda.
- Davies WJ, Kudoyarova G, Hartung W, 2005. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 285-295.
- Davies WJ, Wilkinson S, Loveys B, 2002. Stomatal control by chemical signaling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytologist* 153: 449-460.
- Deluc LG, Quilici DR, Decendit A, Grimplet J, Wheatley D, Schlauch A, Mérillon JM, Cushman JC, Cramer GR (2009). Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavour and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* 10: 212.
- Deytieux-Belleau C, Gagné S, L'Hyvernay A, Donèche B, GénY L, 2007. Possible roles of both abscisic acid and indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *Journal International of Sciences de la Vigne et du Vin* 41: 141-148.
- Deytieux-Belleau C, Vallet A, Done`che B, Geny L, 2008. Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 638-646.

- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP, 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 257-268.
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP, 2003a. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: 15-27.
- Downey MO, Harvey JS, Robinson SP, 2003b. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9: 110-121.
- Dry P, Loveys BR, 1998. Factors influencing grapevine vigour and the potential for control with partial rootzone drying. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 140-148.
- Dry PR, Loveys BR, McCarthy MG, Stoll M, 2001. Strategic irrigation management in Australian vineyards. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 35: 129-139.
- English M, Raja SN, 1996. Perspectives on deficit irrigation. *Agricultural Water Management* 32: 1-14.
- Escot S, Feuillat M, Dulau L, Charpentier C, 2001. Release of polysaccharides by yeast and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7: 153-159.
- Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR, 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 409-420.
- Etiévant P, Schlich P, Bouvier JC, Symonds P, Bertrand A, 1988. Varietal and geographic classification of French red wines in terms of elements, amino acids and aromatic alcohols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 45: 25-41.

- Flexas J, Bota J, Escalona JM, Sampol B, Medrano H, 2002. Effects of drought on photosynthesis in grapevines under field conditions: an evaluation of stomatal and mesophyll limitations. *Functional Plant Biology* 29: 461-471.
- Gagné S, Cluzet S, Mérillon JM, Gény L, 2011. ABA initiates anthocyanin production in grape cell cultures. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 1-10.
- Gagné S, Saucier C, Gény L, 2006. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9465-9471.
- Galet P, 2000. *Précis de viticulture*, 7<sup>a</sup> edición. Imprimerie Déhan, Montpellier.
- Gatto P, Vrhovsek U, Muth J, Segala C, Romualdi C, Fontana P, Pruefer D, Stefanini M, Moser C, Mattivi F, Velasco R, 2008. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11773-11785.
- Gaudillère JP, Van Leeuwen C, Ollat N, 2002. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany* 53: 757-763.
- Geerts S, Raes D, 2009. Deficit irrigation as an on farm strategy to maximize crop water productivity in dry areas. *Agricultural Water Management* 96: 1275-1284.
- Gény L, Broquedis M, Martín-Tanguy J, Bouard J, 1997. Free, conjugated, and wall-bound polyamines in various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 48: 80-84.
- Gény L, Deytieux C, Donèche B, 2005. Importance of hormonal profile on the onset of ripening in grape berries of *Vitis vinifera* L. *Acta Horticulturae (ISHS)* 682: 99-105.
- Gerbaud V, Gabas N, Blouin J, Pellerin P, Moutounet M, 1997. Influence of wine polysaccharides and polyphenols on the crystallisation of potassium hydrogen tartrate. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 31: 65-83.

- Goldhamer DA, Viveros M, Salinas M, 2006. Regulated deficit irrigation in almonds: effects of variations in applied water and stress timing on yield and yield components. *Irrigation Science* 24: 101-114.
- Grimplet J, Deluc LG, Tillet RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC ,2007. Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8: 187.
- Grimplet J, Wheatley MD, Ben Jouira H, Deluc LG, Cramer GR, Cushman JC, 2009. Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics* 9: 2503-2528.
- Guadalupe Z, Palacios A, Ayestarán B, 2007. Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and colour extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4854-4862.
- Guidoni S, Allara P, Shubert A, 2002. Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 224-226.
- Hartung W, Peuke A, Davies WJ, 1999. Abscisic acid - a hormonal long-distance stress signal in plants under drought and salt stress. En "*Handbook of crop stress*" (Ed. M Pessarakli) pp. 737-747. Marcel Dekker: New York.
- Herbert P, Cabrita MJ, Ratola N, Laureano O, Alves A, 2005. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, subregion, and vintage. *Journal of Food Engineering* 66: 315-322.
- Hernández-Orte P, Ibraz MJ, Cacho J, Ferriera V, 2003. Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method. *Chromatographia* 58: 29-35.



- Hichri I, Barrieu F, Bogs J, Kappel C, Delrot S, Lauvergeat V, 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* 62: 2465-2483.
- Hidalgo L, 1993. *Tratado de Viticultura*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Hilbert G, Soyer JP, Molot C, Giraudon S, Milin S, Gaudillère P, 2003. Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis* 42: 69-76.
- Huang XM, Huang HB, Wang HC, 2005. Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulating structural proteins. *Science Horticulturae* 104: 249-263.
- IPCC, 2007. *Climate change 2007: the physical basis summary for policy makers*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M, 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science* 167: 247-252.
- Jiang F, Hartung W, 2008. Long-distance signaling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* 59: 37-43.
- Jones GV, White MA, Owen RC, Storchmann C, 2005. Climate change and global wine quality. *Climate Change* 73: 319-343.
- Kang S, Zhang J, 2004. Controlled alternate partial root-zone irrigation: its physiological consequences and impact on water use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 55: 2437-2446.
- Keller M, 2005. Deficit irrigation and vine mineral nutrition. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 267-283.
- Keller M, 2010. *The science of grapevines. Anatomy and physiology*. Academic Press, Elsevier Inc., China.

- Kennedy JA, Hayasaka Y, Vidal S, Waters EJ, Jones GP, 2001. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5348-5355.
- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL, 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55: 77-85.
- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL, 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 268-274.
- Kiselev KV, Dubrovina AS, Isaeva GA, Zhuravlev YN, 2010. The effect of salicylic acid on phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *Vitis amurensis* cell culture. *Russian Journal of Plant Physiology* 57: 415-421.
- Klessig DF, Malamy J, 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1439-1458.
- Kondo S, Fukuda K, 2001. Changes of jasmonates in grape berries and their possible roles in fruit development. *Scientia Horticulturae* 91: 275-288.
- Koyama K, Sadamatsu K, Goto-Yamamoto N, 2010. Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional & Integrative Genomics* 10: 367-381.
- Kraeva E, Andary C, Carbonneau A, Deloire A, 1998. Salicylic acid treatment of grape berries retards ripening. *Vitis* 37: 143-144.
- Lacampagne S, Gagné S, Génry L, 2010. Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 81-90.

- Lawlor DW, Tezara W, 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* 103: 561-579.
- Loveys BR, Stoll M, Davies WJ, 2004. Physiological approaches to enhance water use efficiency in agriculture: exploiting plant signalling in novel irrigation practice. En: *Water use efficiency in plant biology*. (Ed. MA Bacon) Blackwell Publishing: Oxford, pp. 113-141.
- Loveys BR, Stoll M, Dry PR, McCarthy MG, 2000. Using plant physiology to improve the water use efficiency of horticultural crops. En: *“Third International Symposium on Irrigation of Horticultural crops”*. *Acta Horticulturae (ISHS)* 537: 187-197.
- Lovisoló C, Hartung W, Schubert A, 2002. Whole-plant hydraulic conductance and root-to-shoot flow of abscisic acid are independently affected by water stress in grapevines. *Functional Plant Biology* 29: 1349–1356.
- Lovisoló C, Perrone I, Carra A, Ferrandino A, Flexas J, Medrano H, Schubert, 2010. Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. *Functional Plant Biology* 37: 98-116.
- Marsal J, Mata M, del Campo J, Arbonés A, Vallverdú X, Girona J, Olivo N, 2008. Evaluation of partial rootzone drying for potential field use as a deficit irrigation technique in commercial vineyards according to two different pipeline layouts. *Irrigation Science* 26: 347-356.
- Martínez De Toda F, 1991. *Biología de la Vid. Fundamentos biológicos de la viticultura*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R, 2006. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7692–7702.

- Medrano H, Escalona JM, Cifré J, Bota J, Flexas J, 2003. A ten-year study on the physiology of two Spanish grapevine cultivars under field conditions: effects of water availability from leaf photosynthesis to grape yield and quality. *Functional Plant Biology* 30: 607-619.
- Moutinho-Pereira J, Magalhaes N, Gonçalves B, Bacelar E, Brito M, Correia C, 2007. Gas exchange and water relations of three *Vitis vinifera* L. cultivars growing under Mediterranean climate. *Photosynthetica* 45: 202-207.
- Mullins MG, Bouquet A, Williams LE, 1992. *Biology of the Grapevine*. Cambridge University Press, Reino Unido.
- Núñez V, Monagas M, Gomez-Cordovés MC, Bartolomé B, 2004. *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology* 31: 69-79.
- Ollat N, Diakou-Verdin P, Carde JP, Barrieu F, Gaudillere JP, Moing A, 2002. Grape berry development: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 36: 109-131.
- Ollé D, Guiraud JL, Souquet JM, Terrier N, Ageorges A, Cheynier V, Verries C, 2011. Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17: 90-100.
- Owen SJ, Lafond MD, Bowen P, Bogdanoff C, Usher K, Abrams SR, 2009. Profiles of abscisic acid and its catabolites in developing Merlot grape (*Vitis vinifera*) berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 227-284.
- Patakas A, Noitsakis B, Chouzouri A, Chartzoulakis K, 2008. Physiological and biochemical changes induced by different irrigation strategies in grapevines. *Acta Horticulturae (ISHS)* 792: 511-517.

- Peña-Cortés H, Barrios P, Dorta F, Polanco V, Sánchez C, Sánchez E, Ramírez I, 2005. Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 246-260.
- Pervaiz S, 2003. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *The FASEB Journal* 17: 1975-1985.
- Peterlunger E, Sivilotti P, Colussi V, 2005. Water stress increased polyphenolic quality in 'Merlot' grapes. *Acta Horticulturae (ISHS)* 689: 293-300.
- Pilati S, Perazzolli M, Malossini A, Cestaro A, Demattè L, Fontana P, Dal Ri A, Viola R, Velasco R, Moser C, 2007. Genome-wide transcriptional analysis of grape berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at veraison. *BMC Genomics* 8: 428.
- Quiroga AM, Berli FJ, Moreno D, Cavagnaro JB, Bottini R, 2009. Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard-grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set with no negative effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 28-35.
- Quiroga AM, Deis L, Cavagnaro JB, Bottini R, Silva MF, 2012. Water stress and abscisic acid exogenous supply produce differential enhancements in the concentration of selected phenolic compounds in Cabernet sauvignon. *Journal of Berry Research* 2: 33-44.
- Raskin I, 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463.
- Reynier A, 2005. *Manual de viticultura: guía técnica de viticultura*. 6ª edición. Mundi Prensa, Madrid.
- Roby G, Matthews MA, 2004. Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 74-82.

- Ruiz-Sánchez MC, Domingo R, Castel JR, 2010. Review: deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: S5-S20.
- Salazar DM, Melgarejo P, 2005. *Viticultura. Técnicas de cultivo de la vid, calidad de la uva y atributos de los vinos*. Mundi Prensa, Madrid.
- Sandhu AK, Gray DJ, Lu J, Gu L, 2011. Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol content of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. *Food Chemistry* 126: 982-988.
- Schachtmann DP, Goodger JQD, 2008. Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science* 13: 281-287.)
- Schultz HR, 2003. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell and Environment* 26: 1393-1405.
- Schultz HR, 2007. Climate change: implications and potential adaptation of vine growth and wine composition. En: *Proceedings Congress on Climate and Viticulture*. Centro de Transferencia Agroalimentaria, 87–92 (Zaragoza, España).
- Schultz HR. 1996. Water relations and photosynthetic responses of two grapevine cultivars of different geographical origin during water stress. *Acta Horticulturae* 427: 251-266.
- Sivilotti P, Bonetto C, Paladin M, Peterlunger E, 2005. Effect of soil moisture availability on Merlot: from leaf water potential to grape composition. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 9-18.
- Soar CJ, Speirs J, Maffei SM, Penrose AB, McCarthy MG, Loveys BR, 2006. Grapevine varieties Shiraz and Grenache differ in their stomatal response to VPD: apparent links with ABA physiology and gene expression in leaf tissue. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12: 2-12.

- Souza CR, Maroco J, Santos T, Rodrigues ML, Lopes C, Pereira JS, Chaves MM, 2005a. Control of stomatal aperture and carbon uptake by deficit irrigation in two grapevine cultivars. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 261-274.
- Souza CR, Maroco J, Santos T, Rodrigues ML, Lopes CM, Pereira JS, Chaves MM, 2005b. Impact of deficit irrigation on water use efficiency and carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of field grown grapevines under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany* 56: 2163-2172.
- Souza CR, Maroco JP, Santos T, Rodrigues ML, Lopes CM, Pereira JS, Chaves MM, 2003. Partial rootzone-drying: regulation of stomatal aperture and carbon assimilation in field grown grapevines (*Vitis vinifera* cv Moscatel). *Functional Plant Biology* 30: 653-662.
- Stines AP, Grubb J, Gockowiak H, Henschke PA, Høj PB, Heeswijck R van, 2000. Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 150-158.
- Stoll M, Loveys B, Dry P, 2000. Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* 51: 1627-1634.
- Symons G, Davies C, Shavrukov Y, Dry I, Reid J, Thomas M, 2006. Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiology* 140: 150-158.
- Syvertsen JP, Lloyd J, McConchie C, Kriedemann PE, Farquhar GD, 1995. On the relationship between leaf anatomy and  $\text{CO}_2$  diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell and Environment* 18: 149-157.
- Talcott S, Lee J, 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3186–3192.
- Thomas TR, Matthews MA, Shackel KA, 2006. Direct in situ measurement of cell turgor in grape (*Vitis vinifera* L.) berries during development and in response to plant water deficits. *Plant, Cell and Environment* 29: 993-1001.

- Treeby M, Holzappel BP, Walker RR, Nicholas PR, 1998. Profiles of free amino acids in grapes of grafted Chardonnay grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 121-126.
- Vandeleur RK, Mayo G, Shelden MC, Gilliam M, Kaiser BN, Tyerman SD. 2009. The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiology* 149: 445-460.
- Vezzuli S, Civardi S, Ferrari F, Bavaresco L, 2007. Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* 58: 530–533.
- Vogt T, 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.
- Wang Z, Deloire A, Carbonneau A, Federpiel B, López F, 2003. An in vivo experimental system to study sugar phloem unloading in ripening grape berries during water deficiency stress. *Annals of Botany* 92: 523-528.,
- Waterhouse AL, 2002. *Wine phenolics*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957: 21-36.
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C, 2009. The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 195-204.
- Wilkinson S, 2004. Water use efficiency and chemical signalling. En: *Water use efficiency in plant biology* (Ed. MA Bacon). Oxford: Blackwell Publishing/CRC Press 75-112.
- Wilkinson S, Davies WJ, 2002. ABA-based chemical signaling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 195-210.
- Wilkinson S, Hartung W, 2009. Food production: reducing water consumption by manipulating long-distance chemical signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 60: 1885-1891.



Williams LE, Matthews MA, 1990. Grapevine. En: *Irrigation of agricultural crops* (Eds. BA Stewart, DR Nielsen). ASA Madison, Wisconsin, EE.UU. Agronomy Monograph No. 30, pp. 1019-1055.

Yokotsuka K, Nagao A, Nakazawa K, Sato M, 1999. Changes in anthocyanins in berry skins of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes grown in two soils modified with limestone or oyster shell versus a native soil over two years. *American Journal of Enology and Viticulture* 50: 1-12.



## ***2. OBJETIVOS***

---



La producción de metabolitos secundarios en vid puede mejorar en situaciones de factores de estrés abiótico como la sequía edáfica, pero la sensibilidad de las plantas a estas condiciones varía en función del momento de imposición de la limitación hídrica. En estudios anteriores hemos observado una estrecha relación entre el régimen hídrico de la cepa, los niveles hormonales de la baya y la maduración de la uva (Antolín y col. 2006, 2008). Por lo tanto, el **objetivo general** de este trabajo ha sido investigar si las alteraciones en la composición y calidad de diferentes variedades de vid sometidas a riego deficitario, implantado en diversos momentos del desarrollo y maduración de la uva, pueden explicarse a través de los cambios que el estrés produce en el balance hormonal de la baya.

En el trabajo se han planteado los siguientes **objetivos parciales**:

1. Comparar los efectos del riego deficitario sobre la composición fenólica de las bayas a lo largo del desarrollo y maduración en dos variedades de uva tinta, Tempranillo y Graciano.
2. Investigar la influencia de las hormonas vegetales sobre el crecimiento y maduración de la baya en condiciones de riego deficitario y caracterizar la evolución de los compuestos nitrogenados en la variedad Tempranillo.
3. Relacionar los cambios en el balance hormonal y la composición de la baya con la respuesta a déficits hídricos impuestos en diferentes momentos del desarrollo de la uva valorando así la sensibilidad fenológica de ambas variedades a la escasez de agua en el suelo.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---





### 3.1. MATERIAL VEGETAL

#### 3.1.1. Cultivares de *Vitis vinifera* L.

La uva Tempranillo, es una variedad tinta cultivada extensamente para producir vinos tintos con cuerpo en España, de donde es originaria. Ocupa una superficie de cultivo de 31.046 hectáreas, lo que supone un 61% de la D.O. Calificada Rioja, con un aumento progresivo en los últimos años en detrimento de otras variedades. Se considera autóctona de Rioja. Es la principal uva usada en La Rioja, y a menudo se la menciona como la "uva noble" de España. Su nombre hace referencia al hecho de que madura varias semanas antes que la mayor parte de las variedades de uva tinta españolas. Es una cepa vigorosa, con un racimo de tamaño medio, compacto y alargado. La baya es de forma redonda y con piel de consistencia media. El vino procedente de esta variedad es equilibrado, de color intenso, con poca intensidad, acidez y graduación alcohólica media-alta de entre 10 y 12° (Bujan 2003).

Graciano es una variedad de poco rendimiento, por lo que no es muy abundante, y suele cultivarse en el mismo viñedo con otras variedades. El origen de Graciano es incierto, pero se cree que apareció en La Rioja. Forma parte de los ensamblajes de vinos gran reserva de las denominaciones de origen Rioja y Navarra. En España produce bajas cosechas, pero es un componente clave de los grandes reservas de Rioja y Navarra, aportando estructura y potencial para envejecer. La uva Graciano es una variedad *vinifera* muy recomendada en las comunidades autónomas de Navarra, País Vasco y La Rioja. Es una variedad de grandes aptitudes enológicas, pues aporta color, acidez y aromas a los vinos. La baya es redonda, de color negro intenso, tamaño pequeño, ceroso, hollejo fino, de carne dura e incolora y con pepitas muy gruesas. Los racimos poseen dos hombros cilíndricos cortos, producen una baja

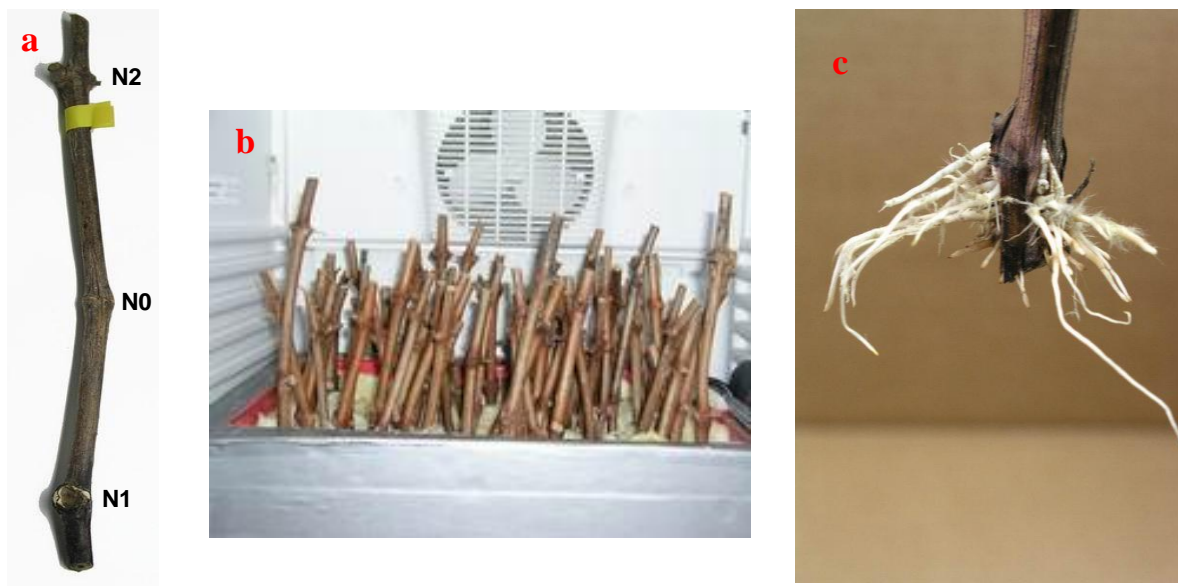
cantidad de bayas delicadamente aromatizadas y no son colgantes. La cepa tiene un buen vigor, brotación tardía y la vendimia suele tener lugar a mediados de octubre.

### **3.1.2. Obtención de esquejes fructíferos**

La vid es una planta de estructura y funcionamiento complejos, muy influenciada por las condiciones de cultivo y ambientales. Esto hace que los estudios a nivel fisiológico sean especialmente difíciles y que se requiera el desarrollo de técnicas que permitan cultivar la vid en condiciones controladas (Antolín y col. 2010). Mulins (1966) desarrolló un modelo en el que mediante un control severo del crecimiento vegetativo, se pueden obtener esquejes enraizados antes del desborre, así como un desarrollo prefloral de las inflorescencias. Esta técnica fue posteriormente modificada por Ollat y col. (1998) y Geny y col. (1998) para la variedad Cabernet Sauvignon y por Santa María (2004) para las variedades Garnacha y Tempranillo.

Los sarmientos de vid (*Vitis vinifera* L.) utilizados han sido de dos variedades viníferas, Tempranillo y Graciano. El material vegetal de ambas variedades se obtuvo en el momento de la poda (finales de Enero), en una parcela experimental de la Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA) en Olite, (Navarra). Una vez en el laboratorio, los sarmientos se cortaron en estaquillas de 3 nudos (N0, N1, N2) (Figura 19), seleccionando la parte central del sarmiento debido a una mejor organización de las yemas (Bouard 1966). Seguidamente se procedió a la desinfección de los sarmientos usando un fungicida de amplio espectro, Beltanol (Quinosol). Posteriormente, se guardaron los esquejes en una cámara fría a 5°C y oscuridad, con el objetivo de evitar el desborre de las yemas (Lavaud 1989).

En el momento de proceder al enraizamiento, se seleccionaron unos 170 esquejes por variedad y se hidrataron en agua a 30°C durante 12 horas; seguidamente se eliminaron las yemas de los nudos N0 y N1 para dejar solo la yema N2. Las bases de los esquejes se sumergieron durante 20 minutos en una solución de ácido indol-butírico (300 mg l<sup>-1</sup>), se introdujeron a la altura del N0 en una caja de enraizamiento que contenía un material aislante (lana de roca laxa) y se dejaron a 27°C, temperatura favorable para el enraizamiento. El conjunto se introdujo en una nevera a 5°C con el objetivo de evitar el desborre de la yema N2. Las estaquillas se regaron con agua tres veces por semana hasta que al cabo de un mes los esquejes tuvieron suficientes raíces para ser trasplantados.



**Figura 19.** Proceso de enraizamiento: (a) esqueje a 3 nudos, (b) dispositivo de enraizamiento, (c) estaquilla enraizada.

Tras el enraizamiento, se realizó una nueva selección dejando unos 140 esquejes por variedad y se trasplantaron a macetas de 830 cm<sup>3</sup> que contenían una mezcla de arena y perlita (1:1 v/v). Cuando apareció el racimo, se dejaron las mejores plantas (unas 110 plantas por variedad) que se trasplantaron de nuevo a unas macetas mayores (4 litros) que contenían una mezcla de suelo y turba (1:1) en las que permanecieron durante todo el ciclo de desarrollo. El suelo procedía de Olite (Navarra) y sus características principales se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Características principales del suelo (EVENA, Navarra).

Parámetro	
<i>Análisis físico</i>	
Humedad (%)	1,18
Arena gruesa (2-0, 2 mm) (%)	8,93
Arena media (0, 2-0, 1 mm) (%)	14,89
Arena fina (0, 1-0, 05 mm) (%)	15,63
Limos gruesos (0, 05-0, 02 mm) (%)	15,37
Limos finos (0, 02-0,002 mm) (%)	20,18
Arcilla (< 0,002 mm) (%)	24,99
Humedad (%)	1,18
Arena gruesa (2-0, 2 mm) (%)	8,93
Arena media (0, 2-0, 1 mm) (%)	14,89
Arena fina (0, 1-0, 05 mm) (%)	15,63
Limos gruesos (0, 05-0, 02 mm) (%)	15,37
Limos finos (0, 02-0,002 mm) (%)	20,18
<i>Análisis químico</i>	
pH agua (1:2,5)	8,18
pH KCl 1M (1-2,5)	7,52
C.E. (1:1) (dS m <sup>-1</sup> )*	0,27
C/N	10,87
Materia orgánica oxidable (%)	1,44
Carbonatos totales (%)	27,88
Caliza activa (%)	5,52
<i>Análisis mineral</i>	
P (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )(mg kg <sup>-1</sup> )	29,85
K (K <sub>2</sub> O) (mg kg <sup>-1</sup> )	251,03
N total (%)	0,08

C.E.: Conductividad eléctrica

El riego se realizó con la solución nutritiva recomendada por Ollat y col. (1998), cuya composición se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la solución nutritiva

Compuesto	Concentración
<i>Macronutrientes (g l<sup>-1</sup>)</i>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,045
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
KNO <sub>3</sub>	0,129
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,125
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,248
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,065
EDTA Férrico	0,125
<i>Micronutrientes(mg l<sup>-1</sup>)</i>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,860
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1,810
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,220
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,080
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	0,016

Las condiciones de crecimiento en invernadero fueron: humedad relativa 70%, 25/15°C día/noche, 14 horas de fotoperiodo y una densidad de flujo fotónico de 600  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  a la altura del N2.

### 3.1.3. Desarrollo de las plantas

Desde el desborre y hasta el cuajado de las bayas, los esquejes fueron sometidos a diversas manipulaciones. La finalidad de estas operaciones fue eliminar la competencia por las reservas de la madera y por los reguladores de crecimiento de otros órganos de la planta (hojas, zarcillos, yemas, otros racimos) con el único racimo. De esta forma se favoreció su buen desarrollo y maduración. A partir de la aparición de las primeras hojas, se eliminó cada una de ellas salvo la situada antes de la inflorescencia, que se dejó con el fin de garantizar un mejor desarrollo del racimo y evitar su posible atrofia (Figura 20).



**Figura 20.** Proceso de obtención de los esquejes fructíferos (adaptado de Antolín y col. 2010).

Transcurrida una semana desde el trasplante, se eliminaron el primer ápice vegetativo y la segunda inflorescencia. La extirpación del ápice vegetativo facilitó la emergencia de las yemas axilares de las hojas suprimidas, debido a la pérdida de la dominancia apical. Las yemas nacientes antes del racimo, fueron eliminadas y se dejó desarrollar aquella colocada frente a la inflorescencia. El brote de ésta será el responsable de la nutrición del racimo cuando sus hojas sean fotosintéticamente activas. El nuevo brote se dejó crecer hasta la aparición de la cuarta hoja. En este momento, se extirpó el segundo ápice vegetativo hasta que la planta alcanzó el estadio de cuajado (aproximadamente, 30 días desde el trasplante). A partir de entonces y hasta la maduración, se dejó crecer la planta libremente.

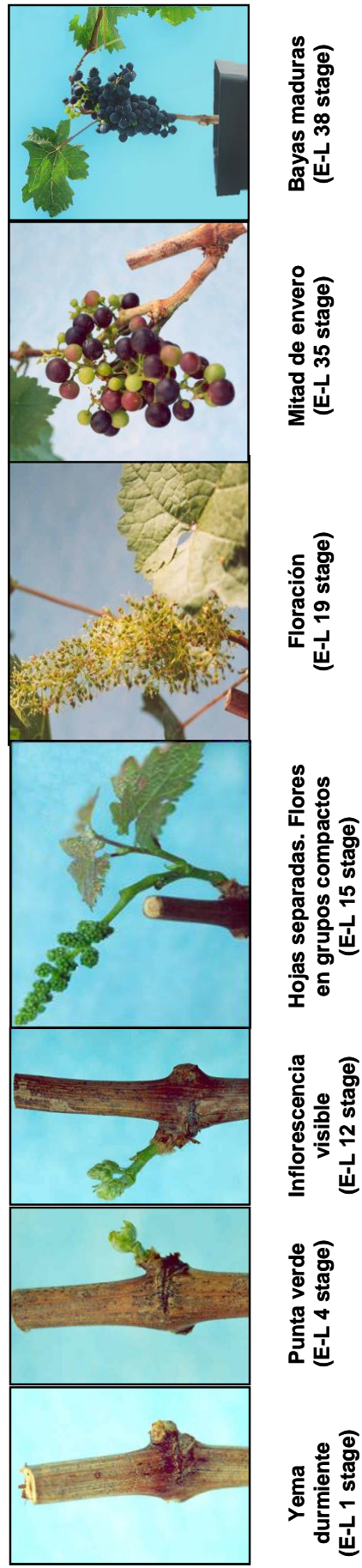


Figura 21. Principales fases de desarrollo de los esquejes fructíferos (adaptado de Antolín y col. 2010).

Gracias a esta técnica se puede conseguir desde el primer año la maduración del racimo, permitiendo además la obtención de más de una cosecha al año, lo que facilita la investigación en la fisiología de la vid. Así, la utilización de esquejes fructíferos para estudios fisiológicos en vid se ha revelado como un sistema adecuado de estudiar el efecto de los parámetros medioambientales con el control, rigor y repetitividad necesario para extraer conclusiones científicas válidas (Antolín y col. 2010). Con este cultivo se obtienen racimos perfectamente comparables a los de cepas procedentes del campo gracias al exhaustivo control de crecimiento vegetativo durante las primeras fases del desarrollo del esqueje. Tras 5 meses de crecimiento cada planta produce un racimo maduro, cuyo peso se ajusta a la relación peso fruto/ área foliar habitual (Figura 21).

## **3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL**

El trabajo se llevó a cabo en los invernaderos de la Universidad de Navarra, en condiciones ambientales totalmente controladas, utilizando esquejes fructíferos de vid. El estudio se realizó en dos variedades tintas de uva para vinificación, Tempranillo y Graciano.

### **3.2.1. Tratamientos**

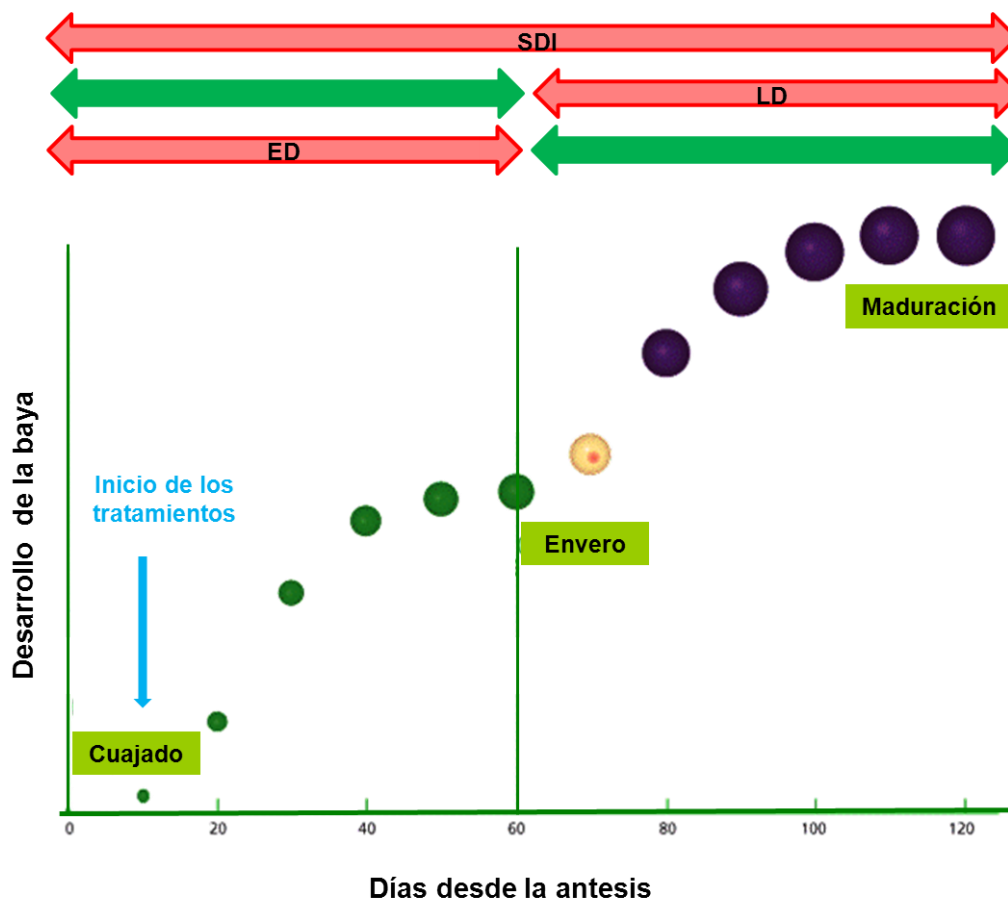
El diseño experimental constaba de series de plantas que crecieron en el invernadero bajo las condiciones descritas en el apartado anterior hasta después del cuajado del fruto. Cuando las bayas alcanzaron un diámetro de 2 mm, que corresponde al estadio 27 de la escala Eichhorn y Lorenz (E-L) descrita por Coombe (1995) se impusieron los diferentes niveles de riego:



- Control: las plantas recibieron el agua necesaria para un desarrollo adecuado aportando diariamente la cantidad necesaria para mantener el 80% de la capacidad de campo (máxima agua que puede retener un suelo).
- Riego deficitario regulado (*regulated deficit irrigation*, RDI): las plantas recibieron la mitad de agua que las plantas control aplicando diariamente el 50% del agua aportado en el tratamiento control.

EL tratamiento de riego deficitario se aplicó en diferentes momentos, por lo que los tratamientos resultantes fueron (Figura 22):

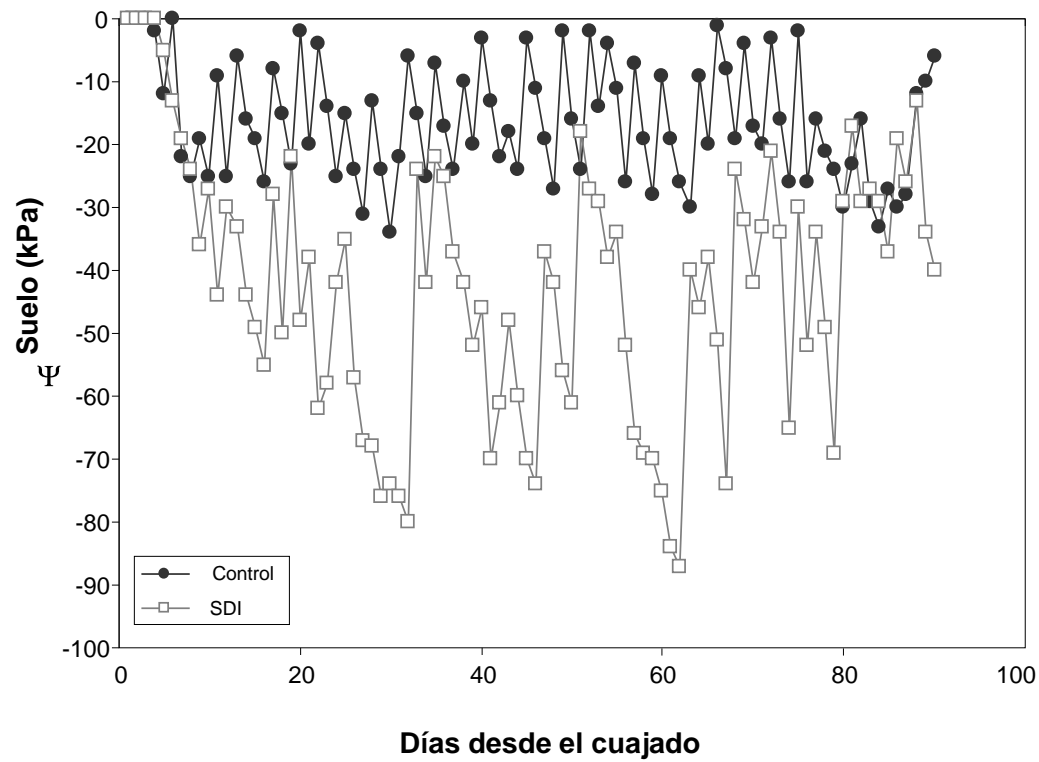
- 1) Riego deficitario sostenido (*sustained deficit irrigation*, SDI): el riego deficitario se aplicó desde el cuajado hasta el momento de la cosecha, por lo que sus efectos se prolongaron durante el crecimiento y la maduración de la baya.
- 2) RDI pre-envero (*early deficit*, ED): el tratamiento se aplicó desde el cuajado hasta el comienzo del envero. A partir de ese momento se restableció el régimen hídrico como en las plantas control, por lo que el déficit hídrico afectó únicamente a la fase de crecimiento herbáceo de la baya.
- 3) RDI post-envero (*late deficit*, LD): la reducción en el suministro de agua se inició en el envero y se prolongó hasta la cosecha, de forma que el déficit hídrico sólo afectó a la fase de maduración de la baya.



**Figura 22.** Diseño de los tratamientos de riego aplicados: riego deficitario sostenido (SDI), riego deficitario post-envero (LD) y riego deficitario pre-envero (ED).

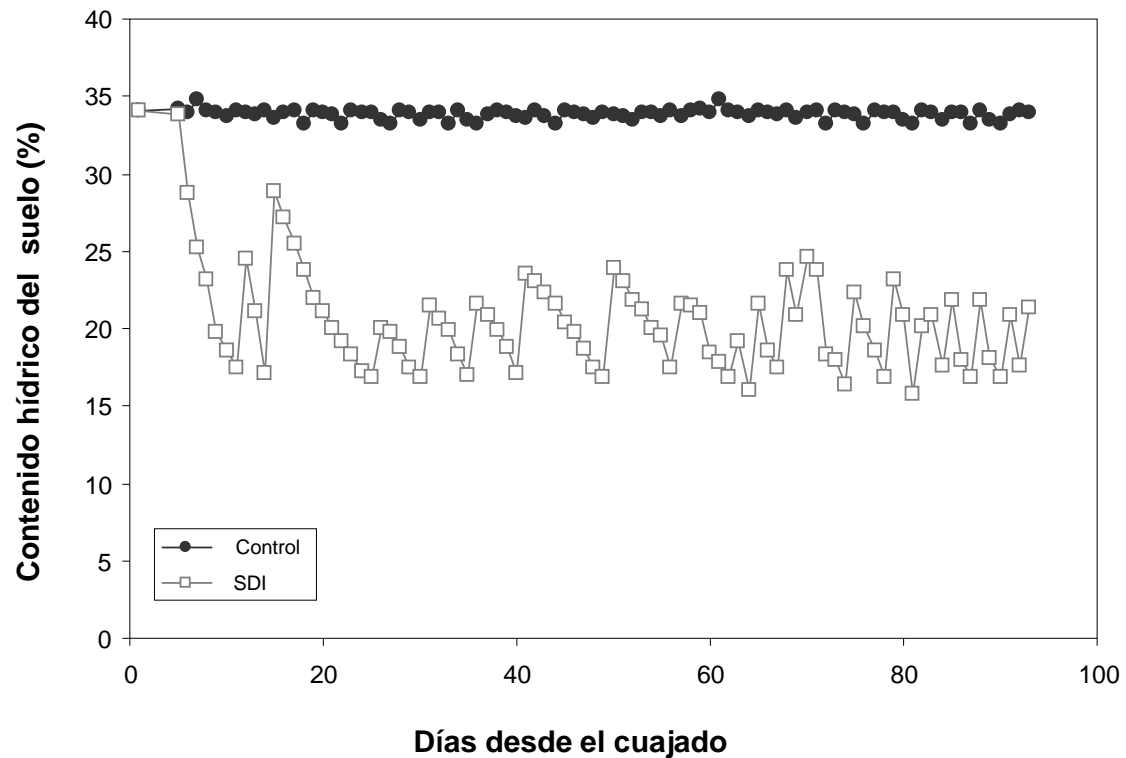
### 3.2.2. Control del estado hídrico del suelo

El estado hídrico se cuantificó mediante la instalación de un sensor de humedad de suelo en cada una de las macetas, de la marca Watermark Soil Moisture (Irrometer Co, Riverside, California, EE.UU.). El nivel del agua en cada maceta se consideró óptimo cuando el sensor marcaba valores por debajo de 20 kPa. Esta cantidad fue determinada gravimétricamente y corregida cada semana con el fin de adaptarla a las nuevas necesidades evaporativas generadas por el crecimiento vegetativo de la planta (Figura 23).



**Figura 23.** Evolución del potencial hídrico ( $\Psi$ ) del suelo medido a lo largo de los experimentos. Los tratamientos de riego fueron: Control y riego deficitario sostenido (SDI).

También se utilizaron sensores de humedad del suelo EC-5 (Decagon Devices, Inc., Pullman, Washington, EE.UU.) que registraban directamente el contenido volumétrico de agua en el suelo (Figura 24).



**Figura 24.** Evolución del contenido volumétrico de agua en el suelo medido a lo largo de los experimentos. Los tratamientos de riego fueron: Control y riego deficitario sostenido (SDI).

### 3.2.3. Determinaciones fisiológicas

Se obtuvieron muestras de bayas recogidas en distintas etapas a lo largo del desarrollo y maduración de la baya. Se definieron los siguientes estadios fenológicos (Figuras 25 y 26):

- Cuajado: momento en que las bayas tenían aproximadamente unos 2 mm de diámetro (E-L 27).
- Tamaño guisante: momento en que las bayas alcanzaban valores alrededor de 7 mm de diámetro (E-L 31).
- Inicio del envero: momento en que las bayas verdes comienzan a cambiar de color (aproximadamente 9° Brix) (E-L 35).
- Final del envero: momento en que las bayas aparecen totalmente coloreadas (E-L 37).

- Maduración: momento en que las bayas alcanzaron valores de Brix de aproximadamente 22° (E- L 38).



Figura 25. Momentos de muestreo en Tempranillo: cuajado (a), tamaño guisante (b), envero (c), maduración (d).

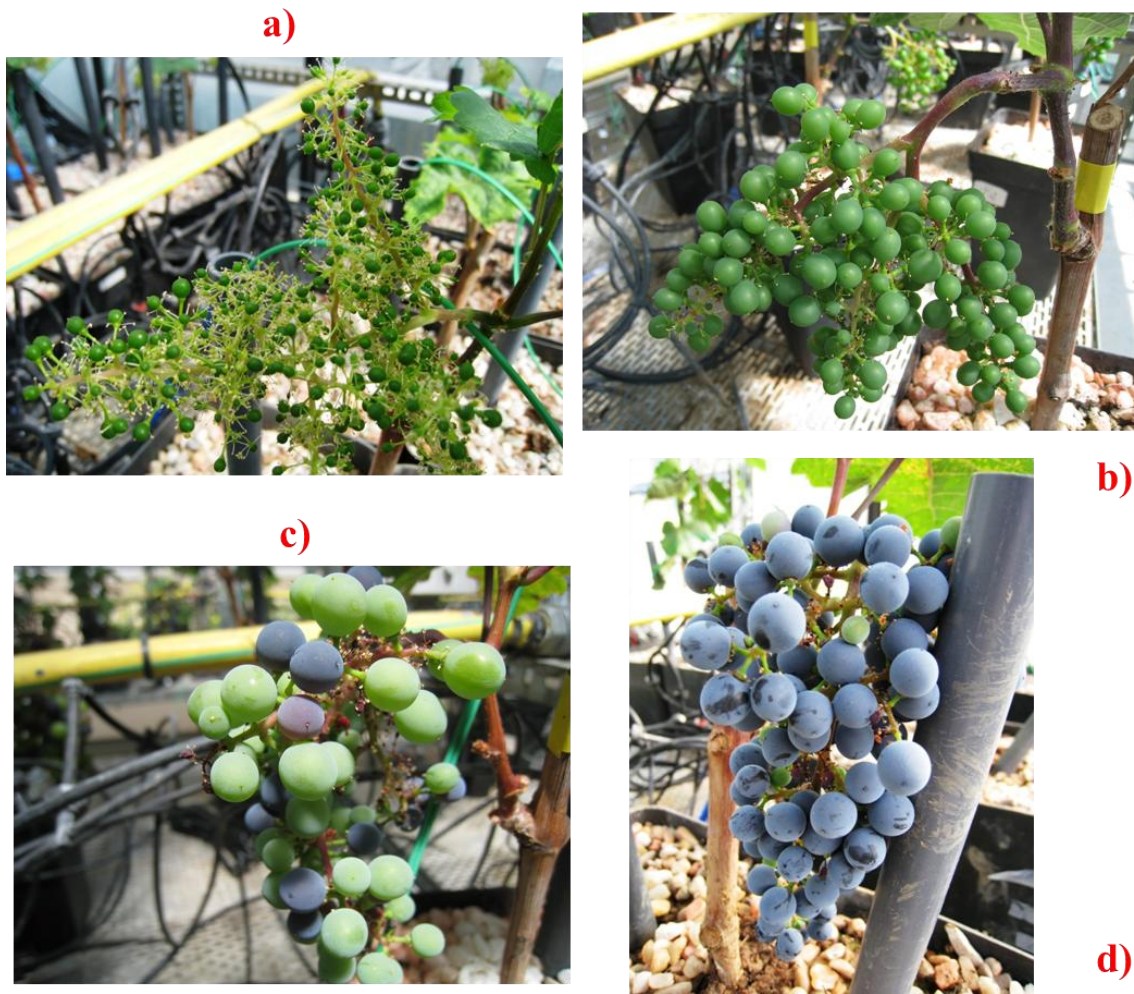


Figura 26. Momentos de muestreo en Graciano: cuajado (a), tamaño guisante (b), envero (c), maduración (d).

### 3.3. MEDIDAS DE ESTADO HÍDRICO EN LA PLANTA

#### 3.3.1. Potencial hídrico foliar

Para la determinación del potencial hídrico foliar ( $\Psi$ ) se utilizó el método de la cámara de presión de Scholander y col. (1965). La cámara de presión empleada fue una SKYE SKPM 1400 (Powys, Reino Unido) con una precisión de 0,05 MPa. Las medidas del  $\Psi$  se realizaron en la primera hora después del amanecer. La hoja se separó del tallo cortando el peciolo con una

cuchilla afilada, de modo que la sección fuese limpia. Actuando con rapidez y trasladando el material en bolsas de plástico cerradas con el propósito de que no se modificase el valor real del  $\Psi$  de la hoja, se colocó el peciolo en el tapón y se ajustó éste a la tapa de la cámara. Una vez cerrada la cámara se aplicó presión, vigilando constantemente la superficie del corte del peciolo con la ayuda de una lupa binocular de 15 aumentos. En el momento justo en el que el agua afloraba en el corte del peciolo se cerró la válvula de la cámara y se anotó la presión que marcaba en el manómetro, que correspondía al valor del  $\Psi$  de la planta.

### 3.3.2. Contenido hídrico relativo

El contenido hídrico relativo (CHR) determina la cantidad de agua que posee un tejido en relación a la máxima cantidad que puede tener. De esta manera, se pueden comparar tejidos diferentes, por ejemplo de diferentes especies o tratamientos. La metodología utilizada fue descrita por Weatherley (1970).

Para realizar las medidas se tomaron las muestras de hoja y se pesaron en una balanza de precisión para conocer su materia fresca (MF). A continuación, las hojas se introdujeron en tubos de fondo plano que contenían algodón humedecido con agua destilada, de tal forma que la base del peciolo estuviera en contacto con el algodón húmedo. Los tubos se taparon con tapones de goma. Los tubos (con las hojas) se dejaron equilibrar durante 24 horas a 4°C y en la oscuridad, para evitar variaciones en la materia seca (MS) inicial. Una vez transcurrido ese período de tiempo, se extrajeron las muestras y se pesaron para así obtener la materia turgente (MT). Por último, las hojas se introdujeron en una estufa a 85°C durante 48 horas con el fin de obtener la MS. El CHR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CHR} = (\text{MF} - \text{MS} / \text{MT} - \text{MS}) \times 100$$

### **3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA BAYA**

La caracterización de la baya se realizó mediante la cuantificación de los siguientes parámetros:

#### **3.4.1. Tamaño de la baya**

El tamaño de la baya se estimó a partir de la relación entre la MF del racimo y el número de bayas. Además, se calculó la proporción de hollejo en la baya como el cociente entre la MF del hollejo y la MF de la baya.

#### **3.4.2. Volumen de la baya**

En cada racimo se eligieron al azar 10 bayas y de cada una se midió el diámetro. El volumen se calculó mediante la fórmula del volumen de una esfera ( $\frac{4}{3} \pi r^3$ ) donde r era el radio de la esfera.

#### **3.4.3. Contenido hídrico de la baya**

A partir de los datos de materia fresca (MF) y seca (MS) se calculó el contenido hídrico (CH) de la baya:

$$CH = [(MF - MS) / MF] \times 100$$



### 3.5. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA UVA

Parte de los análisis de la composición de la uva se realizaron en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja y CSIC), Logroño, bajo la dirección de la Dra. Belén Ayestarán Iturbe.

#### 3.5.1. Preparación de extractos

En cada uno de los estadios fisiológicos elegidos se separaron muestras de 50 bayas por tratamiento y se pesaron, congelaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. Las muestras se homogeneizaron con un mezclador Ultra Turrax (IKA, Satufen, Alemania) a  $5500\text{ g}$  durante 1 minuto. Después, se tomó un gramo de la mezcla y se colocó dentro de un tubo de centrífuga junto con 10 ml de etanol diluido en agua destilada (50% v/v, pH 2,0) (Iland y col. 2004). La muestra se dejó macerar durante una hora en un baño de ultrasonidos (Bandelin, Berlin, Alemania) y posteriormente se centrifugó a  $2300\text{ g}$  durante 15 minutos en una centrífuga Sorvall RC 6 Plus (Du Pont, BH, Alemania). El sobrenadante obtenido constituyó el extracto hidroalcohólico utilizado para los análisis de compuestos fenólicos, aminoácidos, aminas y amonio por cromatografía líquida de alta eficacia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC).

#### 3.5.2. Análisis de compuestos fenólicos

##### 3.5.2.1. Análisis por HPLC

Se tomaron 2 ml de los extractos hidroalcohólicos y se fraccionaron mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) en una columna Toyopearl gel HP-50F (Tosohaas, Montgomery-

Ville, Pensilvania, EE.UU.) siguiendo el protocolo descrito por Guadalupe y col. (2006). Una primera fracción (F1) se eluyó con una mezcla de etanol/agua/ácido trifluoroacético (55:45:0,05, v/v) mientras que una segunda fracción (F2) se recuperó con acetona/agua (60:40, v/v). Posteriormente ambas fracciones se desecaron al vacío. La fracción F1 se utilizó para cuantificar compuestos fenólicos monoméricos y la fracción F2 se empleó para determinar la concentración de proantocianidinas. Todas las muestras se fraccionaron por duplicado.

Las antocianinas, los ácidos hidroxicinámicos, los flavonoles y los flavan-3-oles se determinaron siguiendo la metodología desarrollada por Guadalupe y Ayestarán (2008) y Fernández y col. (2011). Los compuestos fenólicos de la fracción F1 se separaron y cuantificaron por cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (*HPLC with Diode-Array Detection*) (HPLC-DAD) utilizando un cromatógrafo Agilent 1100 (Waldbronn, Alemania) equipado con un inyector G1313A, una bomba cuaternaria G1311A HPLC, un desgasificador en línea G1379A, un horno G1316A y un detector de arreglo de fotodiodos G1315B. Se utilizó una columna en fase inversa Kromasil 100-C18 de 200 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula, con una precolumna del mismo material (Teknokroma, Barcelona, Spain) termostregulada a 30°C. La identificación individual de los diferentes compuestos fenólicos se realizó por HPLC acoplado con espectrometría de masas (*mass spectrometry, MS*) (HPLC-MS). La cuantificación final se realizó con el software Agilent Chemstation. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las proantocianidinas se analizaron en la fracción F2 utilizando el método de catálisis ácida en presencia de un agente nucleofílico (floroglucinol) seguido de detección por HPLC en fase inversa (Kennedy y Jones 2001). En este caso se utilizó una columna ACE HPLC (5 C18-HL) de 250 mm x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, con una precolumna del mismo material. El contenido total de proantocianidinas se calculó como la suma de todas las

subunidades resultantes de la floroglucinólisis y las subunidades terminales (catequina, epicatequina y epicatequina-galato) (Guadalupe y col. 2006). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### *3.5.2.2. Análisis por espectrofotometría*

Los polifenoles totales y las antocianinas totales y extraíbles se determinaron siguiendo el protocolo descrito por Saint-Cricq y colaboradores (1998), método frecuentemente utilizado en las bodegas y que ha sido validado como una buena estimación del color potencial del vino (Kontoudakis y col. 2010). Para ello, las bayas se dividieron en dos muestras que se homogeneizaron y se dejaron macerar durante 4 horas en una solución a pH 1 (HCl) y pH 3,2 (ácido tartárico) respectivamente. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron en las siguientes determinaciones. La concentración de polifenoles totales se obtuvo midiendo la absorbancia de la solución a pH 3,2 a 280 nm. en un espectrofotómetro. Las antocianinas se determinaron en ambos sobrenadantes tal y como propusieron Ribéreau-Gayon y Stonestreet (1965), midiendo la absorbancia a 520 nm. La concentración obtenida en la solución con pH 3,2 indica las antocianinas extraíbles, mientras que la medida a pH 1 refleja las antocianinas totales. La diferencia entre ambos datos se utilizó para calcular el porcentaje de extractabilidad (Salazar-Parra y col. 2010).

#### **3.5.3. Análisis de compuestos nitrogenados**

Los dos métodos utilizados se basaron en el descrito por Gómez-Alonso y col. (2007). El primero de ellos consistió en la separación por HPLC en fase inversa acoplado a un detector de absorbancia ultravioleta- visible (UV-Vis) de las aminoenonas formadas mediante la reacción

de los aminoácidos, las aminas y los iones amonio con el reactivo de derivatización dietil etoximetilén malonato (DEEMM).

Las aminoenonas derivadas se obtuvieron mediante la reacción de 1 ml del extracto hidroalcohólico obtenido anteriormente (apartado 3.5.1) con 1,75 ml de tampón borato 1M pH 9, 750  $\mu$ l de metanol, 20  $\mu$ l de estándar interno (ácido L-2-aminoadípico, 1 g l<sup>-1</sup>) y 30  $\mu$ l de DEEMM. La mezcla permaneció durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos y seguidamente se calentó a 70°C durante dos horas para permitir la completa degradación del exceso de DEEMM y de los subproductos del reactivo. La separación cromatográfica se realizó con una columna ACE HPLC (5 C18-HL) de 250 mm x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m termorregulada a 16°C a través de un gradiente binario donde el eluyente A consistió en una mezcla de tampón acetato 25 mM pH 5.8 y 0.02% azida sódica; el eluyente B estuvo compuesto por una mezcla de acetonitrilo (80:20 v/v). El gradiente se realizó con un flujo de 0,9 ml min<sup>-1</sup> tal y como se indica en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Gradiente de eluyentes utilizados en la separación de compuestos nitrogenados.

Tiempo (minutos)	0,0	20,0	30,5	33,5	65,0	73,0	78,0	82,0	90,0
Eluyente A (%)	90	90	83	83	60	28	18	0	0
Eluyente B (%)	10	10	17	17	40	72	82	100	100

Para la detección de los compuestos nitrogenados se utilizó un detector de arreglo de fotodiodos (DAD) G1315B a 280 y 300 nm. En estas condiciones se separaron, identificaron y cuantificaron 34 compuestos con una sola inyección: 24 aminoácidos, 9 aminas y el ión amonio. Los compuestos se identificaron según sus tiempos de retención y las características espectrales en UV-Vis de los derivados de sus correspondientes estándares, puesto que se

cuantificaron utilizando el método del estándar interno. Los análisis se realizaron por triplicado.

En el segundo método, las muestras vegetales se diluyeron previamente con una disolución de HCl 0,1 M y se pasaron por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . La derivatización se realizó con *o*-ftaldialdehído (OPA) y la separación por HPLC se llevó a cabo utilizando una columna de 150 mm x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 4,6  $\mu\text{m}$ , a través de un gradiente binario donde el eluyente A consistió en tampón fosfato y el eluyente B estuvo compuesto por una mezcla de acetonitrilo (80:20 v/v). En el caso de las aminas biógenas se utilizó el método recomendado por la Organisation Internationale de la Vigne et du Vin mediante detección por fluorescencia a las longitudes de onda de excitación (356 nm) y absorción (445 nm).

### **3.6. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS EN BAYAS**

Los análisis de la composición hormonal de la uva se realizaron en el Departamento de Ciencias Experimentales (Universitat Jaume I), Castellón, bajo la dirección del Dr. Aurelio Gómez-Cadenas.

#### **3.6.1. Procedimiento de extracción y purificación**

La concentración de ácido abscísico (ABA), ácido indol-3-acético (IAA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) en las bayas se analizó siguiendo la metodología descrita por Durgbanshi y col. (2005) y Montoliú y col. (2009).

Las bayas congeladas se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado y posteriormente se realizó un extracto con 0,5 gramos de la muestra y 5 ml de agua

ultrapura utilizando un homogeneizador (Ultra-Turrax, Ika-Werke, Staufen, Alemania). Antes de la extracción se añadió una mezcla de estándares para las diferentes hormonas analizadas que consistió en 100 ng of [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA, 5 ng of [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-IAA, 100 ng of [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-SA and 100 ng of [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-JA con el objetivo de calcular el porcentaje de recuperación. Los extractos se centrifugaron a 5000 *g* durante 10 minutos y al sobrenadante obtenido se le ajustó el pH a 3,0 con ácido acético. A continuación, el sobrenadante se dividió dos veces con el mismo volumen de dietil éter. La fase acuosa se descartó y la fracción orgánica se evaporó al vacío en un evaporador (Jouan, Saint-Herblain, France) a temperatura ambiente. El residuo sólido se resuspendió en 1 ml de una solución de agua/metanol (9:1, v/v) y se pasó a través de un filtro de acetato de celulosa de 0.22 µm. Esta solución (20 µl) se inyectó directamente en el equipo de HPLC (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, EE.UU).

### **3.6.2. Separación y cuantificación de hormonas**

Para la separación de las diferentes hormonas se empleó una columna en fase inversa Kromasil 100 C18 (Teknokroma, Barcelona, Spain) de 200 x 2,1 mm y 5 µm de tamaño de partícula, utilizando un eluyente compuesto por metanol y ácido acético glacial (0,05%) disueltos en agua ultrapura. El flujo fue de 300 µml min<sup>-1</sup> y el gradiente se realizó como se indica en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Gradiente de eluyentes utilizados en la separación de hormonas.

Tiempo (minutos)	0	10	14	16	21
Metanol (%)	10	60	80	80	10
Ácido acético glacial (%)	90	40	20	20	90

Se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Quattro LC, Micromass Ltd., Manchester, Reino Unido) que operaba en modo de electrospray de ionización negativa. Las hormonas vegetales se cuantificaron según se detalla en Durgbanshi y col. (2005).

### 3.7. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA UVA

Para medir los parámetros de calidad de la uva se procedió a una trituración mecánica de una muestra de bayas por tratamiento, seguida de centrifugación a 4°C y 1000 g durante 10 minutos.

La concentración de sólidos solubles totales se estimó a partir de la medida del grado Brix utilizando un refractómetro ZUZI, modelo 315. La acidez total del mosto se midió mediante la neutralización volumétrica de la muestra con NaOH 0,1 N utilizando azul de bromotimol como indicador de pH (Ough y Amerine, 1988). El resultado se expresó en g l<sup>-1</sup> de ácido tartárico. El pH se midió con un pHmetro digital ORION SA 720 (Beverly, Massachusetts, EE.UU.).

## **3.8. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN**

### **3.8.1. Producción de materia seca**

Para estimar el crecimiento de la planta se determinó la producción de materia seca (MS) de las diferentes partes de cada planta. Los componentes que se separaron fueron: bayas (hollejo y pulpa), hojas, raquis, brote, sarmiento y raíces. Tras cuantificar la materia fresca (MF) se empaquetaron los diferentes componentes de la planta y se introdujeron en una estufa a 85°C donde permanecieron hasta que se obtuvo un peso constante. Pasado este tiempo se pesaron en una balanza KERN 474 (Balingen-Frommern, Alemania) con una precisión de 0,1g.

### **3.8.2. Determinación del área foliar**

El área foliar se midió utilizando un medidor de área LI-COR modelo LI-3000 (Lincoln, Nebraska, E.E.U.U.). Puesto que previamente se había obtenido una buena correlación ( $r = 0.97$ ) entre la longitud del nervio central de la hoja y su área en cada cultivar, el área foliar total se calculó a partir de la longitud del nervio central de todas las hojas aplicando posteriormente las ecuaciones de regresión previamente obtenidas.

### **3.8.3. Componentes de la producción**

Los componentes de la producción se obtuvieron a partir de la materia fresca (MF) del racimo, el número de bayas y la materia fresca (MF) de bayas por planta. Las medidas se realizaron utilizando una balanza KERN 474 (Balingen-Frommern, Alemania) con una precisión de 0,1 g.



### 3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron utilizando el programa "SPSS®" versión 15.0 para Windows 7. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de un criterio. Mediante este test, se calculó la existencia de diferencias significativas al 5% entre los tratamientos. En el caso de haber dos factores, se realizó un ANOVA de dos criterios, que indicaba la existencia de diferencias significativas para cada uno de los mismos, así como la interacción entre ellos. Para especificar entre qué tratamientos de cada criterio se daban las diferencias, se siguió con un test *a posteriori* (t de Tukey). En este caso, se obtuvo un valor de "t" tabulado para un número de grados de libertad igual al sumatorio de los n-1 datos de los tratamientos comparados y para una significación igual a 0,5. Cualquier grupo de medias correspondientes a tratamientos distintos que mostrara un "t" que fuera superior al valor de "t" obtenido, se consideró significativamente diferente con una probabilidad menor de 0,05. La nomenclatura utilizada fue: letras iguales para diferencias no significativas, y diferentes cuando sí las hubo. El valor más alto fue designado con la letra a y el resto de los valores, en orden alfabéticamente decreciente.

### 3.10. REFERENCIAS METODOLÓGICAS

- Antolín MC, Santesteban H, Ayari M, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, 2010. Grapevine fruiting cuttings: an experimental system to study grapevine physiology under water deficit conditions. En: *Methodologies and Results in Grapevine Research*. (Eds. S Delrot, H Medrano Gil, E Or, L Bavaresco, S Grando), Springer Science+Business Media B.V., pp. 151-163.
- Bouard J, 1966. Recherches physiologiques sur la vigne et en particulier sur l'aoûtament des sarments. Tesis doctoral, Universidad de Burdeos.
- Bujan J, 2003. Guía de la nueva cultura del vino. Barcelona.
- Coombe BG, 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 104-110.
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A, 2005. Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8437-8442.
- Fernández O, Martínez O, Hernández Z, Guadalupe Z, Ayestarán B, 2011. Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Research International* 44: 84-91.
- Gény L, Ollat N, Soyer JP, 1998). Les boutures fructifères de vigne: validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. II. Étude du développement de la grappe. *Journal International de Science de la Vigne et du Vin* 32: 83-90.
- Gómez-Alonso S, Hermosín I, García-Romero E, 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ion as aminoenones derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 608-613.

- Guadalupe Z, Ayestarán B, 2008. Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. Cv. "Tempranillo" during vinification and aging. *European Food Research and Technology* 228: 29-38.
- Guadalupe Z, Soldevilla A, Sáñez-Navajas MP, Ayestarán B, 2006. Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography* 1112: 112-120.
- Iland P, Bruer N, Edwards G, Weeks S, Wilkes E, 2004. Chemical analysis of grapes and wine techniques and concepts. Patrick Iland wine promotions. Campbelltown, Australia.
- Kennedy JA, Jones GP, 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1740-1746.
- Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F, 2010. Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta* 660: 127-133.
- Lavaud JJ, 1989. Influence de la conservation au froid des sarments de *Vitis vinifera* L. var Ugni Blanc sur les constituants lipidiques des boutures en cours de la rhizogénese. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 23: 67-75.
- Montoliú A, López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A, 2009. A novel in vitro tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *Plant Growth Regulation* 59: 179-187.
- Mullins MG, 1966. Test-plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature* 209: 419-420.
- Ollat N, Gény L, Soyer JP, 1998. Les boutures fructifères de vigne: validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. I. Principales caractéristiques de l'appareil végétatif. *Journal International de Science de la Vigne et du Vin* 32: 1-9.
- Ough CS, Amerine MA, 1988. *Methods for analysis of musts and wines*. Wiley, New York.

- Ribéreau-Gayon J, Stonestreet E, 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. Bulletin de la Société de Chimie 9: 2649–2652.
- Saint-Cricq N, Vivas N, Glories Y, 1998. Maturité phénolique: définition et contrôle. Revue Franc, aise d'Oenologie 173: 22–25.
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F, 2010. Effects of climate change scenarios on Tempranillo grapevine (*Vitis vinifera* L.) ripening: response to a combination of elevated CO<sub>2</sub> and temperature, and moderate drought. Plant and Soil 337: 179-191.
- Santa María E, 2004. Incidencia de *Botrytis cinerea* en relación con diferentes aspectos fisiológicos de la vid. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra.
- Scholander PF, Hammel HT, Badstreet ED, Hemmingsen EA, 1965. Sap pressure in vascular plants. Science 148: 339-346.
- Wheatherley PE, 1970. Some aspects of water relations. Advances in Botanical research 3: 171-206.

**4. CHARACTERIZATION OF PHENOLIC COMPOSITION OF  
*Vitis vinifera* L CV. TEMPRANILLO AND GRACIANO  
SUBJECTED TO DEFICIT IRRIGATION DURING BERRY  
DEVELOPMENT**

---

“CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE *Vitis vinifera* L. CV.  
TEMPRANILLO Y GRACIANO SOMETIDAS A RIEGO DEFICITARIO DURANTE  
EL DESARROLLO DE LA BAYA”

*(Preparado para enviar a Journal of Agricultural and Food Chemistry)*

---



## **RESUMEN**

El objetivo del estudio ha sido evaluar la respuesta al déficit hídrico de la composición fenólica de dos variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cv. Tempranillo y Graciano durante el desarrollo y la maduración de la baya. El estudio se llevó a cabo con esquejes fructíferos cultivados bajo condiciones controladas en un invernadero. Se impusieron dos niveles de riego: control (bien regado) y riego deficitario sostenido (SDI). Se identificaron 28 compuestos fenólicos, incluyendo antocianinas, flavonoles, flavan-3-oles y ácidos fenólicos en extractos del hollejo de las bayas. En ambas variedades, la aplicación del riego deficitario redujo el área foliar, la relación área foliar-peso del racimo y el tamaño de la baya. Sin embargo, no se detectaron cambios en los sólidos solubles totales, pH del mosto o el contenido en polifenoles totales. En Graciano, el déficit hídrico provocó un aumento en la proporción relativa de hollejo por baya y un descenso en la acidez titulable. En ambas variedades, la concentración de antocianinas y flavonoles aumentó durante la maduración mientras que los flavan-3-oles monoméricos (o catequinas) y los ácidos hidroxicinámicos se acumularon en la fase de tamaño guisante y después descendieron durante la maduración. En condiciones de déficit hídrico, las bayas de Graciano alcanzaron mayores concentraciones de antocianinas, flavonoles y catequinas y menor de ácidos hidroxicinámicos que Tempranillo. En conjunto, los datos obtenidos indican que en condiciones de riego deficitario, la composición fenólica de Graciano podría contribuir a incrementar la calidad del fruto de esta variedad.





## **ABSTRACT**

The response of phenolic composition of skins from *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo and Graciano grapes to water-deficit irrigation during berry growth and ripening was evaluated. The study was carried out using container-grown grapevines grown under controlled conditions in a greenhouse. Two irrigation treatments were imposed: control (well-watered) and sustained deficit irrigation (SDI). Twenty-eight phenolic compounds, including anthocyanins, flavonols and flavan-3-ols as well as phenolic acids derivatives, have been identified in the extracts prepared from the grapes at physiological maturity. In both varieties, water deficit application reduced leaf area and the leaf area to crop weight ratio and decreased berry size. However, there were no changes in total soluble solids, juice pH or total polyphenolic content. Water deprivation resulted in increased the relative skin mass and decreased must titratable acidity in Graciano berries. Anthocyanins and flavonols in both red varieties increased during berry ripening, while catechins and hydroxycinnamic acids were mainly accumulated at the pea size phase followed by decrease of the content with ripening. As compared to Tempranillo grape skins, water-stressed Graciano grape skins presented higher contents of total anthocyanins, flavonols and monomeric flavan-3-ols (catechins) and lower contents of hydroxycinnamic acids at harvest. Altogether, we concluded that under water-deficit irrigation, Graciano grapes present a differential composition of phenolic compounds that could have result in improved fruit quality.

*Keywords:* Anthocyanins, flavonols, hydroxycinnamic acids, Graciano grapes, sustained deficit irrigation, Tempranillo grapes.



## **Introduction**

Phenolic substances are of profound significance to both the technological and nutritional value of grapes and wines (Downey *et al.* 2006) and the different berry tissues (i.e., skin, pulp, and seeds) each confer unique properties to wine. The skin confers colour, aroma, and other organoleptic properties of wine. The pulp contributes the majority of sugars, which are transformed into alcohol during the fermentation process. In addition, skin and pulp tissues are the main source of volatile aroma compounds (Lund and Bohlmann 2006). The seed contains flavan-3-ols which contribute important organoleptic properties to wine (Fernández *et al.* 2007). Grape and wine phenolics consisted in two main classes: flavonoid and nonflavonoid compounds. Flavonoids, the most important family among grape phenols include anthocyanins, flavan-3-ols (including monomeric catechins and proanthocyanidins) and flavonols. Nonflavonoids derive primarily from the pulp and skins of berries and include hydroxycinnamic acids and stilbenes. Flavonoids are regarded as one of the most important determinants of quality in red grapes and wines. In recent year's flavonoid compounds have also attracted attention for their potential health benefits (Corder *et al.* 2006, Pezzuto 2008, Aron and Kennedy 2008, Kallithraka *et al.* 2009).

Anthocyanins are the main agents responsible for the colour of red grapes and the wines produced from them. The anthocyanin content and composition in grape berry skins is an important factor determining wine quality because individual anthocyanins have different characteristics with regard to colour or stability (reviewed by He *et al.* 2010). Among flavonoids, flavan-3-ols represent the largest class of monomeric compounds, and exist as non-glycosylated monomers (catechin), dimers, and polymers (proanthocyanidins or condensed tannins). They are located in the three compartments of the berry (skin, pulp and seeds) (Verries 2008), and play an important role in the taste and conservation of wine (Waterhouse 2002). Flavan-3-ols are also responsible for the bitterness, astringency and structure of wines

(Gawell 1998, Peleg *et al.* 1999). Although colourless, flavonols (mainly, quercetin, myricetin, kaempferol and isorhamnetin) seem to contribute to both bitterness and to wine colour as copigments (Boulton 2001, Hufnagel and Hofmann 2008), whereas that phenolic acids can participate in copigmentation (Schwarz *et al.* 2005).

The production of grapevine secondary metabolites can be impaired or magnified by abiotic stress factors such as drought. Thus, it has been demonstrated in grape that a moderate water restriction is useful to improve organoleptic quality of wine (Sivilotti *et al.* 2005, Chalmers *et al.* 2010). Changes in vine water status affected polyphenol amounts, indicating that cultural practices can be used to influence composition. Water deficit can enhance accumulation of anthocyanins, through the stimulation of anthocyanin hydroxylation (Chaves *et al.* 2010). Castellarin *et al.* (2007b) show that water deficits accelerated anthocyanin accumulation and increased the expression of many genes responsible for the biosynthesis of anthocyanins. Besides changes in anthocyanin contents, its individual composition changed in response to plant water status (Esteban *et al.* 2001, Castellarin *et al.* 2007a, b, Bindon *et al.* 2008, Ollé *et al.* 2011). On the other hand, the effects of water deficits on flavonol and proanthocyanidin concentrations were smaller than on anthocyanins, showing only a moderate effect on flavonols (Grimplet *et al.* 2007, Castellarin *et al.* 2007b) and proanthocyanidins (Downey *et al.* 2006, Chalmers *et al.* 2010, Ollé *et al.* 2011).

Grapevine grows well in arid and semi-arid environments because it has relatively high drought tolerance (Chaves *et al.* 2010) but physiological and metabolic responses of berries to water deficit appear to be dependent on the cultivar (Deluc *et al.* 2009). Spain hosts a large number of native *V. vinifera* varieties. However, most of those genotypes remain uncharacterized, which limits their ability to improve berry quality traits. Graciano is a Spanish variety traditionally used to improve wine mixtures containing other original varieties, giving

them more aromas, and a more refined quality (Cirami *et al.* 2000). There have been relatively few studies to date that have investigated the evolution of phenolic composition during ripening in Graciano (Monagás *et al.* 2003, Núñez *et al.* 2004) and its response to water deficit is poorly known. Sustained deficit irrigation (SDI) is a technique that could potentially be readily adopted by the wine grape industry if adequate yields and berry compositional attributes could be met (Ortega-Farias *et al.* 2012). Therefore, the current study has undertaken an investigation of phenolic composition during berry development and ripening of berries by characterizing the response of Tempranillo and Graciano (two Spanish original varieties) to a similar level of sustained water-deficit irrigation.

## **Materials and methods**

### *Plant material*

Dormant *Vitis vinifera* L. cuttings of cv. Tempranillo, 400-500 mm long and 15-20 mm in diameter, were selected in the winter of 2010. The cuttings were propagated by a technique that ensured that the formation of adventitious roots preceded bud burst using steps originally outlined in Mullins (1966), with some modifications described in Ollat *et al.* (1998) and Antolín *et al.* (2010). Cuttings were rooted in a heat-bed (25°C) inside a cool-room (5°C) for 30 days. Rooted cuttings were planted in 10-L plastic pots containing a soil-peat (1:1, v/v) potting mix. After rooting, cuttings were transferred to a greenhouse with a 25/20°C and 70/80% RH (day/night) regime. They were illuminated for 15 h with natural daylight supplemented with high-pressure sodium lamps (SON-T Agro Phillips, Eindhoven, the Netherlands), providing a minimum photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the level of the inflorescence. After berry set (end of May), growth conditions in the greenhouse were changed to a 25/15°C and 60/80% RH (day/night) regime with a PPFD of 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the level of inflorescence. A proper nutrient solution provided a mineral nutrition in accordance with viticulture requirements (Ollat *et al.* 1998).

Samples berries were collected at three stages of development: (1) pea size, corresponding to berries 7 mm in diameter [Eichhorn and Lorenz (E-L) growth stage 31] (Coombe 1995) [27 days after anthesis (DAA) for the two water treatments]; (2) onset of veraison corresponding to berries that began to colour and enlarge (approximately 9°Brix) [E-L growth stage 35] (60 and 65 DAA for water deficit and well-watered treatments, respectively); and (3) harvest corresponding to commercially ripe berries (approximately 22°Brix) [E-L growth stage 38] (100 and 105 DAA in well-watered and water-deficit treatments, respectively). There were five plants for each treatment and sampling-time combination from two biological replicates.

### Water treatments

Two water management treatments were applied 11 DAA, at fruit set [E-L stage 27] (Coombe 1995). In the control treatment, pots were maintained at 80% of pot capacity. Water-deficit treatment plants received 50% of the water given to control plants (sustained deficit irrigated, SDI) from fruit set to harvest. The resulting soil conditions during the experiments are shown in Fig. 1.

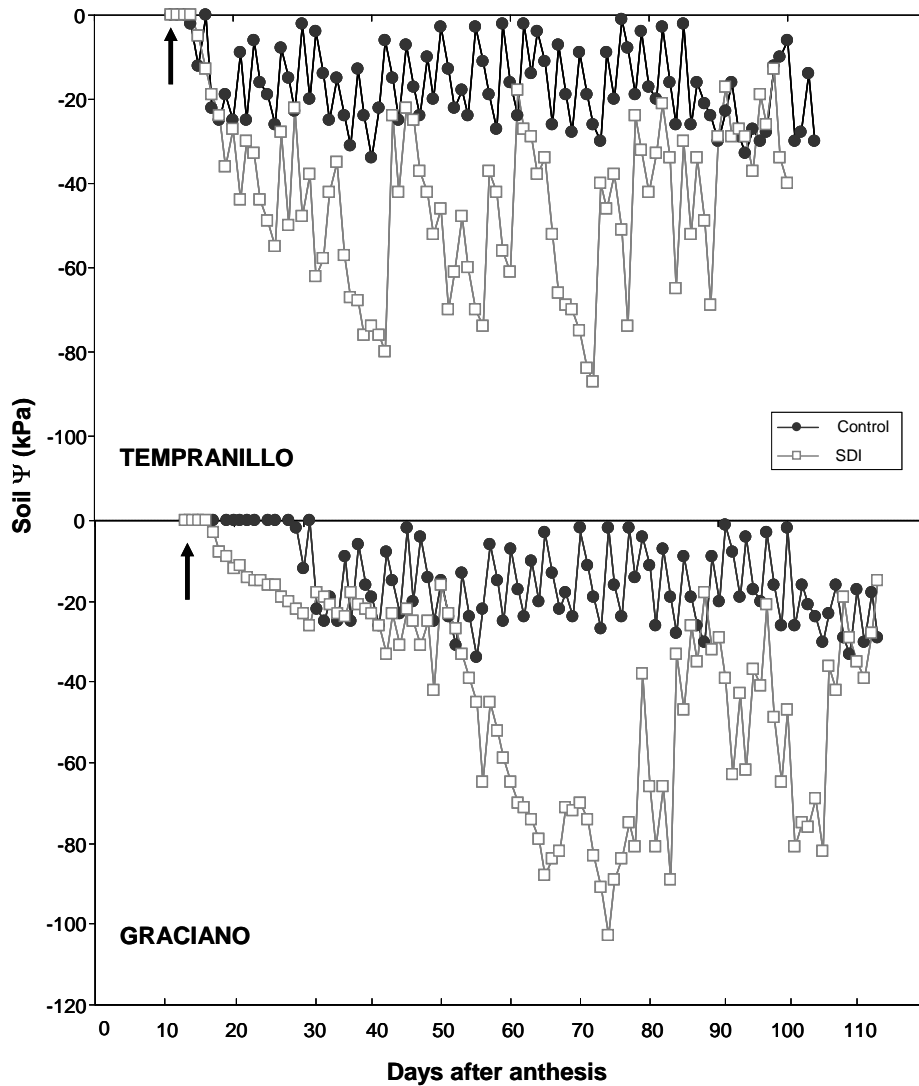


Figure 1. Soil water potential ( $\Psi$ ) measured from fruit set to harvest in pots subjected to different irrigation treatments: full irrigation (control) or sustained deficit irrigation (SDI). Values represent means ( $n = 5$ ). Arrow indicates start of water treatments.

Soil water potential ( $\Psi$ ) was monitored using a granular matrix sensor (Watermark Soil Moisture Sensor, Irrrometer Co, Riverside, CA, USA) placed within each pot. Pot capacity was previously assessed by determining the amount of water retained after allowing water to free drain through the holes at the bottom of the pot. The surface of the plant containers was covered with quartz stones during the experiments to avoid water loss due to evaporation. Watering was done by hand, providing a fixed volume of nutrient solution or deionised water so that the different treatments were supplied with the same amount of nutrients during water deficit.

Pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ) was measured with a SKYE SKPM 1400 pressure chamber (Powys, UK) on five fully expanded leaves per treatment at each sampling date just prior to irrigation. Ten berries from each treatment were collected, weighed, and subsequently oven-dried at 80°C until constant mass was reached. Berry water content was calculated as  $100 \cdot (FM - DM) / FM$ , where FM is fresh matter and DM is dry matter. Ninety to 100 berries from each treatment (45-50 berries per biological replicate) were counted, weighed, and frozen at -80°C for further analysis.

#### *Analysis of phenolic compounds*

Berry subsamples were homogenized using an Ultra Turrax grinder mixer (IKA, Staufen, Germany) at 5,500-g for 1 min. Thereafter, the homogenate (1 g) was transferred into a pretared centrifuge tube and 10 mL of 50% v/v aqueous ethanol (pH 2.0) was added (Iland *et al.* 2004). Maceration was then allowed for 1 h in an ultrasonic bath (Bandelin, Berlin, Germany). The tube was then centrifuged at 2,300 g for 15 min (Sorvall RC 6 Plus, Du Pont, BH, Germany) and the supernatant was named as the extract.



Hydroalcoholic extracts (2 mL) were directly fractionated by gel permeation chromatography (GPC) on a TOYOPEARL® gel HP-50F column (Tosoh, Montgomeryville, PA, USA) using the method described by Guadalupe *et al.* (2006). A first fraction (F1) was eluted with ethanol/water/trifluoroacetic acid (55:45:0.05 v/v/v) and a second fraction (F2) was recovered by elution with acetone/water (60:40 v/v). The two fractions were taken to dryness under vacuum and then the first fraction was used to quantify monomeric phenolics and the second one was used to determine the proanthocyanidin content. All samples were fractionated in duplicate.

Monomeric phenolic compounds in F1 fractions were analyzed by HPLC-DAD on an Agilent modular 1100 liquid chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with a G1313A injector, a G1311A HPLC quaternary pump, an online G1379A degasser, a G1316A oven, a G1315B photodiode array detector, and Agilent Chemstation software. A Kromasil 100-C18 reverse phase column (5- $\mu\text{m}$  packing, 200 x 4.6 mm i.d.), protected with a guard column of the same material (Teknokroma, Barcelona, Spain) and thermo-regulated at 30°C, was used. Individual phenolic compounds were identified by HPLC-MS. Anthocyanins, hydroxycinnamic acids, flavonols, and flavan-3-ols were determined as indicated by Guadalupe and Ayestarán (2008). Each measurement was run in triplicate.

#### *Yield and fruit quality*

Bunches from each treatment type were weighed and all berries from each bunch were separated and weighed to obtain yield. Berries were weighed individually, mean berry weight was determined and berries were separated into skin and flesh. Berry volume was calculated using the definition of a sphere ( $\frac{4}{3}\pi r^3$ , where  $r$  is the radius of the sphere). Leaf area was measured with a portable area meter (model LI-3000, Li-Cor, Lincoln, NE, USA).

A sample of 25 berries was crushed for determination of total soluble sugars, pH and titratable acidity. Soluble solids were analysed using a temperature-compensating refractometer (Zuzi model 315, Auxilab, Spain) and were expressed as °Brix. Must pH was measured with a pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain) standardised to pH 7.0 and 4.0. Finally, titratable acidity was measured by titration with NaOH, and was expressed as g tartaric acid L<sup>-1</sup>.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed by a two-factor analysis of variance (ANOVA). Variance was related to the main treatments (variety and irrigation treatment) and to the interaction between them. Means  $\pm$  standard errors (SE) were calculated, and when the F ratio was significant, least significant differences were evaluated by a Tukey *t*-test, as found in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 15.0 for Windows XP (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All values shown in the figures are means  $\pm$  SE.

## **Results and Discussion**

### *Water status, yield and plant growth*

In Tempranillo, water-deficit treatment provoked significant differences in water status at onset of veraison, as indicated by the decrease of leaf  $\Psi_{pd}$  in comparison to well-irrigated plants. However, these differences between treatments disappeared at harvest (Figure 2). In the case of Graciano, a significant drop of leaf  $\Psi_{pd}$  was detected only at harvest, indicating a late response of this variety to soil water drying. Plants subjected to SDI had reduced vegetative growth, as shown by the marked decrease in leaf area and the source to sink ratio (Table 1). In Tempranillo, the leaf area-to-crop weight ratio was ca. 11-19 cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>, close to optimal values (between 6.2 and 10 cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) of grapevine vigour reported by Smart and Robinson (2006). However, in Graciano, this ratio was above the optimum and it decreased below the optimum in SDI plants (ca. 7.5 cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). The SDI treatment also affected negatively berry weight (Figure 2) and berry volume, which reached 75% and 68% of the control berries in Tempranillo and Graciano, respectively (Table 1). In this latter variety, deficit irrigation also resulted in increased the relative skin mass. In Tempranillo, SDI has induced no changes in total soluble solids, juice pH or total polyphenolic content (Table 1). However, in Graciano water deprivation results in decreased must titratable acidity.

Table 1.

Main plant and berry characteristics, and composition recorded at harvest from fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control) or sustained deficit irrigation (SDI).

Measurement	Tempranillo		Graciano		Variety (V)	Irrigation (I)	V x I
	Control	SDI	Control	SDI			
<i>Vine vigour</i>							
Leaf area (m <sup>2</sup> plant <sup>-1</sup> )	0.37 a	0.11 c	0.23 b	0.09 c	***	***	nst
Leaf area/crop weight (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	19.1 b	11.2 c	56.2 a	7.5 b	***	***	***
<i>Berry characteristics</i>							
Berry volume (mm <sup>3</sup> )	969 a	735 b	667 b	455 c	**	*	ns
Berry water content (g water g <sup>-1</sup> FM, %)	87 a	88 a	85 ab	81 b	ns	ns	ns
Relative skin mass (% of berry FM)	30.1 a	35.3 a	16.5 b	30.7 a	***	***	ns
<i>Fruit composition</i>							
Total soluble solids (°Brix)	22 a	20 ab	19 b	20 ab	ns	ns	ns
Juice pH	3.7 a	3.7 a	2.7 b	3.0 b	***	ns	ns
Titratable acidity (g L <sup>-1</sup> )	5.8 b	4.6 b	9.5 a	4.6 b	*	***	*
Total polyphenols (mg L <sup>-1</sup> )	2.56 b	2.51 b	3.16 a	3.22 a	***	ns	ns

Values represent means (n = 5). Within each file, means followed by a different letter are significantly different (p<0.05) according to the Tukey's test. FM indicates fresh matter. †ns, \*, \*\* and \*\*\* indicate non-significance or significance at 5%, 1% and 0.1% probability levels, respectively.

Table 2.

Effect of irrigation treatment (SDI and control) on anthocyanin derivatives determined at harvest in grape berries of fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano.

	Tempranillo		Graciano		Variety (V)	Irrigation (I)	VxI
	Control	SDI	Control	SDI			
<i>3-Monoglucosides</i> ( $mg\ g^{-1}$ )	Delphinidin	0.250 a	0.092 b	0.229 a	0.183 a	***	ns
	Cyanidin	0.044 a	0.012 b	0.056 a	0.040 a	***	ns
	Petunidin	0.171 a	0.071 b	0.173 a	0.154 a	*	*
	Peonidin	0.089 b	0.042 c	0.140 a	0.163 a	***	**
	Malvidin	0.486 a	0.335 b	0.531 a	0.624 a	***	**
<i>3-Acetyl-glucosides</i> ( $mg\ g^{-1}$ )	Delphinidin	0.005 c	0.002 c	0.019 a	0.013 b	***	ns
	Cyanidin	0.001 c	0.001 c	0.005 a	0.004 b	*	**
	Petunidin	0.005 a	0.003 b	0.001 c	0.002 bc	*	***
	Peonidin	0.002 b	0.001 b	0.059 a	0.066 a	ns	ns
	Malvidin	0.015 a	0.016 a	0.010 b	0.011 b	ns	ns
<i>3 p-Coumaroyl-glucosides</i> ( $mg\ g^{-1}$ )	Delphinidin	N.D.	N.D.	0.021 a	0.020 a	***	ns
	Cyanidin	0.022 a	0.020 a	0.009 c	0.014 b	***	*
	Petunidin	0.003 d	0.007 c	0.020 b	0.025 a	***	ns
	Peonidin	N.D.	N.D.	0.014 b	0.028 a	***	***
	Malvidin	0.089 b	0.138 a	0.063 c	0.109 a	**	ns

Values represent means (n = 25). Within each file, means followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the Tukey's test. †ns, \*, \*\* and \*\*\* indicate non-significance or significance at 5%, 1% and 0.1% probability levels, respectively. ND: not detected.

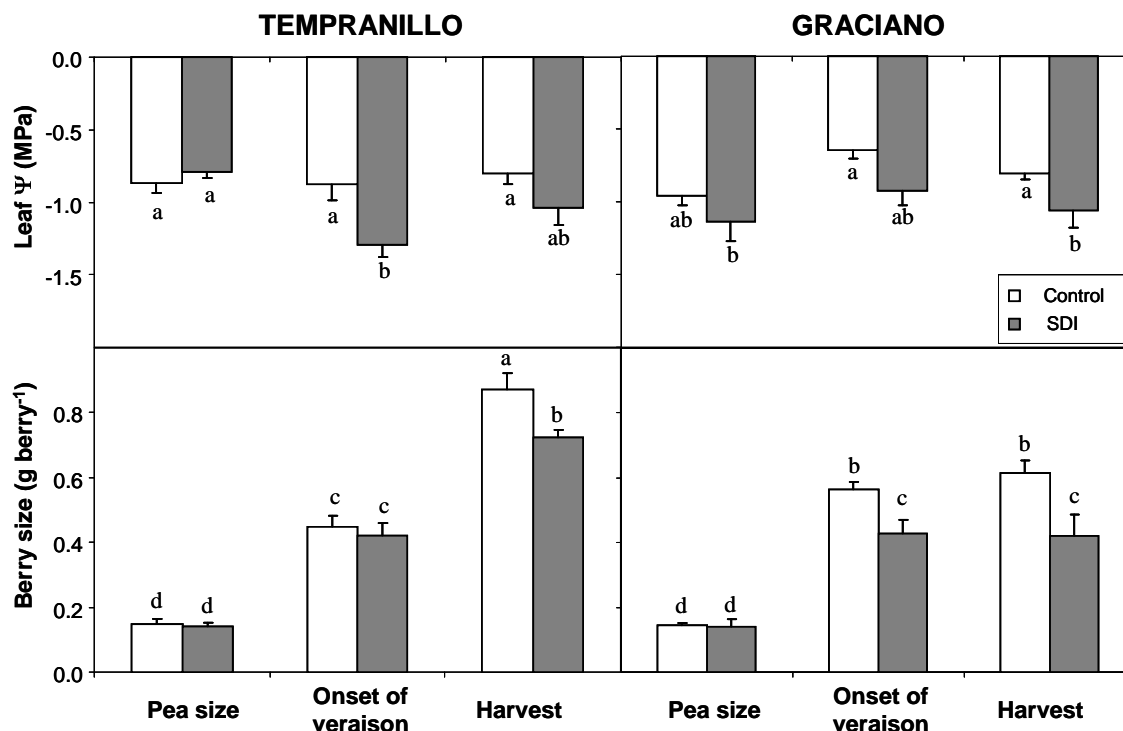


Figure 2. Pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ) and berry size of fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control), or sustained deficit irrigation (SDI). Values represent means ( $n=5$ ). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments according to a Tukey's test.

#### Berry phenolic composition

Water-deficit irrigation alters grape berry composition but its impact on each berry part is quite different. Thus, Grimplet *et al.* (2007) have showed that water deficit can have a major impact on protein expression of grape pericarp than in pulp or seeds. The results of the current study showed that berry skin anthocyanins were dominated by malvidin-3-glucosides regardless the variety and water irrigation applied (Table 2) as observed for a number of other grapevine varieties (Mazza *et al.* 1999, Kallithraka *et al.* 2009). However, anthocyanin qualitative profiles in well-watered and SDI plants were significantly different for some compounds because each grape cultivar is characterized by a distinct set of anthocyanins (Dai *et al.* 2011). In response to the SDI treatment, total anthocyanin concentration at harvest was decreased in Tempranillo grapevines (Figure 3). The anthocyanin derivatives showed that at harvest, the concentration of all glucosides derivatives were decreased by SDI, while increases

of contribution of 3-*p*-coumaroyl and acetylglucosides to total anthocyanins occurred in response to SDI (Table 2). In Graciano, there were no changes in total concentration of anthocyanins in deficit-irrigated plants, but the contribution of 3-*p*-coumaroyl-glucosides to total anthocyanins increased in SDI. Thus, a two-factorial ANOVA showed significant interaction between variety and irrigation level for percentages of anthocyanins derivatives (Table 2). For both cultivars, increased proportion of 3-*p*-coumaroyl-glucosides was due mainly to increased derivatives of malvidin. In the same way, other authors have shown that the degree of hydroxylation and methoxylation of the anthocyanins in grape berries may be altered by changes in irrigation management (Bindon *et al.* 2008).

Water deficit enhances accumulation of anthocyanins, through the stimulation of anthocyanin hydroxylation that converts hydroxylated anthocyanins (cyanidin and delphinidin) into their methoxylated derivatives (peonidin, petunidin and malvidin) through the differential regulation of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'-hydroxylase and O-methyltransferase (Castellarin *et al.* 2007b). In Graciano, the major anthocyanins synthesized under water deficit are the monoglucosides of petunidin, peonidin and malvidin and in their *p*-coumaroylated derivatives as shown in other cultivars as Cabernet Sauvignon (Castellarin *et al.* 2007b, Deluc *et al.* 2009), Shiraz (Ollé *et al.* 2011) and Tempranillo (Santesteban *et al.* 2011). In particular, in well-watered plants of Graciano, the high levels of peonidin-3-O-acetylglucoside that confer a deep red color when transferred from grape to the corresponding wine represent a positive sensory parameter. Moreover, the higher contribution of total acetylated anthocyanins in SDI-treated Graciano berries constitutes other positive qualitative index (Santos-Buelga and de Freitas 2009).

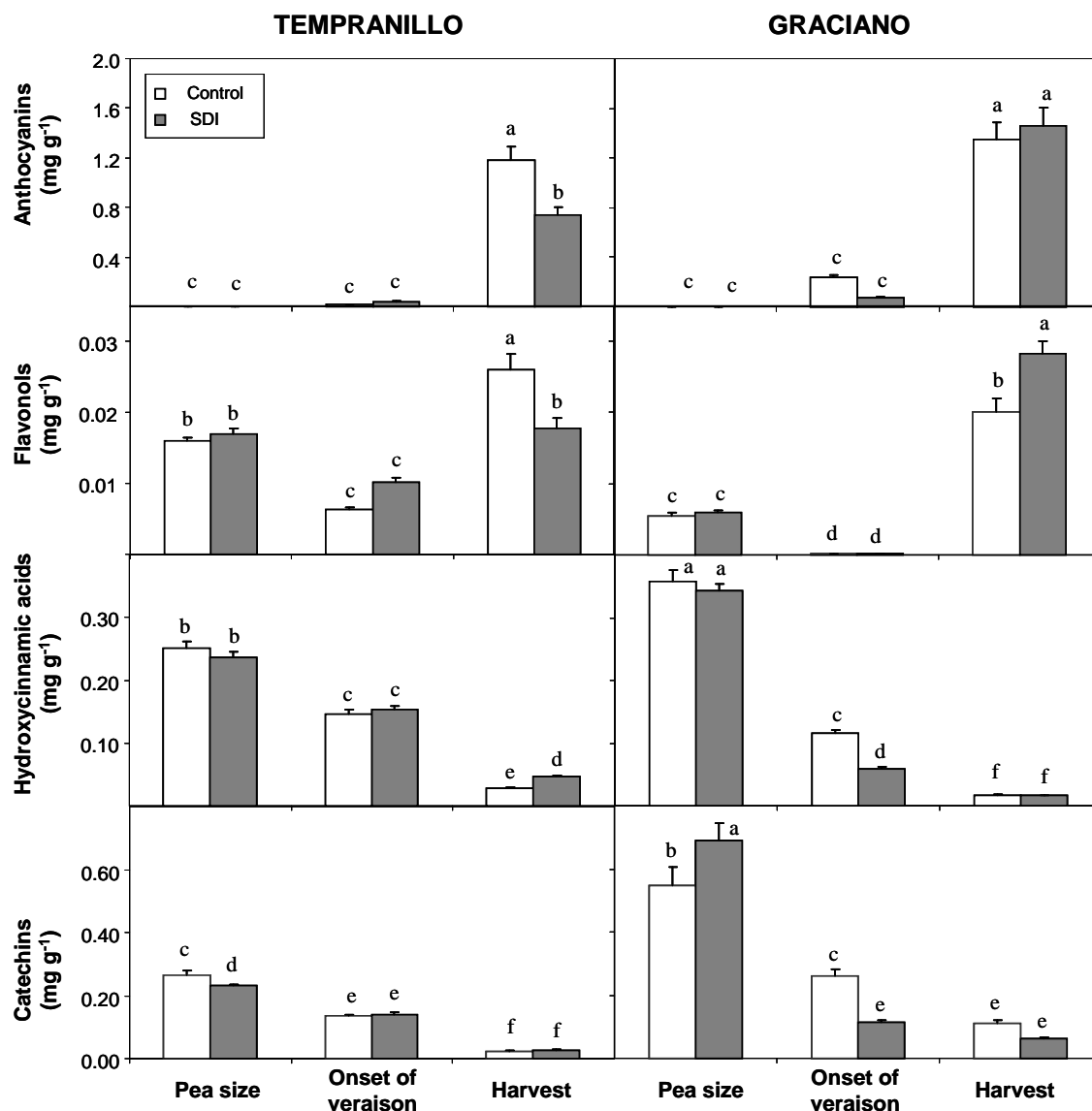


Figure 3. Concentration of monomeric anthocyanins, flavonols, hydroxycinnamic acids and catechins at different stages of berry growth and ripening of Tempranillo and Graciano grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control), or sustained deficit irrigation (SDI). Values represent means (n=25). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments according to a Tukey's test.

The flavonol production begins before the veraison, and increases during berry ripening (Ivanova *et al.* 2011). Similarly, in the present study, the highest concentrations of flavonols were found at harvest (Figure 3), but individual composition of flavonols differed in each variety studied (Table 3). Thus, the predominant flavonols in Tempranillo are the glucosides of myricetin and quercetin. In contrast, the main flavonols found in Graciano berries are quercetin-3-*O*-glucoside, myricetin, quercetin and isorhamnetin. Deficit irrigation was reported



that have a moderate effect on flavonol synthesis in red cultivars (Grimplet *et al.* 2007, Sofo *et al.* 2012) although response of flavonol concentrations to water deficits can differ between grape varieties (Deluc *et al.* 2009). Our data showed that SDI treatment reduced flavonol concentrations in Tempranillo and this decrease was due mainly to decreased myricetin-3-*O*-glucoside (Table 3). By contrast in Graciano, flavonol accumulation was stimulated under SDI conditions because increased concentration of quercetin-3-*O*-glucoside and isorhamnetin. The observed differential response of anthocyanins and flavonols to water deficit irrigation could be a result of the little turnover of anthocyanins that once formed they are accumulated in the skin, while flavonols are used for the synthesis of other compounds and are easily degraded (Adams 2006).

The highest amounts of hydroxycinnamic acids and catechins were found at pea size stage and then, it decreased to harvest (Figure 3). Similar patterns for these compounds were reported in Cabernet Sauvignon and Carménère grapes (Obreque-Slier *et al.* 2010). At pea size, hydroxycinnamic acid content was greater in Graciano berries, but at harvest, the highest values were found in Tempranillo. At veraison, SDI treatment provoked a significant reduction of total hydroxycinnamic acids and catechins in Graciano. At harvest, the predominant hydroxycinnamic acids of Tempranillo were *c*-caftaric, *t*-caftaric and caffeic acids (Table 3). In Graciano, hydroxycinnamic acids included *t*-caftaric, *c*-coutaric, *t*-coutaric, caffeic and coumaric acids. In well-watered plants, *t*-caftaric acid was found to be the main hydroxycinnamic acid, accounting for 55% of the total regardless of variety. In Tempranillo, SDI treatment stimulated accumulation of *t*-caftaric and caffeic acids. By contrast in Graciano, although water-deficit irrigation did not alter total hydroxycinnamic acids at this moment, its individual composition was modified. Thus, SDI treatment reduced concentrations of *c*-coutaric and *t*-coutaric and increased concentrations of coumaric and ferulic acids. This differential pattern was highlighted by two-way ANOVA showing significant interactions

between variety and irrigation level. These findings are very interesting because hydroxycinnamic acids are involved in browning reactions, and also because they are precursors to volatile phenols in wine (Romeyer *et al.* 1983).

### **Conclusions**

This study shows that application of a sustained water deficit procedure to grapevines cv. Tempranillo and Graciano during fruit development and ripening reduced plant and berry growth. The analyses of phenolic composition showed that under water deprivation, Graciano grape skins presented higher contents of total anthocyanins, flavonols and monomeric flavan-3-ols (catechins) than Tempranillo, which could be related to increased relative skin mass. This study provides evidence that under water-deficit irrigation, Graciano grapes present a differential composition of phenolic compounds that could result in improved fruit quality.

### **Acknowledgements**

The authors thank F. Aguirrezábal (Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA), Spain) for providing grapevine cuttings, A. Urdiáin and M. Oyárun for technical assistance during experiments. This project was supported by Fundación Universitaria de Navarra (2011) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN BFU2011-26989) of Spain. M. Niculcea was the recipient of a grant from Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

Table 3.

Effect of irrigation treatment (SDI and control) on individual composition of flavonols and hydroxycinnamic acids determined at harvest in grape berries of fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano.

	Tempranillo		Graciano		Variety (V)	Irrigation (I)	VxI
	Control	SDI	Control	SDI			
<i>Flavonols</i> ( $mg\ g^{-1}$ )	Myricetin 3-O-glucoside	0.0205 a	0.0124 b	ND	ND		
	Quercetin-3-O-glucuronide +	0.0053 a	0.0053 a	ND	ND		
	Quercetin-3-O-glucoside	ND	ND	0.0088 b	0.0131 a		
	Quercetin-3-O-glucoside	ND	ND	0.0088 b	0.0120 b		
	Myricetin	ND	ND	0.0014 b	0.0016 b		
	Quercetin	ND	ND	0.0009 b	0.0015 a		
	Isorhamnetin	ND	ND				
<i>Hydroxycinnamic acids</i> ( $mg\ g^{-1}$ )	<i>c</i> -caftaric acid	0.0063 a	0.0026 b	ND	ND		
	<i>t</i> -caftaric acid	0.0128 b	0.0267 a	0.0097 c	0.0071 c	***	***
	<i>c</i> -coutaric acid	ND	ND	0.0028 a	0.0015 b		
	<i>t</i> -coutaric acid	ND	ND	0.0036 a	0.0024 b		
	Caffeic acid	0.0038 b	0.0168 a	0.0005 c	0.0005 c	***	***
	Coumaric acid	ND	ND	0.0003 b	0.0035 a		
	Ferulic acid	ND	ND	ND	0.0005		

Values represent means ( $n = 25$ ). Within each file, means followed by a different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to the Tukey's test.

\*\*\* indicate significance at 0.1% probability level.

ND: not detected.

## References

- Adams DO (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 249-256.
- Antolín MC, Santesteban H, Ayari M, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M (2010). Grapevine fruiting cuttings: an experimental system to study grapevine physiology under water deficit conditions. In: *Methodologies and Results in Grapevine Research*. Eds. S. Delrot H, Medrano Gil, E Or, L Bavaresco, S Grando (Springer Science+Business Media B.V.) pp. 151-163.
- Aron PM, Kennedy JA (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 52: 79-104.
- Bindon K, Dry P, Loveys B (2008). Influence of partial rootzone drying on the composition and accumulation of anthocyanins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14: 91-103.
- Boulton R (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine. A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 67-87.
- Castellarin SD, Matthews MA, Di Gaspero G, Gambetta GA (2007b). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 227: 101-112.
- Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G. (2007a). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell and Environment* 30: 1381-1399.
- Chalmers YM, Downey MO, Krstic MP, Loveys BR, Dry PR (2010). Influence of sustained deficit irrigation on colour parameters of Cabernet Sauvignon and Shiraz microscale wine fermentations. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16: 301-313.

- Chaves MM, Zarrouk O, Francisco R, Costa JM, Santos T, Regalado AP, Rodrigues ML, Lopes CM (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany* 105: 661-676.
- Cirami R, Ewart A, Furkaliev J (2000). The viticultural and oenological evaluation of Graciano, Gramon and Harslevelu. *The Australia Grapegrower & Winemaker* 436: 20-23.
- Coombe, BG (1995). Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1, 104-110.
- Corder R, Mollen W, Khan NQ, Marks SC, Wood EG, Carrier MJ, Crozier A (2006). Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. *Nature* 444: 566.
- Dai ZW, Ollat N, Gomès E, Decroocp S, Tandonnet JP, Bordenave L, Pieri P, Hilbert G, Kappel C, van Leeuwen C, Vivin P, Delrot S (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition. A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 413-425.
- Deluc LG, Quilici DR, Decendit A, Grimplet J, Wheatley D, Schlauch A, Mérillon JM, Cushman JC, Cramer GR (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavour and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* 10: 212.
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 257-268.
- Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 409-420.
- Fernández K, Kennedy J, Agosín E (2007). Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3675-3680.

- Gawell R (1998). Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 74-95.
- Grimplet J, Deluc LG, Tillet RL, Wheatley MD, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC (2007). Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8: 187.
- Guadalupe Z, Ayestarán B (2008). Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. Cv. "Tempranillo" during vinification and aging. *European Food Research and Technology* 228, 29-38.
- Guadalupe Z, Soldevilla A, Sáñez-Navajas MP, Ayestarán B (2006). Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography* 1112, 112-120.
- He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15: 9057-9091.
- Hufnagel J.C, Hofmann T (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1376–1386.
- Iland P, Bruer N, Edwards G, Weeks S, Wilkes E (2004). Chemical analysis of grapes and wine techniques and concepts. Patrick Iland wine promotions. Campbelltown, Australia.
- Ivanova V, Stefova M, Vojnoski B, Dörnyei A, Märk L, Dimovska V, Stafilov T, Kilár F (2011). Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International* 44: 2851-2860.
- Kallithraka S, Aliaj L, Makris DP, Kefalas P (2009). Anthocyanin profiles of major red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Greece and their relationship with *in vitro* antioxidant characteristics. *Food Science & Technology* 44: 2385-2393.
- Lund S, Bohlmann J (2006). The molecular basis for wine grape quality – A volatile subject. *Science* 311: 804-805.

- Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B (1999). Anthocyanins, phenolics, and colour of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4009-4017.
- Monagás M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Laureano O, Ricardo da Silva, JM (2003). Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6475-6481.
- Mullins MG (1966). Test-plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature* 209, 419-420.
- Núñez V, Monagas M, Gómez-Cordovés MC, Bartolomé B (2004). *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and technology* 31: 69-79.
- Obreque-Slier E, Peña-Neira A, López-Solís R, Zamora-Marín F, Ricardo-Da Silva JM, Laureano O (2010). Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3591-3599.
- Ollat N, Geny L, Soyer JP (1998). Les boutures fructifères de vigne: validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. I. Principales caractéristiques de l'appareil végétatif. *Journal International de Science de la Vigne et du Vin* 32, 1-9.
- Ollé D, Guiraud JL, Souquet JM, Terrier N, Ageorges A, Cheynier V, Verries C (2011). Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17: 90-100.
- Ortega-Farias S, Fereres E, Sadras VO (2012). Special issue on water management in grapevines. *Irrigation Science* 30: 335-337.

- Peleg H, Gacon K, Schlich P, Noble AC (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimmers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1123-1128.
- Pezzuto JM (2008). Grapes and human health: a perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6777-6784.
- Romeyer FM, Macheix JJ, Goiffon JP, Reminiac CC, Sapis JC (1983). The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31: 346-349.
- Santesteban LG, Miranda C, Royo JB (2011). Regulated deficit irrigation effects on growth, yield, grape quality and individual anthocyanin composition in *Vitis vinifera* L. cv. "Tempranillo". *Agricultural & Water Management* 98: 1171-1179.
- Santos-Buelga C, de Freitas V (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In: Moreno-Arribas MV, Polo C, editors. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York, USA: Springer, p. 529-570.
- Schwarz M, Picazo-Bacete JJ, Winterhalter P, Hermosín-Gutiérrez I (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8372-8381.
- Sivilotti P, Bonetto C, Paladin M, Paterlunger E (2005). Effect of soil moisture availability on Merlot: from leaf water potential to grape composition. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 9-18.
- Smart R, Robinson, M (2006). *Sunlight into wine: A handbook for winegrape canopy management*. Adelaide: Winetittles Pty. Ltd.
- Sofa A, Nuzzo V, Tataranni G, Manfra M, De Nisco M, Scopa A (2012). Berry morphology and composition in irrigated and non-irrigated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* 169: 1023-1031.



Verries, C., Guiraud, J.L., Souquet, J.M., Vialet, S., Terrier, N. and Ollé, D. (2008) Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5896–5904.

Waterhouse AL (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 957: 21-36.



**5. EFFECTS OF WATER-DEFICIT IRRIGATION ON HORMONAL  
CONTENT AND NITROGEN COMPOUNDS IN DEVELOPING  
BERRIES OF *Vitis vinifera* L. CV. TEMPRANILLO**

---

“EFECTOS DEL RIEGO DEFICITARIO SOBRE EL CONTENIDO HORMONAL Y  
LOS COMPUESTOS NITROGENADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA  
BAYA DE *Vitis vinifera* L. CV. TEMPRANILLO”

*Journal of Plant Growth Regulation* (2013) DOI: 10.1007/s00344-013-9322-z.

---



## **RESUMEN**

El riego deficitario en vid reduce el crecimiento de la planta, la producción y el desarrollo de las bayas, alterando además el proceso de maduración de las mismas, todo lo cual puede influir en la composición del fruto y la calidad del vino. Por tanto, los objetivos de este estudio fueron: (1) investigar la influencia de las hormonas endógenas de la baya, como son el ácido abscísico (ABA), el ácido indol-3-acético (IAA), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) sobre el crecimiento y la maduración de la uva bajo condiciones de déficit hídrico, y (2) analizar los cambios en la composición del fruto, en especial, en los compuestos nitrogenados en esas condiciones. El estudio se llevó a cabo con plantas de Tempranillo cultivadas en macetas y bajo condiciones controladas en un invernadero. Se impusieron dos niveles de riego: control (bien regado) y riego deficitario sostenido (SDI). El déficit hídrico redujo el área foliar y la relación fuente: sumidero, así como la producción, el tamaño de la baya y la concentración de los principales compuestos fenólicos. El tratamiento SDI también modificó el estado hormonal de la baya. Así, en el estadio de baya tamaño guisante, el SDI indujo un descenso en la concentración de IAA junto con el incremento de la de JA y SA en comparación a las plantas bien regadas. Durante el envero, la acumulación de ABA fue menos acentuada en el tratamiento SDI. En maduración, el contenido de aminoácidos y amonio libre fue bajo en ambos tratamientos, pero las bayas del SDI experimentaron una significativa acumulación de aminas. Los resultados sugieren que los efectos del déficit hídrico incluyen la reducción del crecimiento de la baya así como cambios en las dinámicas hormonales, en la síntesis de polifenoles y en el contenido y composición de aminoácidos, todo lo cual podría comprometer la calidad del fruto. Se discute además el posible papel del IAA sobre el control del tamaño de la baya y del ABA y SA sobre el control de los niveles de antocianinas y flavonoles.



## **ABSTRACT**

Water-deficit irrigation to grapevines reduces plant growth, yield and berry growth, altering its ripening process, all of which may influence fruit composition and wine quality. Therefore, the goals of this study were (1) to investigate the influence of the main endogenous berry hormones, abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), on berry growth and ripening under water-deficit conditions and (2) to analyze changes in fruit composition, specifically N compounds, under water deprivation. The study was carried out using container-grown Tempranillo grapevines grown under controlled conditions in a greenhouse. Two irrigation treatments were imposed: control (well-watered) and sustained deficit irrigation (SDI). Water deficit decreased leaf area and the source-to-sink ratio, reduced yield and berry size, and decreased concentrations of main phenolic compounds. SDI also modified berry hormonal status. At the pea-size stage, SDI berries had lower IAA and higher JA and SA than nonstressed berries. At veraison (onset of ripening), accumulation of ABA was less accentuated in SDI than in control berries. At harvest, the content of amino acids and free ammonium was low in both treatments but SDI-treated berries showed a significant accumulation of amines. Results suggest that water restrictions to grapevines might be playing a physiological role in reducing berry growth, through affecting hormone dynamics, phenolic synthesis and the berry amino acid content and composition, which could compromise fruit quality. Possible roles of endogenous IAA controlling berry size and endogenous ABA and SA controlling levels of anthocyanins and flavonols at harvest are discussed.

*Key words:* Abscisic acid, amines, amino acids, auxins, salicylic acid, sustained deficit irrigation





## **Introduction**

Grape berry development involves a complex series of changes, which can be divided into three major phases (Salazar-Parra and others 2010). In Phase I, during initial berry growth, berry size increases along a sigmoid growth curve due to cell division and subsequent cell expansion. Organic acids (mainly malic and tartaric acids), proanthocyanidins, and hydroxycinnamic acids accumulate to peak levels. Phase II is characterized by a lag phase where cell expansion ceases, and sugars begin to accumulate. Veraison (onset of ripening) marks the beginning of Phase III, in which berries undergo a second period of sigmoid growth, due to additional mesocarp cell expansion, accumulation of anthocyanin pigments for berry colour and volatile compounds for aroma, softening, sugar accumulation (mainly glucose and fructose), and a decline in organic acid accumulation. Growth and ripening of grape berries are controlled by plant hormones (Davies and Böttcher 2009). Grape berries are classified as a nonclimacteric fruit that accumulates abscisic acid (ABA) at the beginning of ripening, i.e., at veraison (Antolín and others 2006, Deluc and others 2009; Wheeler and others 2009). Moreover, other hormones such as polyamines (Baigorri and others 2001; Antolín and others 2008), ethylene (Chervin and others 2004, 2008), brassinosteroids (Symons and others 2006) and auxins (Jeong and others 2004; Deytieux-Belleau and others 2007; Böttcher and others 2010a, b) seem to exert relevant roles during grapevine ripening.

Grapevine quality depends mainly on metabolites content that are divided mainly into two types, that is, primary and secondary metabolites (reviewed by Ali and others 2010). In grapevine berries, the primary metabolites include sugars, amino acids, amines, alcohols, and organic acids. Secondary metabolites include phenolics, flavonoids, and stilbenoids. Although nitrogen (N) compounds in wine are quantitatively second in importance relative to sugars as a nutrient for yeast, the N content is effectively the metabolic factor that determines the rate of wine fermentation (Treeby and others 1998; Herbert and others 2005). Amino acids represent

30-40% of the total wine N and contribute to wine aroma, taste, and appearance (Hernández-Orte and others 2003). Amines are organic nitrogenous bases of low molecular weight that are formed during metabolic processes in living organisms. In wine, amines are formed mainly during malolactic fermentation, although yeasts also synthesize them during alcoholic fermentation (Herbert and others 2005). The amines have unpleasant effects at high concentrations, causing health risks to sensitive individuals (Ancín-Azpilicueta and others 2008).

Grapevine cultivation is traditionally nonirrigated (especially in Europe) and spreads widely across dry and semidry ecosystems. Water stress does not necessarily imply negative effects. Regulated water deficit, which is the basis of different agronomic practices, has been used mainly to achieve an appropriate balance between vegetative and reproductive development. A mild water stress, maintained through partial irrigation, may reduce grapevine vigour and competition for carbohydrates by growing tips, as well as promote a shift in the partition of photoassimilates toward reproductive tissues and secondary metabolites. These changes in plant metabolism by mild water stress may increase the quality of the fruit and the wine produced (Kennedy and others 2002). Recent studies concerning the effects of water deficit irrigation on berry constituents have paid much attention to its influence on secondary metabolites such as anthocyanins, flavonols, and catechins (Castellarin and others 2007; Ollé and others 2011). However, there is still insufficient data on other metabolites that are also involved in berry and wine quality, such as amino acids and amines. It has been reported that N-compound profiles can change depending on grapevine cultivar, berry maturity and tissue type (Stines and others 2000; Bell and Henschke 2005). Information about the profiles of amino acids and amines in grapes subjected to sustained deficit irrigation is lacking.

Although much emphasis has been placed on the plant hormone ABA as a central constituent of the berry-ripening process, soil drying could modify levels of other hormones involved in berry development and ripening, and in fruit quality at harvest. Therefore, the aims of this study were (1) to investigate the influence of the main endogenous berry hormones on berry growth and ripening under a water-deficit irrigation regime and (2) to analyze the extent of the variations in fruit composition, specifically N-compound profiles, under water-limited conditions. The study was carried out with fruiting cuttings of Tempranillo, a widely grown variety in Spain for its high-quality red wines.

## **2. Materials and methods**

### *Plant material*

Previous research demonstrated that the fruiting cuttings technique is a useful model for grapevine physiology studies (Antolín and others 2010) and has been refined over the last few years (Salazar-Parra and others 2012a, b). It allows the development of vegetative (roots, leaves, and shoots) and reproductive (inflorescences and clusters) organs as for the vineyard grapevines (Lebon and others 2005) but under fully controlled environmental conditions. Moreover, the chronology of flowering and fructification of the fruiting cuttings is similar to that of the vineyard-grown grapevines (Lebon and others 2005, 2008).

Dormant *Vitis vinifera* L. cuttings of cv. Tempranillo, 400-500 mm long and 15-20 mm in diameter, were selected in the winter of 2009. The cuttings were propagated by a technique that ensured that the formation of adventitious roots preceded bud burst using steps originally outlined in Mullins (1966), with some modifications described in Ollat and others (1998) and Antolín and others (2010). Cuttings were rooted in a heat-bed (25°C) inside a cool-room (5°C) for 30 days. Rooted cuttings were planted in 10-L plastic pots containing a soil-peat (1:1, v/v) potting mix. After rooting, cuttings were transferred to a greenhouse with a 25/20°C and 70/80% RH (day/night) regime. They were illuminated for 15 h with natural daylight supplemented with high-pressure sodium lamps (SON-T Agro Phillips, Eindhoven, the Netherlands), providing a minimum photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the level of the inflorescence. Bud-break took place after 1 week under these conditions. Careful control of vegetative growth before flowering improves the partitioning of stored carbon towards the roots and the reproductive structures. Thus, only a single flowering stem was allowed to develop on each plant during growth. After berry set (end of May), growth conditions in the greenhouse were changed to a 25/15°C and 60/80% RH (day/night) regime with a PPFD of 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the level of inflorescence. A proper nutrient solution

provided a mineral nutrition in accordance with viticulture requirements (Ollat and others 1998).

Samples berries were collected at three stages of development: (1) pea size, corresponding to berries 7 mm in diameter [Eichhorn and Lorenz (E-L) growth stage 31] (Coombe 1995) [27 days after anthesis (DAA) for the two water treatments]; (2) onset of veraison corresponding to berries that began to colour and enlarge (approximately 9°Brix) (E-L growth stage 35) (60 and 65 DAA for water deficit and well-watered treatments, respectively); and (3) harvest corresponding to commercially ripe berries (approximately 22°Brix) (E-L growth stage 38) (100 and 105 DAA in well-watered and water-deficit treatments, respectively). There were five plants for each treatment and sampling-time combination from two biological replicates.

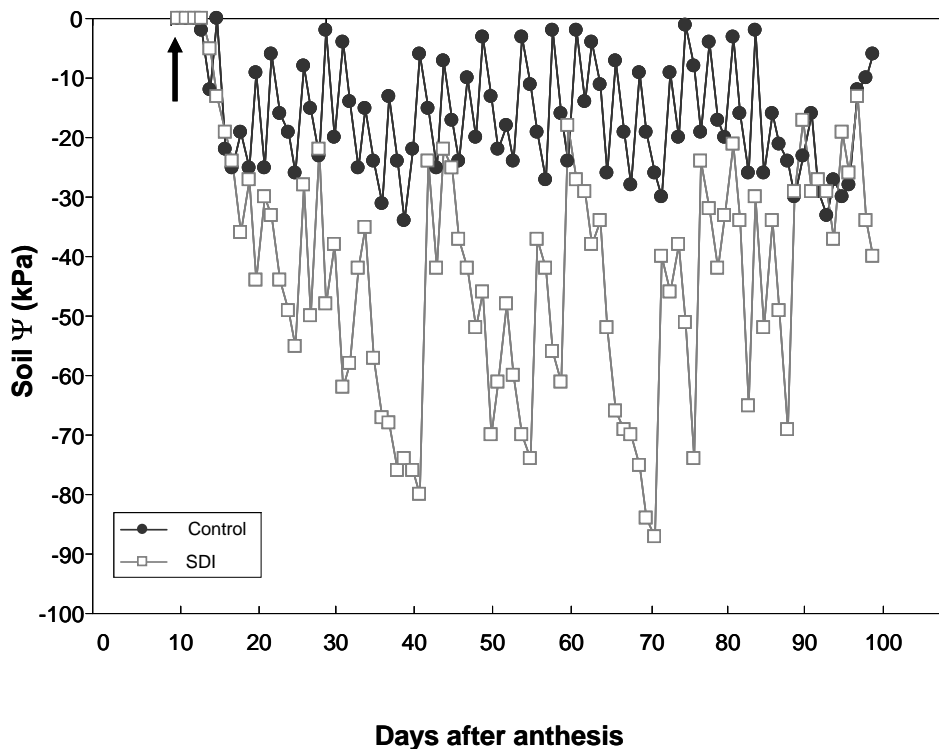


Figure 1. Soil water potential ( $\Psi$ ) measured from fruit set to harvest in pots subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control) or sustained deficit irrigation (SDI). Values represent means ( $n = 5$ ). Arrow indicates start of water treatments.

### *Water treatments*

Two water management treatments were applied 11 DAA, at fruit set (E-L stage 27) (Coombe 1995). In the control treatment, pots were maintained at 80% of pot capacity. Water-deficit treatment plants received 50% of the water given to control plants (sustained deficit irrigated, SDI). The resulting soil conditions during the experiments are shown in Fig. 1. Soil water potential ( $\Psi$ ) was monitored using a granular matrix sensor (Watermark Soil Moisture Sensor, Irrrometer Co, Riverside, CA, USA) placed within each pot. Pot capacity was previously assessed by determining the amount of water retained after allowing water to free drain through the holes at the bottom of the pot. The surface of the plant containers was covered with quartz stones during the experiments to avoid water loss due to evaporation. Watering was done by hand, providing a fixed volume of nutrient solution or deionised water so that the different treatments were supplied with the same amount of nutrients during water deficit.

Pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ) was measured with a SKYE SKPM 1400 pressure chamber (Powys, United Kingdom) on five fully expanded leaves per treatment at each sampling date just prior to irrigation. Ten berries from each treatment were collected, weighed, and subsequently oven-dried at 80°C until constant mass was reached. Berry water content was calculated as  $100 \cdot (FM - DM) / FM$ , where FM is fresh matter and DM is dry matter. Ninety to 100 berries from each treatment (45-50 berries per biological replicate) were counted, weighed, and frozen at -80°C for further analysis.

### *Hydroalcoholic extracts of berries*

Berry subsamples were homogenized using an Ultra Turrax grinder mixer (IKA, Staufen, Germany) at 5,500-g for 1 min. Thereafter, the homogenate (1 g) was transferred into a pretared centrifuge tube and 10 mL of 50% v/v aqueous ethanol (pH 2.0) was added (Iland and others 2004). Maceration was then allowed for 1 h in an ultrasonic bath (Bandelin, Berlin,

Germany). The tube was then centrifuged at 2,300 *g* for 15 min (Sorvall RC 6 Plus, Du Pont, BH, Germany) and the supernatant was named as the extract. Hydroalcoholic extracts were used for the analysis of phenolic compounds, amino acids, biogenic amines, and ammonium ion.

#### *Analysis of phenolic compounds*

Hydroalcoholic extracts (2 mL) were directly fractionated by gel permeation chromatography (GPC) on a TOYOPEARL® gel HP-50F column (Tosoh, Montgomeryville, PA, USA) using the method described by Guadalupe and others (2006). A first fraction (F1) was eluted with ethanol/water/trifluoroacetic acid (55:45:0.05 v/v/v) and a second fraction (F2) was recovered by elution with acetone/water (60:40 v/v). The two fractions were taken to dryness under vacuum and then the first fraction was used to quantify monomeric phenolics and the second one was used to determine the proanthocyanidin content. All samples were fractionated in duplicate.

Monomeric phenolic compounds in F1 fractions were analyzed by HPLC-DAD on an Agilent modular 1100 liquid chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with a G1313A injector, a G1311A HPLC quaternary pump, an online G1379A degasser, a G1316A oven, a G1315B photodiode array detector, and Agilent Chemstation software. A Kromasil 100-C18 reverse phase column (5- $\mu\text{m}$  packing, 200 x 4.6 mm i.d.), protected with a guard column of the same material (Teknokroma, Barcelona, Spain) and thermo-regulated at 30°C, was used. Individual phenolic compounds were identified by HPLC-MS. Anthocyanins, hydroxycinnamic acids, flavonols, and flavan-3-ols were determined as indicated by Guadalupe and Ayestarán (2008) and Fernández and others (2011). Total proanthocyanidins were quantified in F2 fractions. The analysis of proanthocyanidin cleavage products was made after acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. The proanthocyanidins were reacted in a solution of 0.1 N HCl in methanol, containing 50 g L<sup>-1</sup> phloroglucinol and 10 g L<sup>-1</sup> ascorbic acid, at 50°C for 20

min, and afterward combined with 5 volumes of 40 mM aqueous sodium acetate before analysis by reversed-phase HPLC using an aqueous acetic acid and methanol gradient (Kennedy and Jones 2001). The column was an ACE HPLC (5 C18-HL) with a 5- $\mu$ m particle size (250 mm x 4.6 mm) protected by a guard column containing the same material. The total proanthocyanidin content was calculated as the sum of all the subunits: extension subunits (phloroglucinol adducts) and terminal subunits (catechin, epicatechin, and epicatechin-gallate). Each measurement was run in triplicate.

#### *Analysis of nitrogen compounds*

Aminoenone derivatives were obtained by reaction of borate buffer 1 M (pH 9), methanol, hydro-alcoholic extract, internal standard (L-2-aminoadipic acid, 1 g L<sup>-1</sup>), and diethylethoxymethylenemalonate (DEEMM) as described by Gómez-Alonso and others (2007). Chromatographic separation was performed in an ACE HPLC column (5 C18-HL) 5- $\mu$ m particle size (250 mm x 4.6 mm), temperature controlled at 16°C. In these conditions, 33 compounds were separated, identified, and quantified in a single injection: 24 amino acids, 9 biogenic amines, and ammonium ion. Target compounds were identified according to the retention times and UV-Vis spectral characteristics of the derivatives of the corresponding standards, and they were quantified using the internal standard method. Analyses were performed in triplicate.

#### *Hormone determinations in berries*

The abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), salicylic acid (SA), and jasmonic acid (JA) content of the berries was analyzed by a HPLC coupled to a tandem mass spectrometer as described in Durgbanshi and others (2005) and Montoliú and others (2009). Briefly, frozen berries were ground to a fine powder with a prechilled mortar and a pestle and then 0.5 g of powdered tissue was extracted in ultrapure water using a tissue homogenizer (Ultra-Turrax).



Before extraction, 5  $\mu\text{L}$  of a mixture of internal standards, containing 100 ng of [ $^2\text{H}_6$ ]-ABA, 5 ng of [ $^2\text{H}_2$ ]-IAA, 100 ng of [ $^2\text{H}_4$ ]-SA, and 100 ng of [ $^2\text{H}_6$ ]-JA, was added to assess recovery and matrix effects. After extraction and centrifugation, the pH of the supernatant was adjusted to 3.0 and partitioned twice against diethylether. The organic layers were combined and evaporated in a centrifuge vacuum evaporator (Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was resuspended in a water: methanol (9:1) solution, filtered, and injected into a HPLC system (Alliance 2695, Waters Corp., MA, USA). Hormones were then separated in a reverse-phase Kromasil 100 C18 column (100 x 2.1 mm, 5- $\mu\text{m}$  particle size) using methanol and ultrapure water, both of which were supplemented with glacial acetic acid to a concentration of 0.05%. The mass spectrometer, a triple quadrupole (Quattro LC, Micromass Ltd., Manchester, UK), was operated in negative ionization electrospray mode and plant hormones were detected according to their specific transitions using a multiresidue mass spectrometric method (Durgbanshi and others 2005). Concentrations of each plant hormone were determined using calibration curves performed with known amounts of pure standard samples.

#### *Yield and fruit quality*

Bunches from each treatment type were weighed and all berries from each bunch were separated and weighed to obtain yield. Berries were weighed individually, mean berry weight was determined and berries were separated into skin and flesh. Berry volume was calculated using the definition of a sphere ( $\frac{4}{3}\pi r^3$ , where  $r$  is the radius of the sphere). Leaf area was measured with a portable area meter (model LI-3000, Li-Cor, Lincoln, NE, USA). A good correlation ( $r = 0.97$ ) was obtained between the length of the main vein of the leaf and the leaf area using several leaves of the same cultivar. Total leaf area of each plant was calculated after measuring the length of the main vein in all leaves and applying the correlation formula as follows: leaf area =  $-4.65 + (2.23 \times \text{vein length}) + (0.96 \times \text{vein length}^2)$  (Salazar-Parra and others 2012b).

A sample of 25 berries was crushed to determine of total soluble sugars, pH, and titratable acidity. Soluble solids percent was measured using a temperature-compensating refractometer (Zuzi model 315, Auxilab, Spain). Berry sugar content was expressed in °Brix. Must pH was measured with a pH meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain) standardised to pH 7.0 and 4.0. Finally, titratable acidity was measured by titration with NaOH and expressed as g tartaric acid L<sup>-1</sup>. Total polyphenols were analysed by spectrophotometry, measuring UV absorption at 280 nm (Ribéreau-Gayon and others 1972), and expressed as mg of gallic acid.

#### *Statistical analysis*

Data were submitted to a two-factor analysis of variance (ANOVA). Variance was related to the main treatments (berry stages and irrigation treatment) and to the interaction between them. Means ± standard errors (SE) were calculated, and when the F ratio was significant, least significant differences were evaluated by a Tukey *t*-test, as found in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 15.0 for Windows XP (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All values shown in the figures are means ± SE.

## **Results**

### *Water status, yield and plant growth*

The different irrigation treatments imposed on Tempranillo grapevines caused significant differences in water status, as indicated by the decrease of leaf  $\Psi_{pd}$  measured in plants subjected to deficit irrigation (SDI) compared with well-irrigated plants (control) beyond pea size (Fig. 2A). By contrast, no significant variations in berry water content were detected (Table 1). Plants subjected to SDI had reduced vegetative growth, as shown by the marked decrease in leaf area, with the exception of the pea size stage (Fig. 2B). In well-watered plants, the leaf area-to-crop weight ratio was ca. 10-12 cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup> (Fig. 2C), close to optimal values (between 6.2 and 10 cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) of grapevine vigour reported by Smart and Robinson (2006). However, this ratio decreased below the optimum in SDI plants at veraison and harvest (ca. 5.1 cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) (Fig. 2C).

Optimal irrigation resulted in significantly higher yield and bunch weight at harvest than under the SDI regime (Table 1). In the SDI treatment, plants decreased yield and bunch weight, reaching 52% of the values obtained for control grapevines. SDI, imposed at fruit set, also affected negatively berry weight, and berry volume reached 74% of the levels of the control berries (Table 1). By contrast, deficit irrigation produced a significant increase in the relative skin mass of SDI-treated berries (Table 1).

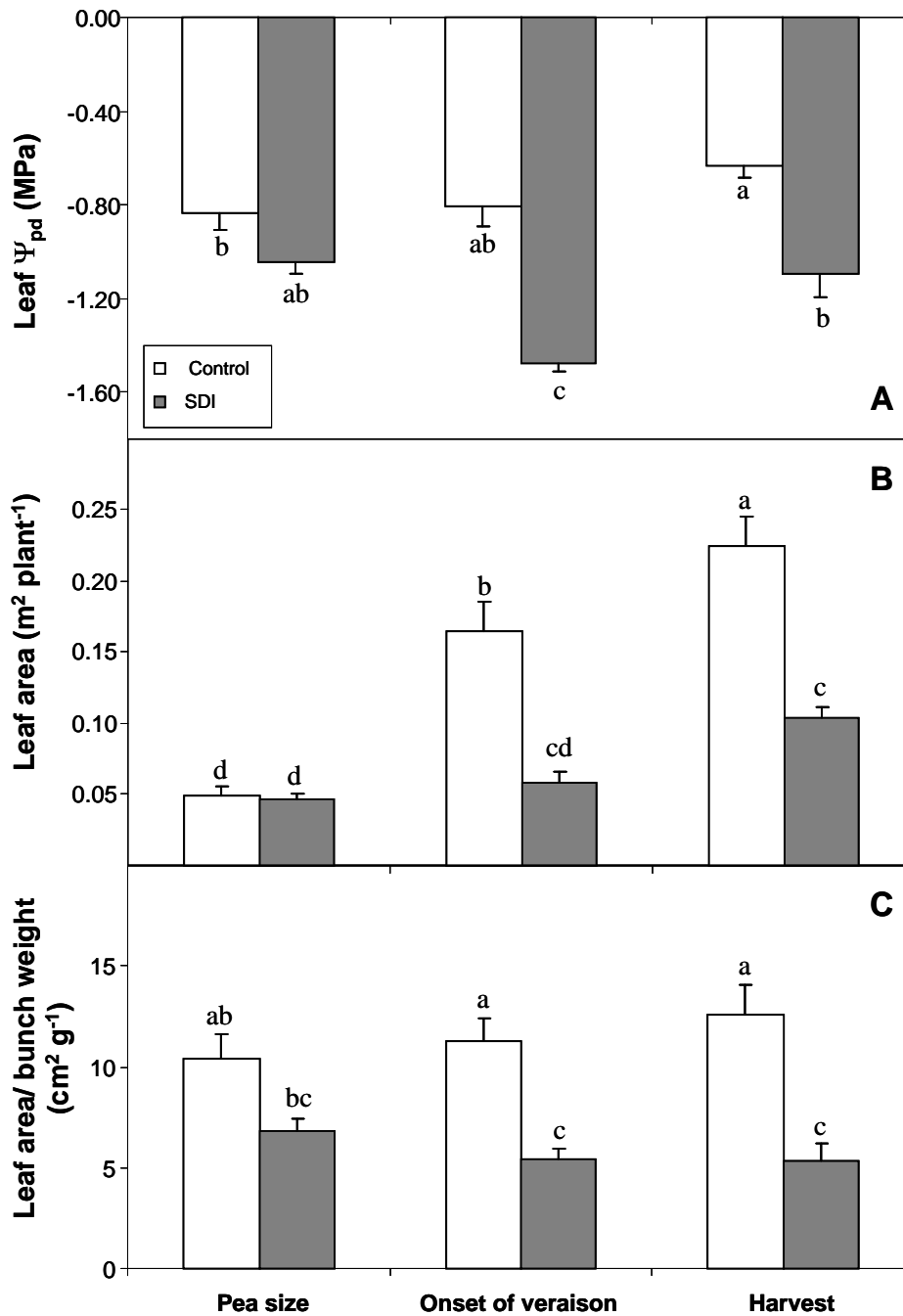


Figure 2. Pre-dawn leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ) (A), leaf area (B) and leaf area to crop weight ratio (C) of fruiting cuttings of Tempranillo grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control), or sustained deficit irrigation (SDI). Values represent means (n=5). Different letters indicate significant differences (p<0.05) between treatments according to the Tukey's test.

Table 1.

Yield, main berry characteristics, and fruit composition recorded at harvest from fruiting cuttings of Tempranillo grapevines subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control) or sustained deficit irrigation (SDI).

Measurement	Control	SDI
<i>Yield components</i>		
Yield (g plant <sup>-1</sup> )	231.49 a	119.42 b
Bunch weight (g)	242.63 a	133.05 b
<i>Berry characteristics</i>		
Berry weight (g berry <sup>-1</sup> )	0.84 a	0.66 b
Berry volume (mm <sup>3</sup> )	1096 a	817 b
Relative skin mass (% berry FM)	22.5 b	34.1 a
Berry water content (g water g <sup>-1</sup> FM, %)	87.01 a	89.60 a
<i>Fruit composition</i>		
Total soluble solids (°Brix)	22.08 a	17.74 b
Juice pH	3.66 a	3.65 a
Titrateable acidity (g L <sup>-1</sup> )	6.10 a	5.45 a
Total polyphenols (mg g <sup>-1</sup> )	2.62 a	2.36 a

Values represent means (n = 5). Within each file, means followed by a different letter are significantly different (p<0.05) according to the Tukey's test. FM indicates fresh matter.

*Phenolic compounds and characteristics of fruit*

Analysis of grape must at harvest indicated some differences between the two water regimes assayed in this study (Table 1). Thus, plants subjected to deficit irrigation (SDI) had a lower content of total soluble solids (°Brix) in comparison with control plants (Table 1). Although no significant differences were detected in the content of total polyphenols (Table 1), it was evident that the concentration of each family of phenolics differed according to the stage of reproductive development and water regime applied (Table 2). Thus, a two-factorial ANOVA showed significant interaction between both factors for anthocyanins, flavonols, and catechins. In general, anthocyanins and flavonols accumulated at harvest, whereas hydroxycinnamic acids, catechins, and proanthocyanidins were higher at the pea-size stage, and then decreased (Table 2). At the pea-size stage, SDI-treated berries had a lower content of catechins and proanthocyanidins than control berries (Table 2). At harvest, water deficit reduced anthocyanins and flavonols concentrations (Table 2).

Table 2.

Concentration of phenolic compounds in berries from fruiting cuttings of Tempranillo grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control) or sustained deficit irrigation (SDI).

Developmental stage	Irrigation	Anthocyanins (mg·g <sup>-1</sup> )	Flavonols (mg·g <sup>-1</sup> )	Hydroxycinnamic acids (mg·g <sup>-1</sup> )	Catechins (mg·g <sup>-1</sup> )	Proanthocyanidins (mg·g <sup>-1</sup> )
Pea size	Control	0.001 c	0.016 b	0.250 a	0.263 a	6.916 a
	SDI	0.002 c	0.017 b	0.236 a	0.230 b	5.776 b
Onset of veraison	Control	0.014 c	0.006 c	0.145 b	0.134 c	1.845 c
	SDI	0.041 c	0.001 c	0.153 b	0.141 c	1.636 c
Harvest	Control	1.183 a	0.026 a	0.028 c	0.021 d	0.951 c
	SDI	0.741 b	0.018 b	0.046 c	0.027 d	1.219 c
Developmental stage (D)		***	***	***	***	***
Irrigation procedure (I)		**	ns	ns	ns	ns
DxI		***	***	ns	**	ns

Values represent means (n = 5). Within each column, means followed by a different letter are significantly different (p<0.05) according to the Tukey's test. ns, \*\* and \*\*\* indicate non-significance or significance at 1% and 0.1% probability levels, respectively.

*Berry hormonal content*

Abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), salicylic acid (SA), and jasmonic acid (JA) contents in berries are shown in Fig 3. The highest concentration of ABA in berries was detected at the onset of veraison in both irrigation treatments, but this increase was more marked in the berries of control plants (Fig. 3A). The IAA levels in berries of Tempranillo grapevines ranged from 0.05 to 0.35 nmol g<sup>-1</sup> DM. The concentration of IAA in berries was highest at the pea-size stage, and then it abruptly decreased in both irrigation treatment plants (Fig. 3B). However, at this stage, SDI berries had significantly lower IAA content than in controls (Figure 3B). The concentration of salicylic acid (SA) in berries was distinctly affected by the development stage and water regime (Fig. 3C). At pea size, SA concentration was higher in SDI plants than in well-watered plants. By contrast, the SA level was higher in control berries than in SDI berries at the onset of veraison. In well-watered berries, SA only decreased at harvest; nevertheless in SDI berries, an abrupt decrease of SA concentration took place earlier than in control berries (at onset of veraison). Finally, the concentration of jasmonic acid (JA) reached a maximum in young berries after which it decreased markedly in both irrigation treatments (Fig. 3D). Berries of SDI treatment plants had a higher JA level at pea size and at harvest than berries of well-watered plants.



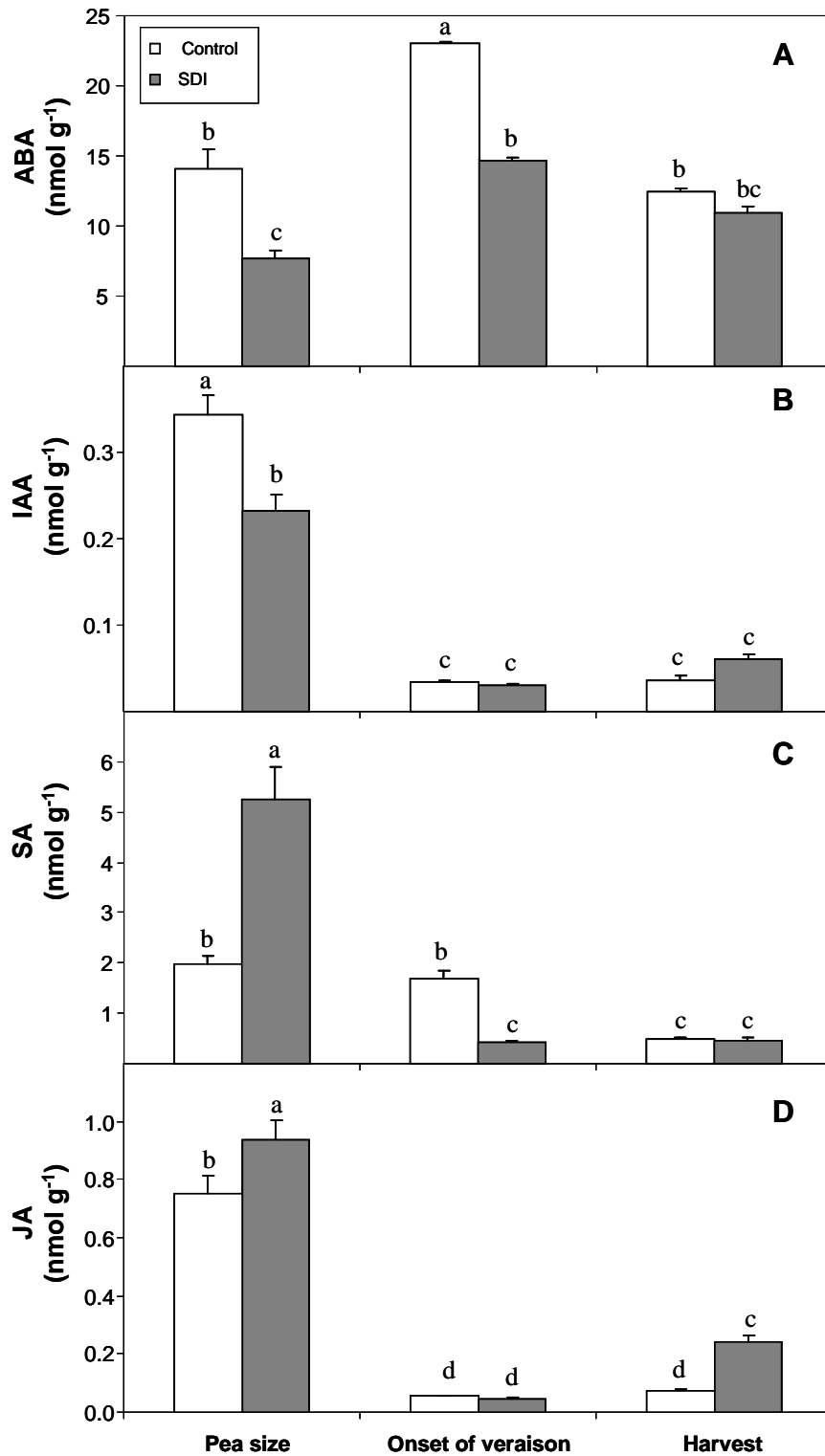


Figure 3. Concentrations of abscisic acid, ABA (A), indole-3-acetic acid, IAA (B), salicylic acid, SA (C) and jasmonic acid, JA (D) in berries from fruiting cuttings of Tempranillo grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control), or sustained deficit irrigation (SDI). Values represent means (n=15). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments according to the Tukey's test.

### *Berry N compounds*

The total amino acid content in berries was highest at the pea-size stage, especially in SDI-treated plants, and it was diminished at the onset of veraison and harvest in both irrigation treatments (Fig. 4A). The minimum concentration of amines was at the beginning of fruit ripening (veraison) in both treatments, but afterwards, SDI treatment exhibited significant accumulation of amines at harvest (Fig. 4B). On the other hand, the ammonium concentration in berries was highest at the onset of veraison in both water regimes assayed (Fig. 4C). In SDI treatment, berries had low ammonium concentration at pea-size stage when compared with those well irrigated (Fig. 4C).

Although no significant differences in total amino acid content were found at harvest, individual amino acid composition differed according to the irrigation regime and stage of reproductive development. The main amino acids identified in Tempranillo berries were L-glutamine (GLN), L-asparagine (ASN) and to a lesser extent, L-glutamic acid (GLU), L-aspartic acid (ASP), arginine (ARG), proline (PRO), hydroxyproline (HYP) and tryptophan (TRP) (Table 3). Thus, two-factorial ANOVA showed significant interaction between both factors for GLN, GLU, ASP, PRO, HYP and TRP. Water deficit induced significant accumulation of HYP and TRP at harvest, and a decline in the concentration of GLU, ASP, and PRO in berries of SDI-treated plants.

Individual amine composition also differed according to irrigation regime and stage of reproductive development. The individual amines identified in berries of Tempranillo grapevines were spermidine (SPD), tyramine (TYR), putrescine (PUT), tryptamine (TRYP), cadaverine (CAD), phenylethylamine (PHETIL), and isoamylamine (ISOAMIL) (Table 4). Thus, two-factorial ANOVA showed significant interaction between both factors for all analyzed amines. In control plants, the concentration of SPD, PUT, CAD, PHETIL and ISOAMIL was

significantly reduced throughout berry development. However, SDI plants showed the opposite trend because concentrations of TRYP, CAD, PHETIL and ISOAMIL strongly increased from veraison to harvest.

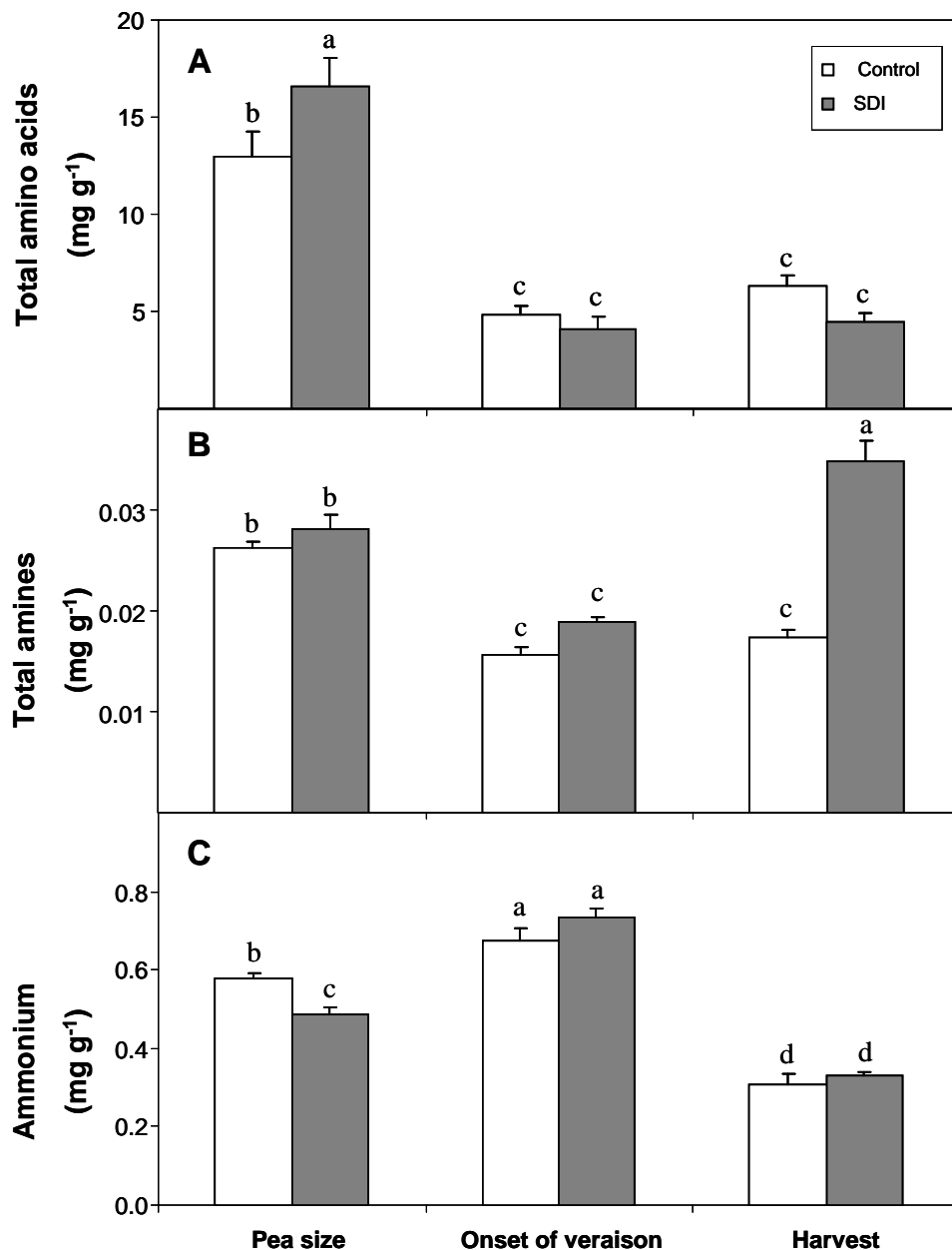


Figure 4. Concentrations of amino acids (A), amines (B) and ammonium ion (C) in berries from fruiting cuttings of Tempranillo grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control), or sustained deficit irrigation (SDI). Values represent means (n=15). Different letters indicate significant differences (p<0.05) between treatments according to the Tukey's test.

Table 3.

Concentrations of main amino acids in berries from fruiting cuttings of Tempranillo grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control), or sustained deficit irrigation (SDI).

Developmental stage	Irrigation	GLN (mg·g <sup>-1</sup> )	ASN (mg·g <sup>-1</sup> )	GLU (mg·g <sup>-1</sup> )	ASP (mg·g <sup>-1</sup> )	ARG (mg·g <sup>-1</sup> )	PRO (mg·g <sup>-1</sup> )	HYP (mg·g <sup>-1</sup> )	TRP (mg·g <sup>-1</sup> )
Pea size	Control	12.069 b	0.256 a	0.072 b	0.032 bc	0.227 b	0.023 c	ND	0.032 b
	SDI	15.811 a	0.194 a	0.078 b	0.030 cd	0.148 b	0.013 c	ND	0.025 c
Onset of veraison	Control	4.177 c	0.028 b	0.058 bc	0.021 d	0.212 b	0.028 c	ND	0.012 d
	SDI	3.915 c	0.053 b	0.047 c	0.029 cd	0.197 b	0.029 c	ND	0.014 d
Harvest	Control	4.651 c	0.009 b	0.124 a	0.061 a	0.600 a	0.425 a	0.001 b	0.029 bc
	SDI	2.885 c	0.009 b	0.077 b	0.041 b	0.666 a	0.281 b	0.016 a	0.040 a
Developmental stage (D)		***	***	***	***	***	***	***	***
Irrigation procedure (I)		ns	ns	**	*	**	ns	****	*
DxI		**	ns	***	***	ns	***	***	***

Values represent means (n = 5). Within each column, means followed by a different letter are significantly different (p<0.05) according to the Tukey's test. ns, \*, \*\* and \*\*\* indicate non-significance or significance at 5%, 1% and 0.1% probability levels, respectively.  
ND: no detected.

Table 4.

Concentrations of individual amines in berries from fruiting cuttings of Tempranillo grapevines subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control) or sustained deficit irrigation (SDI).

Developmental stage	Irrigation	SPD (mg·g <sup>-1</sup> )	TYR (mg·g <sup>-1</sup> )	PUT (mg·g <sup>-1</sup> )	TRYP (mg·g <sup>-1</sup> )	CAD (mg·g <sup>-1</sup> )	PHETIL (mg·g <sup>-1</sup> )	ISOAMIL (mg·g <sup>-1</sup> )
Pea size	Control	0.0061 ab	0.0016 c	0.0064 a	0.0024 b	0.0028 b	0.0029 b	0.0027 b
	SDI	0.0066 a	0.0037 a	0.0068 a	0.0022 b	0.0025 b	0.0027 b	0.0024 bc
Onset of veraison	Control	0.0039 c	0.0012 c	0.0038 b	0.0019 b	0.0014 c	0.0016 c	0.0018 d
	SDI	0.0040 c	0.0020 bc	0.0043 b	0.0025 b	0.0018 c	0.0021 c	0.0022 bcd
Harvest	Control	0.0033 c	0.0025 b	0.0034 b	0.0023 b	0.0018 c	0.0020 c	0.0020 cd
	SDI	0.0052 b	0.0044 a	0.0069 a	0.0045 a	0.0042 a	0.0049 a	0.0046 a
Developmental stage (D)		***	***	***	***	***	***	***
Irrigation procedure (I)		***	***	***	***	***	***	***
DxI		**	**	***	***	***	***	***

Values represent means (n = 5). Within each column, means followed by a different letter are significantly different (p<0.05) according to the Tukey's test. \*\* and \*\*\* indicate significance at 1% and 0.1% probability levels, respectively.

## **Discussion**

Plant hormones control growth and grape berry ripening (Davies and Böttcher 2009). Previous research has identified ABA as a key hormone in the ripening process, a plant hormone that accumulates in the grape berry at the beginning of ripening (Antolín and others 2006, Deluc and others 2009; Wheeler and others 2009). Studies on the role of other plant hormones, however, are scarce. Among them, roles for polyamines (Baigorri and others 2001; Antolín and others 2008), ethylene (Chervin and others 2004, 2008), brassinosteroids (Symons and others 2006) and auxins (Jeong and others 2004; Deytieux-Belleau and others 2007; Böttcher and others 2010a, b) have been suggested. The expression of genes related to ABA (Deluc and others 2009; Wheeler and others 2009), auxin (Jeong and others 2004; Deytieux-Belleau and others 2007), ethylene (El-Kereamy and others 2003; Chervin and others 2004, 2008), and brassinosteroid (Symons and others 2006; Deluc and others 2007) metabolism was modified at the onset of veraison. Water stress was reported to alter mRNA expression patterns associated with hormone metabolism in grape berries (Deluc and others 2007; Grimplet and others 2009). All the above-mentioned changes in hormone metabolism should modify the grape berry hormone endogenous levels. The endogenous levels of plant hormones in grape berries during ripening and their changes in response to water deprivation are however poorly known. This work focused on investigating this, searching for implications with respect to grape berry growth and phenolic and N-compounds composition. Also the present work dealt with changes in berry ABA, IAA, JA, and SA at different stages of growth and ripening (Fig. 3). In general, hormonal levels were highly modified by SDI being more evident at the pea size stage and at the onset of veraison (Fig. 3).

Studies of ripening grapes revealed that complex hormonal signaling was activated at veraison time. It is well known that grape berries accumulate ABA at the beginning of ripening (veraison) (Antolín and others 2006, 2008; Wheeler and others 2009) as observed in the

present work in both irrigation regimes (Fig. 3A). Transcripts and proteins linked to ABA biosynthesis have been found in ripening berries; they regulate various processes related to anthocyanins (Jeong and others 2004; Gagné and others 2011) and proanthocyanidins (Lacampagne and others 2010) biosynthesis. Deluc and others (2009) established a positive relationship between ABA and anthocyanins accumulation. Under water-deficit conditions, increased (Deluc and others 2009) and decreased (Antolín and others 2006, 2008; Deluc and others 2009) grape berry ABA concentrations were reported in different grapevine cultivars. In the present study, a significant reduction of ABA concentration at veraison in SDI-treated berries was found (Fig. 3A), which could lead to lower anthocyanins accumulation at harvest (Table 2). Therefore, our data support a positive relationship between ABA accumulation at the beginning of veraison and anthocyanins levels at harvest time.

The importance of auxins for fruit set and subsequent growth is well established in different fruits including grape berries (Zhang and others 2003). Frequently, it has been reported that the level of auxins is high in the early fruit growth phase, after which it declines strongly, remaining low throughout the rest of berry development and reaching a minimum at harvest (Deytieux-Belleau and others 2007; Böttcher and others 2010a). A similar pattern was observed in the present work with Tempranillo (Fig. 3B). The higher concentrations of IAA in young fruits may increase berry size due to increased cell size (Böttcher and others 2010b). Water deficit reduced IAA concentration in berries at pea-size stage (Fig. 3B). Since higher levels of IAA in young berries coincide with the phase of rapid cell division after fruit set (McCarthy 2000), it could be suggested that diminished levels of IAA in SDI-treated berries at pea size stage could have contributed to low berry size (Table 1).

Salicylic acid (SA) plays pivotal roles in regulating biotic and abiotic stress responses and plant developmental processes including fruit ripening (Klessig and Malamy 1994). It has been

reported that exogenous SA application delays ripening by having an effect on softening, sugar content, or ethylene biosynthesis in different fruits (Asghari and Aghdam 2010) including grape berries (Kraeva and others 1998). Water deficit increased SA concentration in pea-sized berries, but at onset of veraison SA abruptly decreased (Fig. 3C). Taking into account that SA application to grape berries at veraison induced the expression of key genes involved in phenolic biosynthesis (Wen and others 2005), we propose that increased levels of endogenous SA in well-watered plants during ripening might contribute to enhanced accumulation of anthocyanins and flavonols at harvest (Table 2). With respect to anthocyanins accumulation, the SA effect would be similar to the ABA effect described above.

Although jasmonic acid (JA) was detected in plant fruits many years ago, its involvement in fruit development and/or ripening is poorly understood (Peña-Cortés and others 2005). In grape berries, JA concentration decreased by 30 days after flowering and remained low throughout ripening (Kondo and Fukuda 2001), similar to the pattern found in our study (Fig. 3D). Water deficit caused higher JA levels at pea size and at harvest in berries of SDI grapevines than in those well watered, suggesting a possible role of this hormone in berry response to water stress. To our knowledge, there are no reports on the effect of water stress on the concentration of JA in grape berries.

Grape and ultimately wine N-containing metabolites influence quality components (Herbert and others 2005; Ali and others 2010). In some cases, it has been reported that total N concentration in grapes increases during ripening (Bell and Henschke 2005). However, N concentration may decline towards the end of ripening as occurred in other studies (Hilbert and others 2003) and in our experiment (Fig. 4A and 4C). In grapes, amines come mainly from the decarboxylation of amino acids. It can be hypothesized that accumulation of amines (Fig. 4B) in berries of SDI-treated plants at harvest originated from amino acids present in berries at



harvest (Fig. 4A). Although there was no significant difference between control and SDI-treated plants with respect to amino acids present in berries at harvest, there was a tendency to decrease in SDI-treated plants (Fig. 4A), and it should be noted that amine-concentration is two orders of magnitude less than of amino acids (Fig. 4A and 4B). GLN is clearly the predominant amino acid present early in berry development (Table 3). This amino acid has been shown to be a major form of transported N present in the phloem sap of grapevine and is presumably transported to the berry via the phloem (Ghisi and others 1984; Loulakakis and Roubelakis-Angelakis 2000). After transport to the berry, GLN can act as a precursor for subsequent biosynthesis of other amino acids (such as PRO and HYP) and amines (such as SPD and PUT) via GLU. Water-deficit treatment altered the composition and concentrations of amino acids and amines in Tempranillo berries at harvest (Tables 3 and 4). Thus, ASP and GLU were decreased in SDI berries at harvest; this could be a result of an accumulation of CAD, SPD, and PUT (Table 4; Loulakakis and others 2009) at the expense of GLU. Low concentrations of amines are always present in grapes because some amines, especially polyamines (PUT, CAD and SPD), are indispensable components of berries and are involved in their development (Baigorri and others 2001; Antolín and others 2008). However, accumulation of other amines, such as TYR and PHETIL, could have undesirable effects on human health (Ancín-Azpilicueta and others 2008). The influence of water deficit on amine metabolism is poorly understood. Only Bover-Cid and others (2006) analyzed levels of amines in grapes and concluded that water stress in vineyards does not affect the amine content. By contrast, our data (Table 4) are in agreement with those of Coelho and others (2005), who showed that the content of every amine increased in lettuce plants subjected to water stress. With respect to amines, our data indicate that all of them increased in berries of SDI-treated plants with respect to the controls at harvest, including those with undesirable effects on human health (TYR and PHETIL).

The above-described, SDI-mediated changes detected in grape berry growth and composition could lead to changes in wine sensory attributes. Thus, SDI in Tempranillo caused smaller berries with larger relative skin mass (Table 1). McCarthy (2000) showed that smaller-size of berries subjected to post-flowering stress (as reported in the present work) were caused by reduced cell division. The higher relative skin mass in SDI-treated berries has been attributed to differential skin growth sensitivity of exocarp and mesocarp (Roby and Matthews 2004) in terms of decreased activity of pectin methylesterase (Deytieux-Belleau and others 2008). For red wine grapes, some water deficit during the growing season is a powerful way to modify the amount of berry polyphenols and improve wine quality (Kennedy and others 2002, Chalmers and others 2010). Reduction in berry growth usually leads to increased accumulation of total phenolics, particularly anthocyanins and catechins (Castellarin and others 2007; Intrigliolo and Castel 2010), being this effect more accentuated for anthocyanins than for flavonols and proanthocyanidins (Kennedy and others 2002; Downey and others 2006; Ollé and others 2011).

By contrast, our findings showed that imposition of SDI reduced concentrations of anthocyanins and flavonols (Table 2). Similarly, Esteban and others (2001) reported that anthocyanin concentrations measured at harvest in Tempranillo were higher in irrigated than in non-irrigated grapevines. In most of the above-cited studies, water deficit was applied during a certain extent of ripening, whereas in our case SDI treatment was applied throughout the entire reproductive cycle, showing that the effects of water deficit on phenolic amounts vary according to the grapevine cultivar and timing of water restriction (Girona and others 2009; Basile and others 2011). Since the observed increase in the relative skin mass of SDI berries (Table 1) did not lead to more concentrated skin constituents (data not shown), we can suggest that lower anthocyanin and flavonol concentrations of SDI treatment (Table 2) could be due to reduction in their biosynthetic pathways. Supporting this observation, different

proteomic and transcriptomic studies in berries from grapevines subjected to water stress have reported considerable changes on the metabolic pathways of secondary metabolites. Specifically, it has been reported that changes in anthocyanin and flavonol levels in water-deficit berries depend on expression and activity of enzymes of flavonoid pathway, including flavonol synthase, chalcone isomerase, leucoanthocyanidin reductase, and anthocyanidin reductase (Castellarin and others 2007; Deluc and others 2009; Grimplet and others 2009).

SDI treatment also affected grapevine phenology since SDI-treated plants started veraison 5 days before than well-irrigated plants, whereas maturity was reached 5 days later (see Material and Methods). Also, SDI in grapevine reduced shoot growth, yield, source (leaf area)-to-sink ratio, and fruit size (Table 1, Fig. 2B, C). One interesting question is whether shoot growth inhibition in SDI plants might be attributed, at least in part, to decreased mineral supply (especially N) because, in a dry soil, uptake of nutrients becomes more difficult (Keller 2005). SDI plants had only 40% of pot capacity, and the soil water potential data (Fig. 1) suggest that the potting media was often quite dry. Furthermore, it is very difficult to uniformly wet the entire soil volume in the pot, particularly if applying only 40% of the pot capacity. Thus, it seems possible that portions of the soil profile may well have remained dry, even after applying water, and the possibility that SDI plants may have limited nutrient uptake cannot be fully ruled out. However, plants did not develop deficiency-related symptoms during the whole experiment (monitored visually, not shown). Also, although the N compounds measured are minor with respect to the total N pool, concentrations were either similar or higher in berries from SDI plants but never lower (Fig. 4). On the other hand, inhibition of shoot growth in SDI plants might result from diminished photosynthetic capacity due to both marked reductions in net photosynthetic rates (see for instance Salazar-Parra and others 2012b) and drastic reduction in total leaf surface (Fig. 2B), which also decreased the source-to-sink ratio below the optimum (Fig. 2C). These changes could result in yield losses without any

improvement in berry quality (Tables 1 and 2; Chaves and others 2010). The drastic reduction of leaf-to-fruit ratio obtained in SDI grapevines could lead to decreased sugar loading to berries, as indicated by low berry soluble sugars at harvest (Table 1). However, this dominant effect of leaf-to-fruit ratio on berry soluble sugars content is not clearly established (Santesteban and Royo 2006; Etchebarne and others 2010).

In summary, this study showed that application of a sustained water deficit to grapevine cv. Tempranillo during fruit development and ripening produced a general alteration of hormonal status in berries, which was accompanied by a reduction in berry size (proposed to be mediated by IAA changes) and phenolic compounds (proposed to be mediated by ABA and SA), and an accumulation of amines at harvest (suggested to originate from decarboxylation of amino acids). This study provided evidence that water-deficit irrigation during grapevine ripening altered berry hormonal content, decreased main phenolic accumulation, and changed berry N-compound profiles. This study was carried out in potted grapevines and therefore extrapolations to field-grown grapevines should be made with due caution. However, pot experiments enable optimal control of grapevine irrigation, which is necessary to assure that plants experience the required water stress. To our knowledge, this is the first study that reported effects of water-deficit irrigation on main endogenous hormones involved in grape berry growth and ripening and their involvement in berry phenolic and N metabolism.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fundación Universitaria de Navarra (2011) and Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN BFU2011-26989), Spain. F. Morales thanks Gobierno de Aragón (A03 research group) for financial support. M. Niculcea was the recipient of a grant from Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra. Authors thank F. Aguirrezábal (Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA), Spain) for providing grapevine cuttings, and A. Urdiáin and M. Oyárzun for technical assistance during experiments.

## References

- Ali K, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R (2010) Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem Rev* 9:357-378
- Ancín-Azpilicueta C, González-Marco A, Jiménez-Moreno N (2008) Current knowledge about the presence of amines in wine. *Crit Rev Food Sci* 48:257-275
- Antolín MC, Ayari M, Sánchez-Díaz M (2006) Effects of partial rootzone drying on yield, ripening and berry ABA in potted Tempranillo grapevines with split roots. *Aust J Grape Wine R* 12:13-20
- Antolín MC, Santesteban H, Santa María E, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M (2008) Involvement of abscisic acid and polyamines in berry ripening of *Vitis vinifera* (L.) subjected to water deficit irrigation. *Aust J Grape Wine R* 14:123-133
- Antolín MC, Santesteban H, Ayari M, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M (2010) Grapevine fruiting cuttings: an experimental system to study grapevine physiology under water deficit conditions. In: Delrot S, Medrano Gil H, Or E, Bavaresco L, Grando S (eds.) *Methodologies and Results in Grapevine Research*. Springer Science+Business Media B.V., pp. 151-163
- Asghari M, Aghdam MS (2010) Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends Food Sci Tech* 21:502-509
- Baigorri H, Antolín C, De Luis I, Gény L, Broquedis M, Aguirrezábal F, Sánchez-Díaz M (2001) Influence of training system on the reproductive development and hormonal levels of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo. *Am J Enol Viticult* 52:357-364
- Basile B, Marsal J, Mata M, Vallverdú X, Bellvert J, Girona J (2011) Phenological sensitivity of Cabernet Sauvignon to water stress: vine physiology and berry composition. *Am J Enol Viticult* 62:452-461
- Bell SJ, Henschke PA (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust J Grape Wine R* 11:242-295

- Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C (2010a) Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amino synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *J Exp Bot* 61:3615-3625
- Böttcher C, Harvey K, Forde CG, Boss PK, Davies C (2010b) Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. *Aust J Grape Wine R* 17:1-8
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (2006) Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chem* 96:43-47
- Castellarin SD, Matthews MA, Di Gaspero G, Gambetta GA (2007) Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 227:101-112
- Chalmers YM, Downey MO, Krstic MP, Loveys BR, Dry PR (2010) Influence of sustained deficit irrigation on colour parameters of Cabernet Sauvignon and Shiraz microscale wine fermentations. *Aust J Grape Wine R* 16:301-313
- Chaves MM, Zarrouk O, Francisco R, Costa JM, Santos T, Regalado AP, Rodrigues ML, Lopes CM (2010) Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Ann Bot* 105:661-676
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan J, Latche A, Lamon J, Bouzayen M (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Sci* 167:1301-1305
- Chervin C, Tira-umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D, Roustan JP (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiol Plantarum* 134: 534-546
- Coelho AF, Gomes EP, Soussa A de P, Glória MBA (2005) Effect of irrigation level on yield and bioactive amine content of American lettuce. *J Sci Food Agr* 85:1026-1032

- Coombe BG (1995) Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Aust J Grape Wine R* 1:104-110
- Davies C, Böttcher C (2009) Hormonal control of grape berry ripening. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*. New York: Springer pp 229-261
- Deluc LG, Grimplet J, Wheatley MD, Tillett RL, Quilici DR, Osborne C, Schooley DA, Schlauch KA, Cushman JC, Cramer GR (2007) Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8:429
- Deluc LG, Quilici DR, Decendit A, Grimplet J, Wheatley D, Schlauch A, Mérillon JM, Cushman JC, Cramer GR (2009) Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavour and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* 10:212
- Deytieux-Belleau C, Gagné S, L'Hyvernay A, Donèche B, GénY L (2007) Possible roles of both abscisic acid and indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *J Int Sci Vigne Vin* 41:141-148
- Deytieux-Belleau C, Vallet A, Donèche B, GénY L (2008) Pectin methylesterase and polygalacturonase in the developing grape skin. *Plant Physiol Biochem* 46:638-646
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *Am J Enol Viticult* 57:257-268
- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A (2005) Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Agr Food Chem* 53:8437-8442
- El-Kereamy A, Chervin C, Roustan JP, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M, Raynal J, Ford C, Latché A, Pech JC, Bouzayen M (2003) Exogenous ethylene stimulates the long-term



- expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiol Plantarum* 119:175-182
- Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR (2001) Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *J Sci Food Agr* 81:409-420
- Etchebarne F, Ojeda H, Hunter JJ (2010) Leaf: fruit ratio and vine water status effects on grenache noir (*Vitis vinifera* L.) berry composition: water, sugar, organic acids and cations. *S Afr J Enol Vitic* 31:106-115
- Fernández O, Martínez O, Hernández Z, Guadalupe Z, Ayestarán B (2011) Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Res Int* 44:84-91
- Gagné S, Cluzet S, Mérillon JM, Gény L (2011) ABA initiates anthocyanin production in grape cell cultures. *J Plant Growth Regul* 30:1-10
- Ghisi R, Jannini B, Passera C (1984) Changes in the activities of enzymes involved in nitrogen and sulphur assimilation during leaf and berry development of *Vitis vinifera*. *Vitis* 23:257-267
- Girona J, Marsal J, Mata M, del Campo J, Basile B (2009) Phenological sensitivity of berry growth and quality of “Tempranillo” grapevines (*Vitis vinifera* L.) to water stress. *Aust J Grape Wine R* 15:268-277
- Gómez-Alonso S, Hermosín I, García-Romero E (2007) Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ion as aminoenones derivatives in wine and beer samples. *J Agr Food Chem* 55:608-613
- Grimplet J, Wheatley MD, Ben Jouira H, Deluc LG, Cramer GR, Cushman JC (2009) Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics* 9:2503-2528

- Guadalupe Z, Ayestarán B (2008) Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. cv. "Tempranillo" during vinification and aging. *Eur Food Res Technol* 228:29-38
- Guadalupe Z, Soldevilla A, Sáñez-Navajas MP, Ayestarán B (2006) Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *J Chromatogr* 1112:112-120
- Herbert P, Cabrita MJ, Ratola N, Laureano O, Alves A (2005) Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, subregion, and vintage. *J Food Eng* 66:315-322
- Hernández-Orte P, Ibraiz MJ, Cacho J, Ferriera V (2003) Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method. *Chromatographia* 58:29-35
- Hilbert G, Soyer J-P, Molot C, Giraudon J, Milin S, Gaudillère J-P (2003) Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis* 42:69-76
- Iland P, Bruer N, Edwards G, Weeks S, Wilkes E (2004) Chemical analysis of grapes and wine techniques and concepts. Campelltown, Australia: Patrick Iland wine promotions..
- Intrigliolo DS, Castel JR (2010) Response of grapevine cv. Tempranillo to timing and amount of irrigation: water relations, vine growth, yield and berry and wine composition. *Irrigation Sci* 28:113-125
- Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Kobayashi S, Esaka M (2004) Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci* 167:247-252
- Keller M (2005) Deficit irrigation and vine mineral nutrition. *Am J Enol Viticult* 56: 267-283
- Kennedy JA, Jones GP (2001) Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J Agric Food Chem* 49:1740-1746

- Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL (2002) Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am J Enol Viticult* 53:268-274
- Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* 26:1439-1458
- Kondo S, Fukuda K (2001) Changes of jasmonates in grape berries and their possible roles in fruit development. *Sci Hortic-Amsterdam* 91:275-288
- Kraeva E, Andary C, Carbonneau A, Deloire A (1998) Salicylic acid treatment of grape berries retards ripening. *Vitis* 37:143-144
- Lacampagne S, Gagné S, Gény L (2010) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *J. Plant Growth Regul* 29:81-90
- Lebon G, Brun O, Magné C, Clément C (2005) Photosynthesis of the grapevine (*Vitis vinifera*) inflorescence. *Tree Physiol* 25:633-639
- Lebon G, Wojnarowicz G, Holzapfel B, Fontaine F, Vaillant-Gaveau N, Clément C (2008) Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J Exp Bot* 59:2565-2578
- Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2000) Enzymes of ammonia assimilation in *Vitis vinifera*. *Acta Hortic* 526:209-223
- Loulakakis KA, Morot-Gaudry JF, Velanis CN, Skopelitis DS, Moschou PN, Hirel B, Roubelakis-Angelakis KA (2009) Advancements in nitrogen metabolism in grapevine. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*. New York: Springer pp. 161-205
- McCarthy MG (2000) Developmental variation in sensitivity of *Vitis vinifera* L. (Shiraz) berries to soil water deficit. *Aust J Grape Wine R* 6:136-140
- Montoliú A, López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2009) A novel in vitro tissue culture approach to study salt stress responses in citrus. *Plant Growth Regul* 59:179-187

- Mullins MG (1966) Test-plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. Nature 209:419-420
- Ollat N, Geny L, Soyer JP (1998) Les boutures fructifères de vigne: validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. I. Principales caractéristiques de l'appareil végétatif. J Int Sci Vigne Vin 32:1-9
- Ollé D, Guiraud JL, Souquet JM, Terrier N, Ageorges A, Cheynier V, Verries C (2011) Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. Aust J Grape Wine R 17:90-100
- Peña-Cortés H, Barrios P, Dorta F, Polanco V, Sánchez C, Sánchez E, Ramírez I (2005) Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. J Plant Growth Regul 23:246-260
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudraud P, Ribéreau-Gayon P (1972) Traité d'Enologie sciences et techniques du vin. Tome I – analyse et control des vins. (Paris: Dunod).
- Roby G, Matthews MA (2004) Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. Aust J Grape Wine R 10:74-82
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F (2010) Effects of climate changes scenarios on Tempranillo grapevine (*Vitis vinifera* L.) ripening: response to a combination of elevated CO<sub>2</sub> and temperature, and moderate drought. Plant Soil 337:179-191
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F (2012a) Climate change (elevated CO<sub>2</sub>, elevated temperature and moderate drought) triggers the antioxidant enzymes' response of grapevine cv. Tempranillo, avoiding oxidative damage. Physiol Plantarum 144:99-110
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F (2012b) Photosynthetic response of Tempranillo grapevine to climate change scenarios. Ann Appl Biol 161:277-292

- Santesteban LG, Royo JB (2006) Water status, leaf area and fruit load influence on berry weight and sugar accumulation of cv. 'Tempranillo' under semiarid conditions. *Sci Hort* 109:60-65
- Smart R, Robinson M (2006) *Sunlight into wine: A handbook for winegrape canopy management*. Adelaide: Winetittles Pty. Ltd
- Stines AP, Grubb J, Gockowiak H, Henschke PA, Høj PB, Heeswijck R van (2000) Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Aust J Grape Wine R* 6:150-158
- Symons G, Davies C, Shavrukov Y, Dry I, Reid J, Thomas M (2006) Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol* 140:150-158
- Treeby M, Holzapfel BP, Walker RR, Nicholas PR (1998) Profiles of free amino acids in grapes of grafted Chardonnay grapevines. *Aust J Grape Wine R* 4:121-126
- Wen PF, Chen JY, Kong WF, Pan QH, Wan SB, Huang WD (2005) Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Sci* 169:928-934
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C (2009) The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Aust J Grape Wine R* 15:195-204
- Zhang XR, Luo GG, Wang RH, Wang J, Himelrick DG (2003) Growth and developmental responses of seeded and seedless grape berries to shoot girdling. *J Am Soc Hort Sci* 128:316-323



**6. INVOLVEMENT OF BERRY HORMONAL CONTENT IN  
THE RESPONSE TO PRE-AND POST-VERAISON WATER  
DEFICIT IN DIFFERENT GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.)  
CULTIVARS**

---

“IMPLICACIÓN DEL CONTENIDO HORMONAL DE LA BAYA EN LA  
RESPUESTA AL RIEGO DEFICITARIO PRE Y POST-ENVERO DE DIFERENTES  
CULTIVARES DE VID (*Vitis vinifera* L.)”

*Australian Journal of Grape and Wine Research (en revisión)*

---





## **RESUMEN**

El conocimiento del impacto del momento fenológico de aplicación del riego es crítico para poder implementar estrategias de riego deficitario apropiadas en el viñedo y conseguir así una adecuada producción y calidad de la uva. Estudios previos han mostrado que la aplicación de un riego deficitario durante el desarrollo del fruto y su maduración modifica el estado hormonal de la baya. Por lo tanto, el objetivo de este estudio ha sido analizar la implicación del estado hormonal de la baya en la calidad y composición de la uva en respuesta a dos estrategias de riego deficitario regulado, aplicado durante dos estadios fenológicos (desde el cuajado hasta el envero y desde el envero hasta la cosecha). El estudio se llevó a cabo con esquejes fructíferos de dos variedades de *Vitis vinifera* L., Tempranillo y Graciano. Los tratamientos fueron: 1) un déficit hídrico temprano (pre-envero) en donde se aplicó el 50% del agua aplicado a las plantas bien regadas desde el cuajado hasta el inicio del envero (ED); 2) un déficit hídrico tardío en donde la aplicación de agua se redujo al 50% entre el envero y la cosecha (LD); y 3) plantas regularmente regadas al 80% de la capacidad de la maceta como controles. Los resultados muestran que en Tempranillo, el tratamiento ED incrementó la cantidad de polifenoles y aminoácidos, pero disminuyó la acumulación de antocianinas, mientras que en Graciano, el sistema ED redujo el tamaño de la baya e incrementó las concentraciones de antocianinas, aminoácidos y aminos. El tratamiento LD mejoró el contenido de polifenoles en Tempranillo. Sin embargo, en Graciano, LD produjo bayas con mayor concentración de antocianinas, aminoácidos y aminos. Ambos sistemas de riego deficitario alteraron la evolución del ácido indol-3-acético (IAA), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) en las bayas durante su desarrollo y maduración. Se discuten la relación entre IAA y JA en el control del tamaño de la baya, ABA y SA en el control de la composición de la uva y la sensibilidad fenológica al riego deficitario.



## **ABSTRACT**

Understanding the effects of timing of irrigation is critical to apply the appropriate deficit irrigation strategies to grapevines and achieve the desired yield and berry quality. Previous findings showed that application of water deficit during fruit development and ripening modified hormonal status in berries. Therefore, the goal of this study was to analyze the involvement of berry hormonal status on fruit quality and composition in response to regulated deficit irrigation strategies, applied during two phenological stages (from fruit set to veraison and from veraison to harvest). The study was carried out on fruiting cuttings of two cultivars of *Vitis vinifera* L., Tempranillo and Graciano. Treatments were: 1) an early (pre-veraison) water deficit strategy that was performed by applying 50% of the amount of water applied to control well-watered plants from fruit set to veraison (ED); 2) a late water deficit treatment in which water application was reduced to 50% from veraison to harvest (LD); and 3) plants regularly irrigated at 80% of pot capacity were used as control. Results showed that in Tempranillo, ED procedure increased polyphenols and amino acids, but decreased anthocyanin accumulation whereas in Graciano, ED treatment decreased berry size and increased anthocyanin, amino acid and amine contents. The LD water shortage increased polyphenols in Tempranillo. However in Graciano, LD strategy resulted in improved anthocyanins and increased amino acids and amines. Both ED and LD strategies modified evolution of indole-3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) during berry development and ripening. Relationships between endogenous IAA and JA controlling berry size, endogenous ABA and SA controlling berry composition and phenological sensitivity to deficit irrigation are discussed.

*Keywords:* Abscisic acid (ABA), anthocyanins, indole-3 acetic acid (IAA), jasmonic acid (JA), deficit irrigation, nitrogen-compounds, salicylic acid (SA)



## **Introduction**

Population growth, economic development, environmental demands, and climate change converge into a scenario of water scarcity worldwide and therefore, water supply may constrain grapevine production and wine quality (Ortega-Farias *et al.* 2012). In this context, regulated deficit irrigation (RDI) has emerged as a potential strategy to control vegetative development and reduce berry size, improve cluster microclimate, increase water use efficiency and sugar and polyphenol content in several wine grape varieties and under different edaphoclimatic conditions (McCarthy *et al.* 2002, Kriedemann and Goodwing 2004, Chaves *et al.* 2010, Romero *et al.* 2010). In an RDI system, water restriction is applied during determined phenological stages when their effects on fruit growth and quality are neutral or positive, while keeping vineyard vigour in balance with potential production (Greven *et al.* 2005, Pellegrino *et al.* 2006, Ruiz-Sánchez *et al.* 2010, Sofo *et al.* 2012).

However, it is critical to understand responses to the timing of irrigation so that appropriate deficit irrigation strategies are applied that achieve adequate yield and berry quality. It has been reported that the effects of RDI depend on the vine phenological stage and the severity of the stress. Indeed, a pre-veraison water deficit is known to reduce shoot growth and berry early development, which indirectly resulted in earlier grape ripening (Castellarin *et al.* 2007 a, b) and increased accumulation of phenolic compounds (Deluc *et al.* 2009, Santesteban *et al.* 2011, Ollé *et al.* 2011). In this strategy, irrigation is resumed after veraison in order to maintain leaf activity for promotion of sugar synthesis and translocation into the berries (Wample and Smithyman 2002). On the other hand, a post-veraison water deficit reduced berry size but increased the proportion of whole-berry fresh mass represented by seeds and skin (Roby and Matthews 2004), which resulted in higher content of skin-phenolics (Intrigliolo and Castel 2010, Ollé *et al.* 2011). Previous reports have shown that berry quality is characterized by a substantial differential sensitivity to water stress that is also dependent on

grapevine variety. For instance in Tempranillo, a pre-veraison water deficit reduced berry size and decreased berry quality (Girona *et al.* 2009) but a post-veraison water shortage impaired berry sugar accumulation due to the detrimental effect of water stress on photosynthesis (Intrigliolo *et al.* 2012). Moreover, in Chardonnay, a post-veraison water limitation increased total amino acid concentrations but decreased wine quality (Basile *et al.* 2012). By contrast, in Cabernet Sauvignon, a post-veraison water deficit increased anthocyanin and polyphenol concentrations (Basile *et al.* 2011).

A large body of evidence has shown that grape berry growth and ripening are controlled by plant hormones (Davies and Böttcher 2009). In addition, under water deficit conditions, our previous findings have shown that alterations to berry hormone dynamics conditioned berry quality and the composition of phenolic and nitrogen-compounds (Niculcea *et al.* 2013). However, the implications of endogenous changes to berry hormones in response to water deficit imposed at different phenological stages are poorly known. Therefore, the aim of this work was to assess changes in berry hormonal status in response to two RDI strategies applied from fruit set to veraison or from veraison to harvest, and their possible implications for berry quality and composition in two original Spanish wine grape varieties (Tempranillo and Graciano). Because viticulture practices, such as nitrogen supply (Goutu *et al.* 2012) and irrigation schedules (Bover-Cid *et al.* 2006, Basile *et al.* 2012, Niculcea *et al.* 2013) can modify berry nitrogen-compound concentrations, special attention was paid to the effects of both RDI regimes on berry nitrogen profiles. Potted vines were used to facilitate the imposition of a similar water stress procedure in both cultivars.

## Materials and methods

### *Plant material*

Dormant *Vitis vinifera* (L.) cuttings of cv. Tempranillo and Graciano 400-500 mm long and 15-20 mm in diameter were selected in the winter of 2011. The cuttings were propagated by a technique that ensured that the formation of adventitious roots preceded bud burst using steps originally outlined in Mullins (1966) with some modifications described in Ollat *et al.* (1998) and Antolín *et al.* (2010). Cuttings were rooted in a heat-bed (25°C) inside a cool-room (5°C) for 30 days. Rooted cuttings were planted in 10 L plastic pots containing a soil-peat (1:1, v/v) potting mix. After rooting, cuttings were transferred to a greenhouse with a 25/20°C and 70/80% RH (day/night) regime. They were illuminated for 15 h with natural daylight supplemented with metal halide lamps (POWERSTAR, HQI-TS, 400W/D, PRO, Osram, Augsburg, Germany), providing a minimum photosynthetic photon flux density (PPFD) of 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the level of the inflorescence. Bud-break took place after one week under these conditions. Careful control of vegetative growth before flowering improves the partitioning of stored carbon towards the roots and the reproductive structures. Thus, only a single flowering stem was allowed to develop on each plant during growth. After berry set (end of May), growth conditions in the greenhouse were changed to a 25/15°C and 60/80% RH (day/night) regime with a PPFD of 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the level of the inflorescence. A nutrient solution provided mineral nutrition in accordance with viticulture requirements (Ollat *et al.* 1998).

Samples were obtained from berries collected at four stages of development: 25-30 days after anthesis (DAA), corresponding to pea size berries (7 mm diameter) (Eichhorn and Lorenz (E-L) growth stage 31, pea size) (Coombe 1995); 60-70 DAA, when berries began to colour and enlarge (approximately 9°Brix) (E-L 35 stage, onset of veraison); 70-85 DAA, red berries not quite ripe (approximately 16°Brix) (E-L 37 stage, end of veraison); and 100-110 DAA,

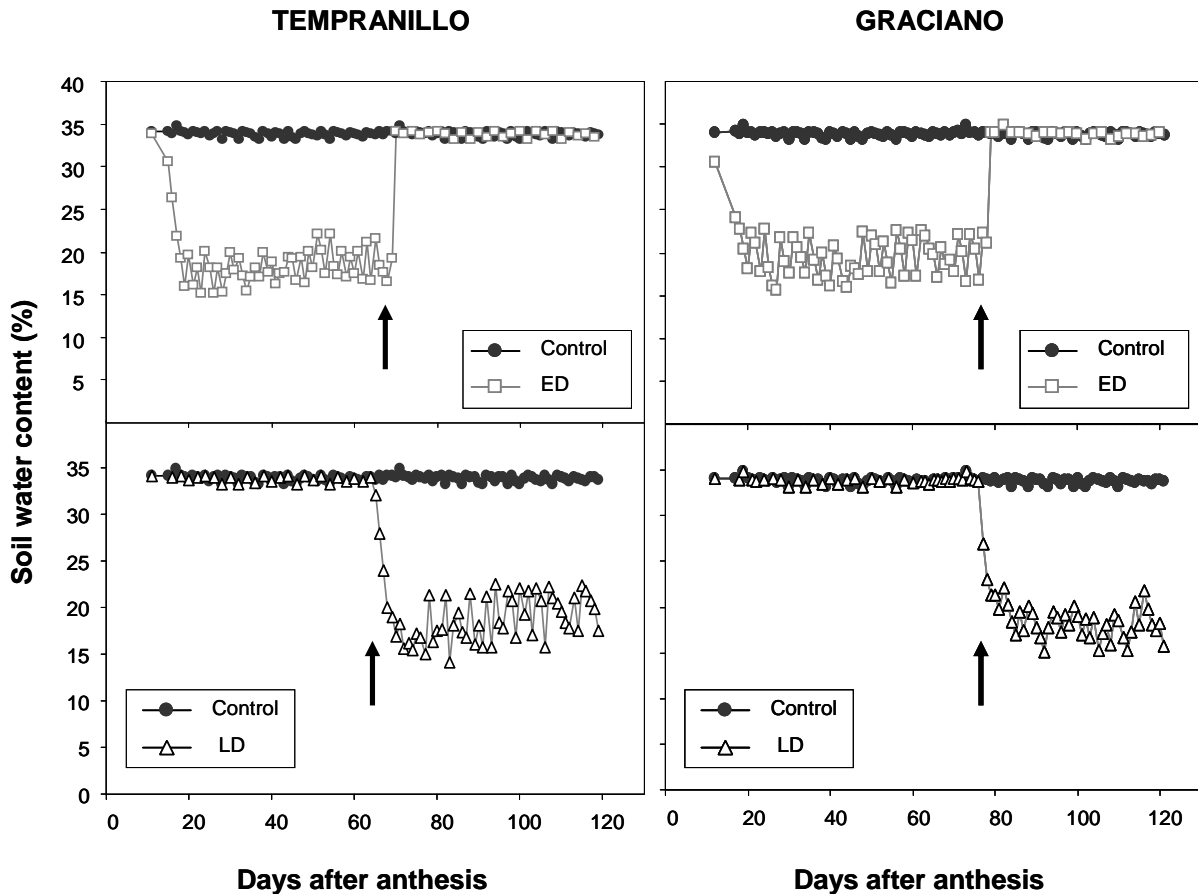
corresponding to commercially ripe berries (approximately 22°Brix) (E-L 38 stage, harvest). There were five replicates for each treatment and sampling-time combination.

#### *Water treatments*

The irrigation programs for the different water supply treatments are summarised in Table 1. Two regulated deficit irrigation (RDI) strategies were compared with a complete irrigation as a control. Treatments were applied after fruit set (E-L stage 27) (Coombe 1995). In the control treatment, pots were maintained at 80% of pot capacity. In the RDI treatments, plants received 50% of the water given to control plants from fruit set to veraison (early deficit, ED) or from veraison to harvest (late deficit, LD). The resulting soil conditions during the experiments are shown in Figure 1. Volumetric soil water content was monitored with an EC 5 water sensor (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA) placed within each pot. Pot capacity was previously assessed by determining water retained after free draining water had been allowed to pass through the holes at the bottom of the pot. The surface of the plant containers was covered with quartz stones during the experiments to avoid water loss due to evaporation. Watering was performed with nutrient solution or deionised water in order to supply the different treatments with the same amount of nutrients during water deficit.

Pre-dawn leaf water potential ( $\Psi$ ) was measured with a SKYE SKPM 1400 pressure chamber (Powys, UK) on five fully expanded leaves per treatment at each sampling date just prior to irrigation. Ninety to one hundred berries from each treatment (45-50 berries per biological replicate) were counted, weighed and frozen at -80°C for further analysis.





**Figure 1.** Soil water content recorded from fruit set to harvest in pots subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD). Values represent means ( $n = 5$ ). Arrow indicates the onset of veraison.

### Polyphenolic composition

Total and extractable anthocyanins and total phenolics were calculated according to the procedure described by Saint-Cricq *et al.* (1998), a method widely used in wineries that has been proven as a good tool for estimating wine colour (Kontoudakis *et al.* 2010). Briefly, two samples of the non-filtered homogenate were macerated for 4 h at pH 1 (HCl) and pH 3.2 (tartaric acid), respectively. Once maceration was over, the macerated samples were centrifuged, and the supernatants were used for the following determinations. Phenolic richness was measured spectrophotometrically in the supernatant obtained after maceration at pH 3.2 at 280 nm. Anthocyanins were determined in both supernatants according to

Ribéreau-Gayon and Stonestreet (1965) using absorbance at 520 nm. Both data were used to calculate the cellular extractability as described in Salazar-Parra *et al.* (2010).

#### *Analysis of Nitrogen Compounds*

Aminoenone derivatives were obtained by reaction of *o*-phthalaldehyde (OPA). Samples were previously diluted in HCl 0.1 M and then were passed through a 0.22 µm particle filter. Chromatographic separation was performed in an ACER-HPLC column 4 µm particle size (150 mm x 3.9 mm), with temperature controlled at 16°C. In these conditions, 21 compounds were separated, identified, and quantified in a single injection: 19 amino acids and 2 biogenic amines. Target compounds were identified according to the retention times and UV-Vis spectral characteristics of the derivatives of the corresponding standards, and they were quantified using the internal standard method. Analyses were performed in triplicate.

#### *Hormone determinations in berries*

The content of abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) in berries were analysed by HPLC coupled to tandem mass spectrometry following protocols from Durgbanshi *et al.* (2005) and Montoliú *et al.* (2009) as described elsewhere (Niculcea *et al.* 2013). Frozen berries were ground and then 0.5 g of powdered tissue was extracted in ultrapure water. Before extraction, 5 µL of a mixture of internal standards containing 100 ng of [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA, 5 ng of [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-IAA, 100 ng of [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-SA and 100 ng of [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-JA was added to assess recovery and matrix effects. After extraction and centrifugation, the pH of the supernatant was adjusted to 3.0 and partitioned twice against di-ethyl-ether. The organic layers were combined and evaporated in a centrifuge vacuum evaporator (Jouan, Saint-Herblain, France). The dry residue was thereafter resuspended in a water: methanol (9:1) solution, filtered, and injected into a HPLC system (Alliance 2695, Waters Corp., Milford, USA). Hormones were then separated in a reversed-phase Kromasil 100 C18 column (100 9 2.1 mm

5- $\mu$ m particle size) using methanol and ultrapure water both supplemented with glacial acetic acid to a concentration of 0.05%. The mass spectrometer, a triple quadrupole system (Quattro LC, Micromass Ltd., Manchester, UK), was operated in negative ionisation electrospray mode and plant hormones were detected according to their specific transitions using a multiresidue mass spectrometric method.

#### *Yield and fruit quality*

Bunches from each treatment type were weighed and all berries from each bunch were separated and weighed to obtain yield. Berries were weighed individually, mean berry weight was determined and berries were separated into skin and flesh. Berry volume was calculated using the formula for a sphere ( $\frac{4}{3}\pi r^3$ , where  $r$  is the radius of the sphere). Leaf area was measured with a portable area meter (model LI-3000, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA). Ten berries from each treatment were collected, weighed and subsequently oven dried at 80°C until constant mass.

A sample of 25 berries was crushed for determination of total soluble sugars, pH and titratable acidity. Soluble solids were measured using a temperature-compensating refractometer (Zuzi model 315, Auxilab, Spain) and were expressed as °Brix. Must pH was measured with a pH meter Crison (Crison Instruments, Barcelona, Spain) standardised to pH 7.0 and 4.0. Finally, titratable acidity was measured by titration with NaOH, and was expressed as g tartaric acid L<sup>-1</sup>.

#### *Statistical analysis*

The statistical analysis applied was a two-factor analysis of variance (ANOVA). Variance was related to the main treatments (variety and irrigation treatment) and to the interaction between them. Means  $\pm$  standard errors (SE) were calculated and, when the F ratio was

significant, least significant differences were evaluated by a Tukey's t-test, as found in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (SPSS Inc., Chicago, USA) version 15.0 for Windows XP. All values shown in the figures are means  $\pm$  SE.

## Results and Discussion

### *Plant water status and plant growth*

Numerous studies have reported that application of water deficits to grapevines can accelerate (Keller 2008) or delay (Sipiora and Gutiérrez 1998) berry ripening. These inconsistencies obtained in response to seasonal water deficits may be related to differences among studies in the timing of water stress, its severity, and duration, and in the variety analyzed (Esteban *et al.* 2001, Sivilotti *et al.* 2005, Girona *et al.* 2009, Intrigliolo and Castel 2010, Basile *et al.* 2011, 2012). The present work have attempted to eliminate such variations by subjecting Tempranillo and Graciano varieties to a similar water stress level either at pre and post-veraison, for comparisons (Figure 1, Table 1). The lowest values of leaf  $\Psi$  were recorded in LD-treated vines at the end of veraison with minimal values of -1.35 and -1.4 MPa for Tempranillo and Graciano, respectively (Figures 2A, 2D). These values are indicative of a relatively severe water stress (Deloire *et al.* 2004, Intrigliolo *et al.* 2012). During ED treatment leaf  $\Psi$  values reached were around -1.1 and -1.2 MPa indicative of a milder water stress.

Both water-deficit irrigation strategies resulted in reduced yield (Table 2) and vegetative growth measured as leaf area (Figures 2C, 2F). The balance between vine supply capacity and crop demand (i.e. crop load) expressed in terms of leaf area per yield was decreased in LD treated plants of Tempranillo and in ED and LD of Graciano (Table 2). However, in both cultivars, leaf to fruit ratios of water-stressed plants were within or close to the range of optimum values to achieve suitable fruit quality (Kliewer and Dokoozlian 2005) suggesting well-balanced vines.

Table 1.

Irrigation programs corresponding to the three treatments of water supply to Tempranillo and Graciano grapevines during berry development.

Treatment	Days after anthesis					
	10	32	59	70	85	102
Tempranillo	10	32	59	70		102
Graciano	10	23	68	85		108
	Fruit set	Pea size	Onset of veraison	End of veraison		Maturity
Control	80% PC	80% PC	80% PC	80% PC		80% PC
ED	40% PC	40% PC	80% PC	80% PC		80% PC
LD	80% PC	80% PC	40% PC	40% PC		40% PC

ED, early deficit irrigation; LD, late deficit irrigation; PC, pot capacity

Table 2.

Yield and berry characteristics recorded at harvest from fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD).

Variety	Irrigation	Yield (g plant <sup>-1</sup> )	Crop load (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Berry weight (g berry <sup>-1</sup> )	Berry volume (mm <sup>3</sup> )	Relative skin mass (% berry FM)
Tempranillo	Control	186.61 a	32.75 b	0.93 ab	928.36 a	36.29 c
	ED	127.54 b	20.82 bc	0.85 ab	578.96 b	44.21 a
	LD	136.90 b	13.15 c	0.86 ab	916.13 a	40.53 b
Graciano	Control	103.43 b	54.26 a	0.98 a	711.54 b	36.39 c
	ED	82.93 c	22.21 bc	0.75 b	600.26 b	37.45 bc
	LD	85.05 c	13.76 c	0.88 ab	635.81 b	39.91 bc
Variety (V)		***	**	ns	***	**
Irrigation (I)		***	***	**	***	***
VxI		nst	**	ns	**	**

Values represent means (n = 5). Within each file, means followed by different letter are significantly different (p<0.05) according to a Tukey's test. FM indicates fresh matter. †ns, \*, \*\* and \*\*\* indicate non-significance or significance at 5%, 1% and 0.1% probability levels, respectively.

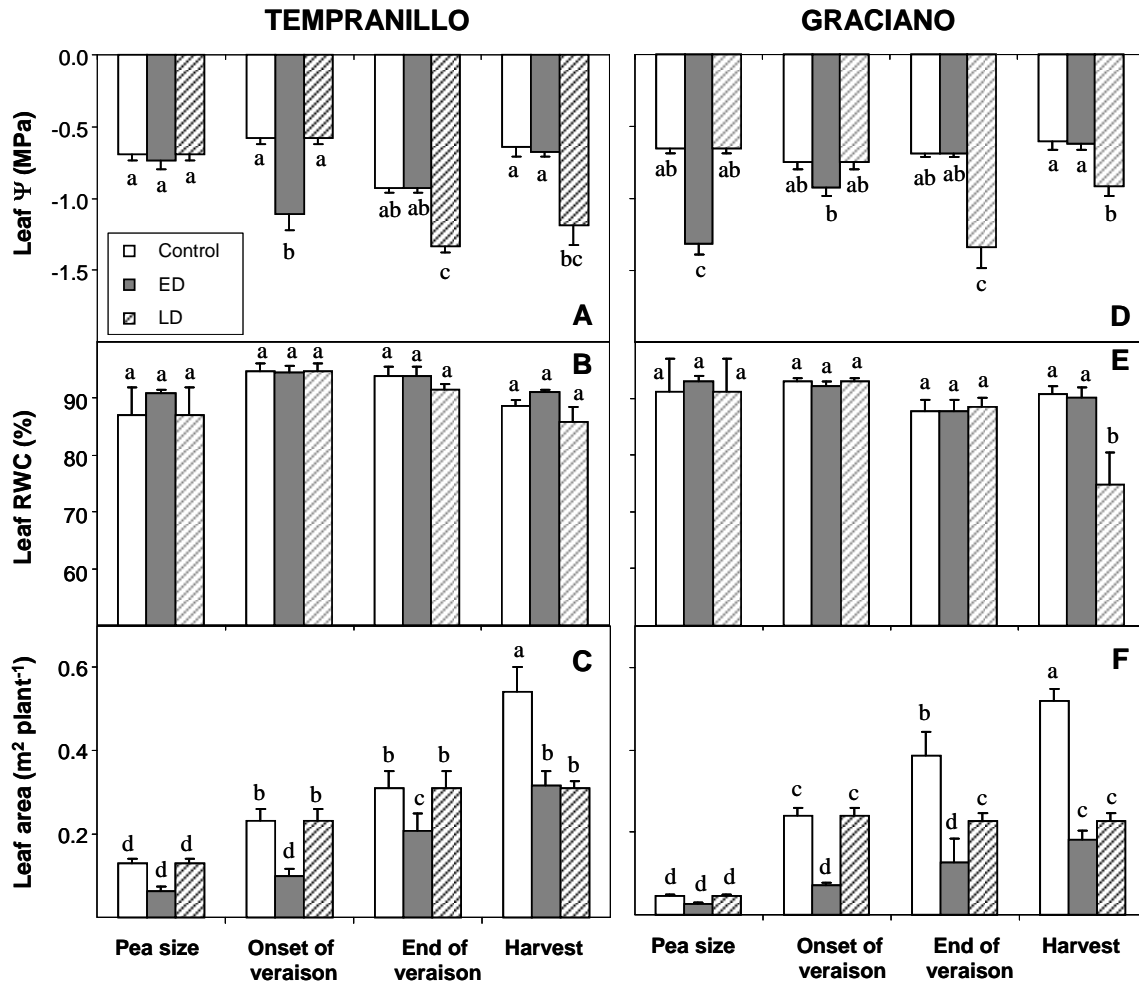


Figure 2. Pre-dawn leaf water potential ( $\Psi$ ) (A, D), leaf relative water content (RWC) (B, E) and plant leaf area (C, F) of fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD). At pea size and onset of veraison, control and LD had the same values because there was the same treatment. Values represent means (n=5). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments according to a Tukey's test.

*Berry composition and must quality*

In Tempranillo, despite the important differences in vine water status and vegetative growth berry growth was almost insensitive to plant water status but berries showed increased relative skin mass, especially in ED treatment (Table 2). In Graciano, berry growth was significantly reduced by ED treatment but no changes in the relative skin mass were detected. Overall results agree with earlier reports that have shown berry size to be very sensitive to water deficit prior to veraison and much less sensitive after veraison (Intrigliolo and Castel 2010, Basile *et al.* 2011, Santesteban *et al.* 2011, Intrigliolo *et al.* 2012). The impact of irrigation



on all the must composition parameters studied was highly significant and differed according to deficit irrigation strategy and grapevine variety analyzed. In general, irrigation led to a delay in obtaining the desirable sugar levels, but ED and LD treatments increased sugar accumulation (Table 3). These results are in agreement with those obtained in field-grown Tempranillo (Sipiora and Gutiérrez 1998, Intrigliolo and Castel 2010) but they are in contrast with results obtained also in field-grown Tempranillo (Santesteban *et al.* 2011) or in potted-plants of Merlot (Sivilotti *et al.* 2005) and Chardonnay (Basile *et al.* 2012). Must titratable acidity was lower in Tempranillo and Graciano berries of ED treatment mainly because of decreased concentration of malic acid (Table 3), which is the main one contributing to changes of must acidity (Romero *et al.* 1993). The LD treatment did not produce significant changes in must acidity for any variety (Table 3).

Water-deficit irrigation applied at pre-veraison (ED) or at post-veraison (LD) improved accumulation of total polyphenols in Tempranillo, but no significant effects were detected for Graciano (Table 3). As a consequence, two-factorial ANOVA showed significant interaction between both factors for polyphenol content evidencing that each variety responded in a different way to water-deficit treatments (Table 3). Several studies have reported that the enhanced polyphenol concentration in water-stressed plants could be due to berry size reduction, increase of skin to pulp mass ratio and/or increased biosynthesis of these components (Esteban *et al.* 2001, Sivilotti *et al.* 2005, Castellarin *et al.* 2007b, Intrigliolo and Castel 2010). All these effects, as occurred in the present study, were strongly dependent of variety. Under well-watered conditions, anthocyanin concentrations were higher in Tempranillo than in Graciano berries, but the application of water-deficit irrigation resulted in different effects on each variety (Figures 3A, 3B). In Tempranillo, ED procedure decreased total anthocyanins but LD treatment did not produce any significant change in comparison to berries of well-watered plants. A reduction of anthocyanin amounts in ED-treated berries was

reported elsewhere by Esteban *et al.* (2001) in this same variety. By contrast in Graciano, the consequences of early and late deficits were similar in the increased accumulation of anthocyanins, which have been attributed to higher expression of genes responsible for anthocyanin biosynthetic pathway during water deficits (Deluc *et al.* 2009). Our data reinforced the idea that effects of water deficit on phenolic composition vary according to the grapevine variety and timing of water restriction. Some studies showed that ED improved anthocyanin accumulation in different grapevine varieties and growth conditions (Castellarin *et al.* 2007b, Basile *et al.* 2011, Intrigliolo *et al.* 2012) but the effect of LD treatment was less obvious. Thus, several results showed that LD can increase (Basile *et al.* 2011, Santesteban *et al.* 2011), reduce (Intrigliolo *et al.* 2012) or no change anthocyanin levels (Sivilotti *et al.* 2005, Castellarin *et al.* 2007b, Girona *et al.* 2009) as occurred in the present study.

Another aspect that is necessary to take into account is that highly coloured red grapes do not necessarily produce the most intensely coloured red wines (Holt *et al.* 2008), because this may be related to the extractability of anthocyanins from grape skins into the must (González-Neves *et al.* 2004). In our study, calculated cellular extractability of anthocyanins represents the percentage of non-extracted anthocyanins at pH 3.2 over the maximum possible, extracted at pH 1 (Figure 3C). A decrease in cellular extractability would indicate that anthocyanins present in grapes are more easily extracted, and an increase would indicate more difficulties for anthocyanins extraction. The last effect was especially relevant in the case of water-deficit irrigated Graciano and may be indicative of maturation excess (Salazar *et al.* 2010). Other effects indicative of maturation excess were decreased malic acid concentration and a pH increase, such as it was observed in plants subjected to ED treatments (Table 3).

Table 3.

Must quality recorded at harvest from fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD).

Variety	Irrigation	Total soluble solids (°Brix)	Must pH	Titratable acidity (g L <sup>-1</sup> )	Malic acid (g L <sup>-1</sup> )	Total polyphenols (mg g <sup>-1</sup> )
Tempranillo	Control	20.76 b	3.86 b	5.42 ab	5.92 a	1.79 b
	ED	22.37 a	4.15 a	4.23 c	4.23 b	3.04 a
	LD	22.04 a	4.03 ab	4.85 bc	5.10 a	3.20 a
Graciano	Control	20.31 b	3.37 c	6.03 a	5.47 a	3.45 a
	ED	22.30 a	3.59 c	4.79 bc	2.43 b	3.40 a
	LD	22.75 a	3.51 c	5.37 ab	5.67 a	3.73 a
Variety (V)		ns	***	***	ns	***
Irrigation (I)		***	***	***	***	***
Vxl		nst	ns	ns	ns	**

Values represent means (n = 5). Within each file, means followed by different letter are significantly different (p<0.05) according to a Tukey's test. FM indicates fresh matter. †ns, \*, \*\* and \*\*\* indicate non-significance or significance at 5%, 1% and 0.1% probability levels, respectively.

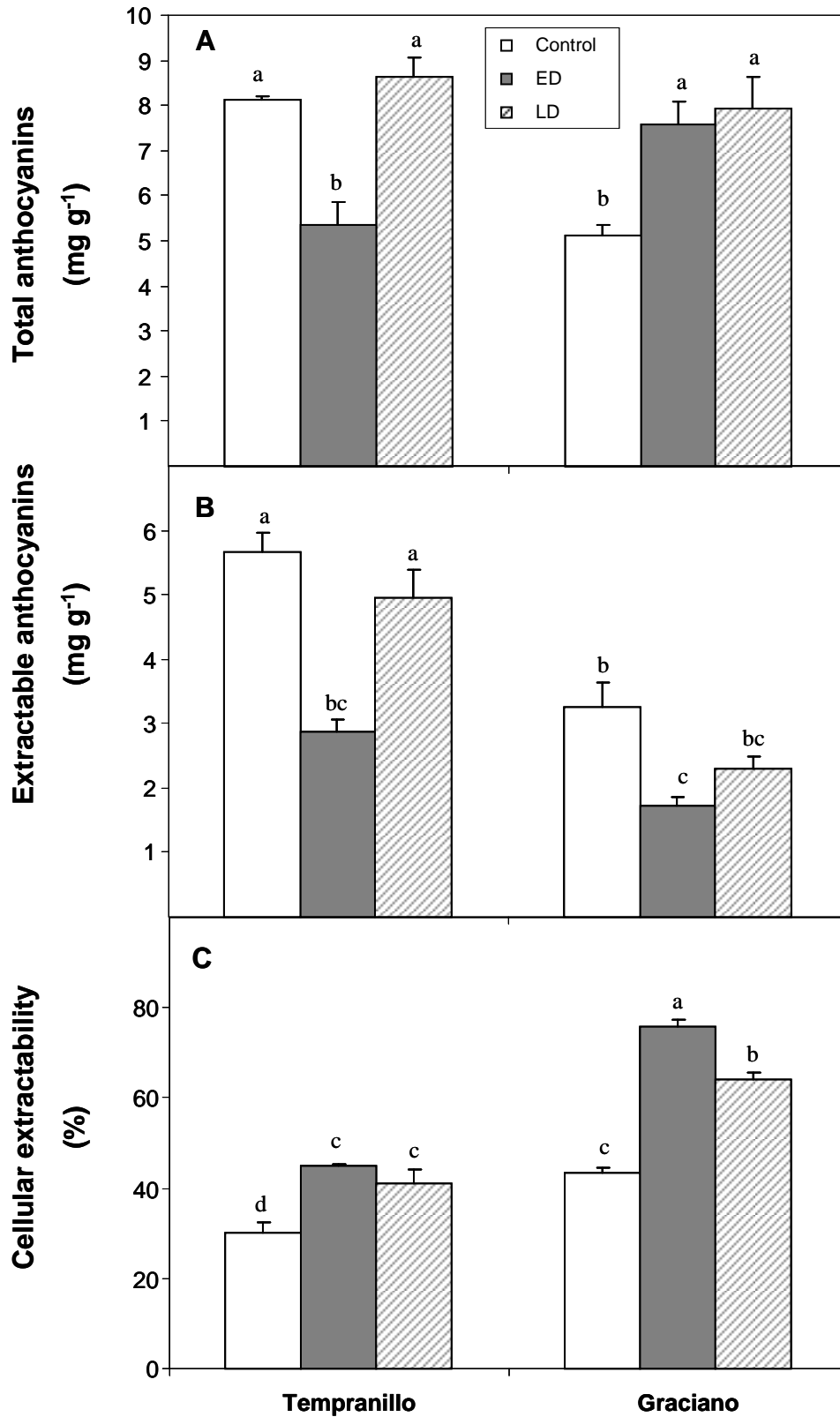


Figure 3. Total anthocyanins (A), extractable anthocyanins (B) and cellular extractability (C) measured at harvest in berries from fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD). Values represent means (n=5). Different letters indicate significant differences (p<0.05) between treatments according to a Tukey's test.

*Berry nitrogen compounds*

Berry amino acids contribute to wine aroma, taste and appearance (Romano *et al.* 2003). Thus, nitrogen-compound profiles analyses could allow estimation of the potential fermentative aroma of grapes. Our results showed that berries from Tempranillo have the highest concentration of total amino acids irrespective of the water treatment applied, suggesting that Tempranillo was the variety with greater aroma potential (Figure 4A). The main amino acids identified are shown in Table 4. Glutamine was the most abundant amino acid in both varieties as shown elsewhere (Stines 2000, Niculcea *et al.* 2013). Berries of Tempranillo have higher concentration of tyrosine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glutamine, histidine, arginine and valine than Graciano berries. On the other hand, there were specific effects of water deficit on nitrogen compounds. Thus, in Tempranillo, the ED irrigation resulted in high amino acid concentration due to accumulation of serine, histidine and arginine in comparison to berries from well-watered plants (Table 4). However, in Graciano, ED-treated berries have high levels of tryptophan, threonine, isoleucine, serine and alanine than those in well-watered berries. The LD procedure did not alter individual composition of amino acids with respect to well-watered plants in Tempranillo. In Graciano, LD treatment increased amino acids in a lesser extent than the ED treatment (Figure 4A), which was in agreement with results reported in Chardonnay by Basile *et al.* (2012). Individual analysis of amino acid composition showed that this increase was due to accumulation of tryptophan, threonine and isoleucine (Table 4). Some of these amino acids in must are very important since they can affect the aromatic quality of wines, because higher alcohols come from them directly (*n*-propanol, isoamyl alcohol and  $\beta$ -phenylethanol from threonine or 2-methyl-1-butanol from isoleucine) (Henández-Orte *et al.* 2002, Garde-Cerdán *et al.* 2009). Thus, it could suggest that application of a water-deficit period in Graciano, and especially a ED strategy, can improve its aromatic potential.

Table 4.

Concentrations of amino acids and amines detected in berries from fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD).

Precursor	Compound (mg g <sup>-1</sup> )	Tempranillo			Graciano			Variety (V)		Irrigation (I)		VxI
		Control	ED	LD	Control	ED	LD					
<i>Amino acids</i>												
3-PGA	Glycine	0.0022 a	0.0025 a	0.0024 a	0.0027 a	0.0037 a	0.0032 a	ns†		ns	ns	ns
	Serine	0.0448 b	0.0647 a	0.0388 b	0.0478 b	0.0713 a	0.0536 ab	ns		**		ns
PEP	Tyrosine	0.1577 a	0.1666 a	0.1321 a	0.0422 b	0.0427 b	0.0440 b	***		ns		ns
	Tryptophan	0.0189 a	0.0276 a	0.0211 a	0.0127 b	0.0180 a	0.0207 a	*		ns		ns
	Phenylalanine	0.0127 a	0.0116 a	0.0087 ab	0.0069 b	0.0090 ab	0.0094 ab	ns		ns		ns
Oxaloacetate	Aspartic acid	0.0565 a	0.0760 a	0.0498 a	0.0184 b	0.0133 b	0.0176 b	***		ns		ns
	Asparagine	0.0291 a	0.0454 a	0.0379 a	0.0051 b	0.0055 b	0.0082 b	***		ns		ns
	Threonine	0.0739 ab	0.1081 a	0.0806 a	0.0603 b	0.0861 a	0.0938 a	*		*		ns
	Methionine	0.0094 a	0.0088 a	0.0069 a	0.0058 a	0.0064 a	0.0091 a	ns		ns		ns

Table 4. (cont.)

Isoleucine	0.0163 a	0.0210 a	0.0143 ab	0.0111 b	0.0161 a	0.0176 a	*	*	ns
Lysine	0.0059 ab	0.0081 a	0.0055 ab	0.0038 b	0.0050 ab	0.0054 ab	*	ns	ns
$\alpha$ -ketoglutarate	0.1154 a	0.1557 a	0.1280 a	0.0479 b	0.0544 b	0.0545 b	***	ns	ns
Glutamic acid	5.2249 a	7.1798 a	5.5875 a	2.2036 b	3.2363 b	4.2304 ab	***	ns	ns
Glutamine	0.0517 bc	0.0949 a	0.0652 ab	0.0206 c	0.0233 c	0.0315 bc	***	ns	ns
Histidine	0.7796 b	1.0893 a	0.7226 b	0.3751 c	0.5143 bc	0.5859 bc	***	*	ns
Arginine	0.0611 b	0.0575 b	0.0526 b	0.0804 a	0.1033 a	0.1155 a	***	ns	ns
$\gamma$ -aminobutyric acid									
Pyruvate	0.1327 a	0.1589 a	0.1139 ab	0.0856 b	0.1483 a	0.1220 ab	ns	*	ns
Alanine	0.0212 a	0.0199 a	0.0249 a	0.0034 b	0.0026 b	0.0039 b	***	ns	ns
Valine	0.0163 ab	0.0210 a	0.0143 ab	0.0111 b	0.0161 ab	0.0176 ab	ns	ns	ns
Leucine									
<i>Amines</i>									
$\alpha$ -ketoglutarate	0.0003 c	0.0002 c	0.0003 c	0.0002 c	0.0004 b	0.0005 a	***	***	***
Putrescine	0.0005 a	0.00012 a	0.00006 a	ND	ND	0.00009 a	**	*	***
Methylamine									

Values represent means (n = 5). Within each column, means followed by different letter are significantly different (p<0.05) according to a Tukey's test. ns, \*, \*\* and \*\*\* indicate non-significance or significance at 5%, 1% and 0.1% probability levels, respectively. ND: not detected.

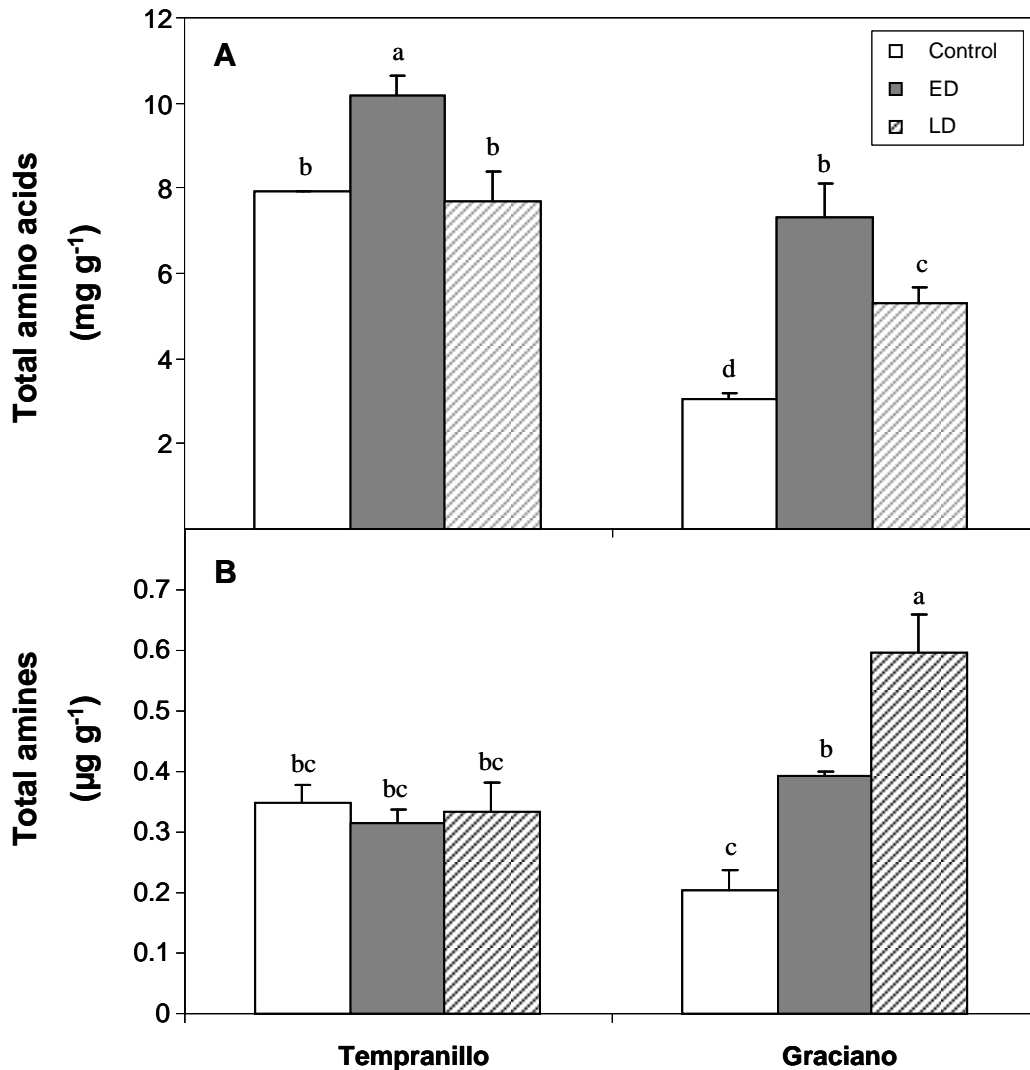


Figure 4. Total amino acid (A) and amine (B) concentrations in berries in berries from fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments during berry ripening: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD). Values represent means (n=5). Different letters indicate significant differences (p<0.05) between treatments according to a Tukey's test.

Amines are organic nitrogenous bases of low molecular weight which are formed during the metabolic processes of living organisms and which are found especially in food from fermentative processes. In wines, amines can be originated from the different wine making procedures or from the grape berries and its accumulation can reduce wine quality (Ancín-Azpilicueta *et al.* 2008). However, low concentrations of amines are always present because putrescine, spermine or spermidine are involved in berry development (Gény *et al.* 1997, Antolín *et al.* 2008). Our data showed that individual composition of amines differed according



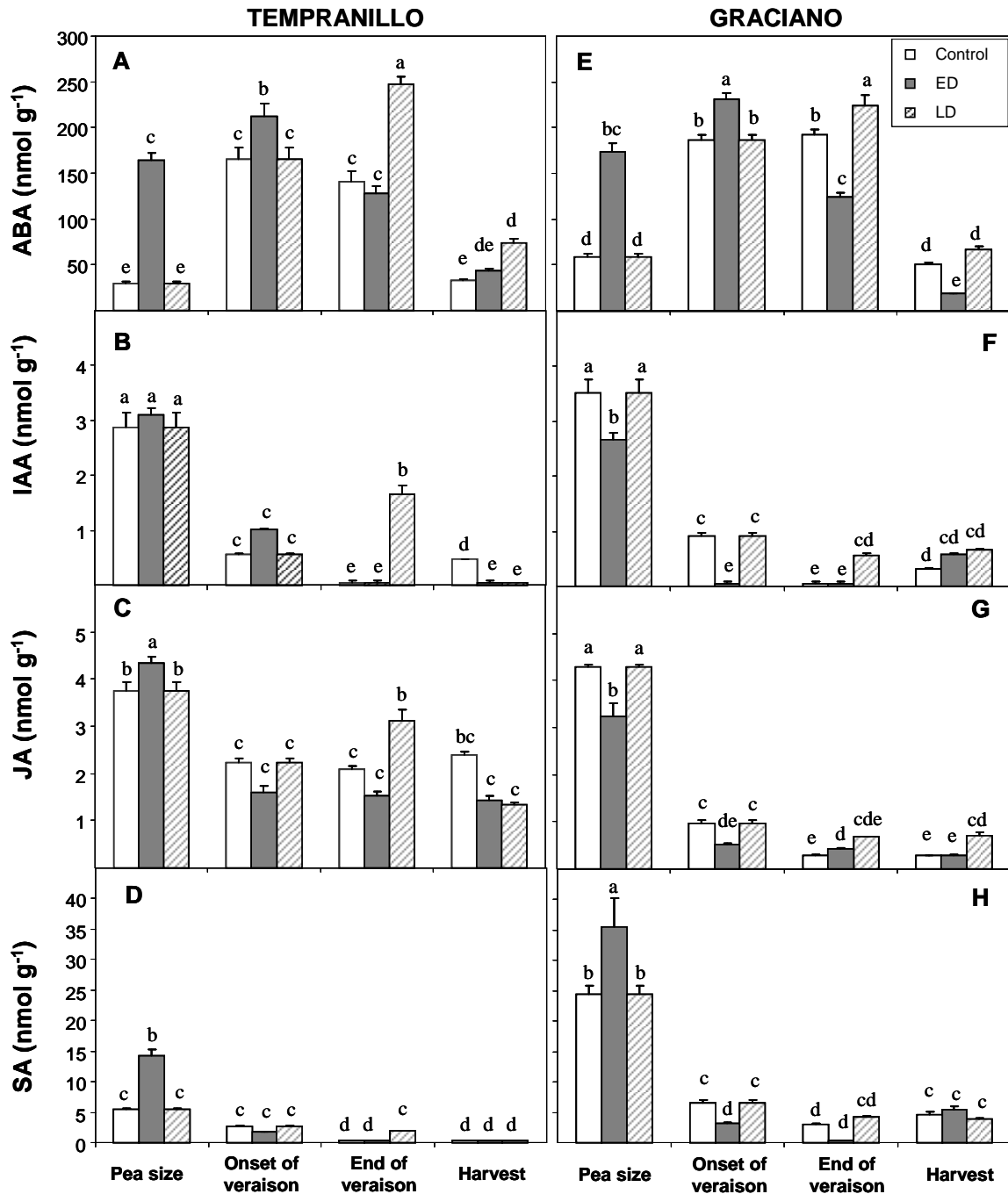
to irrigation schedule and variety. Thus, two-factorial ANOVA showed significant interaction between both factors (Table 4). In Tempranillo, water deficit treatments did not alter content of amines as reported in other studies (Bover-Cid *et al.* 2006). By contrast in Graciano, ED and LD treatments induced significant accumulation of amines, mainly due to increased putrescine (Figure 4B). Our findings suggest that amines come from the decarboxylation of amino acids as indicated by lower amino acid concentration of LD in comparison to ED treatment

#### *Berry hormonal content*

The present work was focused on changes in berry abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) at different stages of growth and ripening (Figure 5). Results showed that hormonal levels were highly modified by ED and LD, being more evident at the pea size stage and at veraison respectively, in both grapevine varieties. In agreement, water stress was reported to alter mRNA expression patterns associated with hormone metabolism in grape berries that, in turn, could modify berry hormonal endogenous status (Grimplet *et al.* 2009, Deluc *et al.* 2009). Under well-watered conditions, our data showed the highest concentration of ABA during veraison and then, it decreased (Figures 5A, 5E), in agreement with early results showing that ABA accumulates in the grape berry at the beginning of ripening (Antolín *et al.* 2008, Deluc *et al.* 2009, Wheeler *et al.* 2009, Niculcea *et al.* 2013). However, imposition of both types of regulated water-deficit altered pattern of ABA accumulation (Figures 5A, 5E). Thus, in the ED treatment significant increases of ABA took place earlier than in control plants (at the pea size), reaching its maximum level at onset of veraison. In the LD treatment, ABA accumulation was extended to end of veraison, reaching a peak at this stage. In Tempranillo, the prolongation of ABA production over time in LD-treated berries has resulted in improved sugars, polyphenols (Table 3), and anthocyanins (Figures 3A, 3B). These results are supported by the well-established effect of ABA on the expression of genes involved in anthocyanin production as the initiator of anthocyanin biosynthesis (Koyama

*et al.* 2010, Gagné *et al.* 2011). In the same way, our findings support the relevant role of ABA on improved anthocyanin concentrations under LD conditions. In Graciano, this effect was less evident because both ED and LD were similarly effective to improve sugar and anthocyanin production suggesting that the response of ABA may vary depending upon the variety (Sandhu *et al.* 2011).

In fleshy fruits as berries, levels of IAA, the most abundant auxin, decline towards the onset of ripening (Deytieux-Belleau *et al.* 2007, Böttcher *et al.* 2010). Results of the present study corroborated this observation because, whatever the variety analyzed, the concentration of IAA in berries was highest at the pea-size stage, and then, it strongly decreased (Figures 5B, 5F). At this stage, the most evident changes were detected in the ED treatment of Graciano, in which IAA was reduced suggesting that diminished levels of IAA at the pea size stage may have contributed to decreased berry size in this variety (Table 2) (Niculcea *et al.* 2013). Berries from LD treatment showed significant rises of IAA at the end of veraison in both grapevine varieties (Figures 5B, 5F). Some studies describe a ripening-delaying effect of IAA that included a delay in the accumulation of sugars and anthocyanins (Böttcher *et al.* 2010), but it did not seem to be our case, since it is possible that high ABA concentrations at the end of veraison in LD berries might have counterbalanced the ripening- delaying effect of IAA. Moreover, a possible stimulation of ethylene production by IAA (Swarup *et al.* 2007, Muday *et al.* 2012) could have contributed in triggering ripening and anthocyanin biosynthesis in LD treatment (El-Kereamy *et al.* 2003, Chervin *et al.* 2008).



**Figure 5.** Concentrations of abscisic acid, ABA (A, E), indole-3-acetic acid, IAA (B, F), jasmonic acid, JA (C, G) and salicylic acid, SA (D, H) in berries from fruiting cuttings of Tempranillo and Graciano subjected to different irrigation treatments: full irrigation (Control), early deficit irrigation (ED) or late deficit irrigation (LD). At pea size and onset of veraison, control and LD had the same values because there was the same treatment. Values represent means (n=15). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between treatments according to the Tukey's test.

Jasmonic acid (JA) is present in a variety of plant organs, including fruits. Previous studies have shown that exogenous JA application can contribute to triggering ripening in climacteric

fruits by influencing ethylene production (Saniewski *et al.* 1986, Lorenzo *et al.* 2003). However, the role of JA in fruit development and/or ripening in non-climacteric fruits as grapes is poorly known. Our data showed that JA concentration reached a maximum in young berries after which, it decreased markedly in all irrigation treatments (Figures 5C, 5G). This general pattern was similar to reported previously (Kondo and Fukuda 2001, Niculcea *et al.* 2013). At pea size, JA concentration responded distinctly to deficit irrigation procedure in each variety assayed. Thus, in Tempranillo, ED treatment increased JA concentrations but in Graciano JA was decreased, suggesting a possible role of this hormone in berry size reduction (Peña-Cortés *et al.* 2005). At harvest, LD treatment increased berry content of JA in Graciano. Taking into account the ability of JA to promote biosynthesis of aroma volatile compounds (Kondo and Mattheis 2006), we suggest that increased level of endogenous JA in LD-treated Graciano berries at harvest might have contributed to enhance aromatic potential of this variety.

Although salicylic acid (SA) is considered as a delaying molecule of fruit ripening possibly due to inhibition of ABA effect (Asghari *et al.* 2010), some aspects of ripening can be stimulated by SA in grape berries (Kraeva *et al.* 1998, Wen *et al.* 2005). In our case, the main changes in SA concentrations due to water-deficit treatments become evident at the pea size stage (Figures 5D, 5H). Thus, in ED treatment SA levels increased in both grapevine varieties, especially in Graciano. Since some studies support a role of SA in modulation of the plant response to abiotic stresses such as drought, we suggest that increased levels of endogenous SA in ED-treated plants might protect berries against this situation (Klessig and Malamy 1994). By contrast, the LD procedure resulted in significant increases of SA at end of veraison that could be related to improvement of anthocyanin synthesis in Tempranillo (Mihai *et al.* 2010).

## **Conclusions**

This study revealed that differential sensitivity of Tempranillo and Graciano grapevines to seasonal water stress was mediated by alterations in hormonal status of berries at time of water stress imposition (i.e., pea size and veraison, respectively). The main effects of water deficits included reductions in berry size (proposed to be mediated by IAA and JA changes), increases of phenolic compounds as anthocyanins (proposed to be mediated by ABA and SA) and accumulation of amines (suggested to originate from decarboxylation of amino acids). To our knowledge, this is the first study that relates interspecific differences on the sensitivity of seasonal water-deficit irrigation with changes in the endogenous hormonal status of berries.

## **Acknowledgements**

The authors thank F. Aguirrezábal (Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA), Spain) for providing grapevine cuttings, J. López for his help and A. Urdiáin and M. Oyárzun for technical assistance during experiments. This project was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN BFU2011-26989) of Spain. M. Niculcea was the recipient of a grant from Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra.

## References

- Ancín-Azpilicueta C, González-Marco A, Jiménez-Moreno N (2008). Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 257-275.
- Antolín MC, Santesteban H, Ayari M, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M (2010). Grapevine fruiting cuttings: an experimental system to study grapevine physiology under water deficit conditions. In: *Methodologies and Results in Grapevine Research*. Eds. Delrot S, Medrano Gil H, Or E, Bavaresco L, Grando S (Springer Science+Business Media B.V.) pp. 151- 163.
- Antolín MC, Santesteban H, Santa María E, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M (2008). Involvement of abscisic acid and polyamines in berry ripening of *Vitis vinifera* (L.) subjected to water deficit irrigation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14: 123-133.
- Asghari M, Aghdam MS (2010). Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science & Technology* 21: 502-509.
- Basile B, Marsal J, Mata M, Vallverdú X, Bellvert J, Girona J (2011). Phenological sensitivity of Cabernet Sauvignon to water stress: vine physiology and berry composition. *American Journal of Enology and Viticulture* 62: 452-461.
- Basile B, Girona J, Behboudian MH, Mata M, Rosello J, Ferré M, Marsal J (2012). Responses of “Chardonnay” to deficit irrigation applied at different phenological stages: vine growth, must composition, and wine quality. *Irrigation Science* 30: 397-406.
- Böttcher C, Harvey K, Forde CG, Boss PK, Davies C (2010). Auxin treatment of pre-veraison grape (*Vitis vinifera* L.) berries both delays ripening and increases the synchronicity of sugar accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17: 1-8.
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (2006). Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry* 96: 43-47.

- Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G (2007a). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant Cell and Environment* 30: 1381-1399.
- Castellarin SD, Matthews MA, Di Gaspero G, Gambetta GA (2007b). Water deficits accelerate ripening and induce changes in gene expression regulating flavonoid biosynthesis in grape berries. *Planta* 227: 101-112.
- Chaves MM, Zarrouk O, Francisco R, Costa JM, T Santos, AP Regalado, ML Rodrigues CM Lopes (2010). Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany* 105: 661-676.
- Chervin C, Tira-umphon A, Terrier N, Zouine M, Severac D, Roustan JP (2008) Stimulation of the grape berry expansion by ethylene and effects on related gene transcripts, over the ripening phase. *Physiologia Plantarum* 134: 534–546.
- Coombe BG (1995). Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1: 104-110.
- Davies C, Böttcher C (2009). Hormonal control of grape berry ripening. In: Roubelakis-Angelakis KA (ed) *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*. New York: Springer pp. 229-261.
- Deloire A, Carbonneau A, Wang ZP, Ojeda H (2004). Vine and water a short review. *Journal of International Science de la Vigne et du Vin* 38: 1-13.
- Deluc LG, Quilici DR, Decendit A, Grimplet J, Wheatley D, Schlauch A, Mérillon JM, Cushman JC, Cramer GR (2009). Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavour and quality traits in grape berries of Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *BMC Genomics* 10: 212.
- Deytieux-Belleau C, Gagné S, L'Hyvernay A, Donèche B, Gény L (2007). Possible roles of both abscisic acid and indol-acetic acid in controlling grape berry ripening process. *Journal International of Sciences de la Vigne et du Vin* 41: 141-148.

- Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A (2005). Simultaneous determination of multiple phytohormones in plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8437-8442.
- El-Kereamy A, Chervin C, Roustan JP, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M, Raynal J, Ford C, Latché A, Pech JC, Bouzayen M (2003). Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum* 119: 175-182.
- Esteban MA, Villanueva MJ, Lissarrague JR (2001). Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 409-420.
- Gagné S, Cluzet S, Mérillon JM, Gény L (2011). ABA initiates anthocyanin production in grape cell cultures. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 1-10.
- Garde-Cerdán T, Lorenzo C, Martínez-Gil AM, Lara JF, Pardo F, Salinas R (2009). Evolution of nitrogen compounds during grape ripening from organic and non-organic Monastrell – Nitrogen consumption and volatile formation in alcoholic fermentation. *Research in Organic Farming* 8: 123-138.
- Gény L, Broquedis M, Martín-Tanguy J, Bouard J (1997). Free, conjugated, and wall-bound polyamines in various organs of fruiting cuttings of *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 48: 80-84.
- Girona J, Marsal J, Mata M, del Campo J, Basile B (2009). Phenological sensitivity of berry growth and composition of “Tempranillo” grapevines (*Vitis vinifera* L.) to water stress. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 268-277.
- González-Neves G, Charamelo D, Balado J, Barreiro L, Bochicchio R, Gatto G, Gil G, Tessore A, Carbonneau A, Moutounet M (2004). Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon



- and Merlot grapes and their potential correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta* 513, 191–196.
- Goutu S, Skinkis PA, Morre J, Maier CS, Deluc LC (2012). Berry nitrogen status altered by cover cropping: Effects on berry hormone dynamics, growth and amino acid composition of Pinot Noir. *Food Chemistry* 135: 1-8.
- Greven M, Green S, Neal S, Clothier B, Neal M, Dryden G, Davidson P (2005). Regulated deficit irrigation (RDI) to save water and improve Sauvignon Blanc quality? *Water Science & Technology* 51: 9-17.
- Grimplet J, Wheatley MD, Ben Jouira H, Deluc LG, Cramer GR, Cushman JC (2009). Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well watered and water-deficit stress conditions. *Proteomics* 9: 2503-2528.
- Hernández-Orte P, Cacho J, Ferreira V (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2891-2899.
- Holt, HE, Francis IL, Field J, Herderich, MJ, Iland PG (2008). Relationships between berry size, berry phenolic composition and wine quality scores for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) from different pruning treatments and different vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 14, 191–202.
- Intrigliolo DS, Castel JR (2010). Response of grapevine cv. Tempranillo to timing and amount of irrigation: water relations, vine growth, yield and berry and wine composition. *Irrigation Science* 28: 113-125.
- Intrigliolo DS, Pérez D, Risco D, Yeves A, Castel JR (2012). Yield components and grape composition responses to seasonal water deficits in Tempranillo grapevines. *Irrigation Science* 30: 339-349.

- Keller M, Smithyman RP, Mills LJ (2008). Interactive effects of deficit irrigation and crop load on Cabernet Sauvignon in an arid climate. *American Journal of Enology and Viticulture* 59: 221-234.
- Klessig DF, Malamy J (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1439-1458.
- Kliewer WM, Dokoozlian NK (2005). Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 170-181.
- Kondo S, Fukuda K (2001). Changes of jasmonates in grape berries and their possible roles in fruit development. *Scientia Horticulturae* 91: 275-288.
- Kondo S, Mattheis J (2006) Aroma volatile biosynthesis in apples at harvest or after harvest affected by jasmonates. *Acta Horticulturae* 712: 381–388.
- Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, Zamora F (2010) Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytical Chimie Acta* 660: 127–133.
- Koyama K, Sadamatsu K, Goto-Yamamoto N (2010). Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional & Integrative Genomics* 10: 367-381.
- Kraeva E, Andary C, A Carbonnea, A Deloire (1998). Salicylic acid treatment of grape berries retards ripening. *Vitis* 37: 143-144.
- Kriedemann PE, Goodwin I (2004). Regulated deficit irrigation and partial root drying. *Land Water Australia*.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178.

- McCarthy MG, Loveys BR, Dry PR, Stoll M (2002). Regulated deficit irrigation and partial rootzone drying as irrigation management techniques for grapevines. *Water Reports* 22, 79-87. Rome (FAO Publications).
- Mihai R, Mitoi M, Brezeanu A, Cogalniceanu, G (2010). Two-stage system, a possible strategy for the enhancement of anthocyanin biosynthesis in a long-term grape callus cultures. *Romanian Biotechnological Letters* 15: 5025-5033.
- Montoliú A, López-Climent MF, Arbona V, Pérez-Clemente RM, Gómez-Cadenas A (2009). A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in *citrus*. *Plant Growth Regulation* 59: 179-187.
- Muday GK, Rahman A, Binder BM (2012) Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends in Plant Science* 17: 181–195.
- Mullins MG (1966). Test-plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L. *Nature* 209: 419-420.
- Niculcea M, Martinez-Lapuente L, Guadalupe Z, Sánchez-Díaz M, Morales F, Ayestarán B, Antolín MC (2013). Effects of water deficit irrigation on hormonal content and nitrogen compounds in developing berries of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo. *Journal of Plant Growth Regulation* DOI: 10.1007/s00344-013-9322-z.
- Ollat N, Geny L, Soyer JP (1998). Les boutures fructifères de vigne: validation d'un modèle d'étude de la physiologie de la vigne. I. Principales caractéristiques de l'appareil végétatif. *Journal International de Science de la Vigne et du Vin* 32: 1-9.
- Ollé D, Guiraud JL, Souquet JM, Terrier N, Ageorges A, Cheynier V, Verries C (2011). Effect of pre- and post-veraison water deficit on proanthocyanidin and anthocyanin accumulation during Shiraz berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17: 90-100.
- Ortega-Farias S, Fereres E, Sadras VO (2012). Special issue on water management in grapevines. *Irrigation Science* 30: 335-337.

- Pellegrino A, Goze E, Lebon E, Wery J (2006). A model-based diagnosis tool to evaluate the water stress experienced by grapevine in field sites. *European Journal of Agronomy* 25: 49-59.
- Peña-Cortés H, Barrios P, Dorta F, Polanco V, Sánchez C, Sánchez E, Ramírez I (2005). Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* 23: 246-260.
- Ribéreau-Gayon J, Stonestreet E (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin de la Société de Chimie* 9: 2649–2652
- Roby G, Matthews MA (2004). Relative proportions of seed, skin and flesh, in ripe berries from Cabernet Sauvignon grapevines grown in a vineyard either well irrigated or under water deficit. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10: 74-82.
- Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86: 169-180.
- Romero EG, Muñoz GS, Ibáñez MDC (1993). Determination of organic acids in grape must, wines and vinegars by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 655: 111-117.
- Romero P, Fernández-Fernández JI, Martínez-Cutillas A (2010). Physiological thresholds for efficient regulated deficit-irrigation management in wine grapes grown under semiarid conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* 61: 300-312.
- Ruiz-Sánchez MC, Domingo R, Castel JR (2010). Review: deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: S5-S20.
- Saint-Cricq N, Vivas N, Glories Y (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d’Oenologie* 173: 22–25.
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F (2010). Effects of climate change scenarios on Tempranillo grapevine (*Vitis vinifera* L.) ripening: response to a

- combination of elevated CO<sub>2</sub> and temperature, and moderate drought. *Plant and Soil* 337: 179-191.
- Sandhu AK, Gray DJ, Lu J, Gu L (2011). Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol content of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins. *Food Chemistry* 126: 982-988.
- Saniewski M, Nowacki J, Lange E, Czapski J (1986). The effect of methyl jasmonate on ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid production in preclimacteric and postclimacteric "Jonathan" apples. *Fruit Science Reports* 13: 193-200.
- Santesteban LG, Miranda C, Royo JB (2011). Regulated deficit irrigation effects on growth, yield, grape quality and individual anthocyanin composition in *Vitis vinifera* L. cv. "Tempranillo". *Agricultural Water Management* 98: 1171-1179.
- Sipiora MJ, Gutiérrez MJ (1998). Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact on the composition, color and phenolic content of young "Cabernet Sauvignon" vines in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 152-162.
- Sivilotti P, Bonetto C, Paladin M, Peterlunger E (2005). Effect of soil moisture availability on Merlot: from leaf water potential to grape composition. *American Journal of Enology and Viticulture* 56: 9-18.
- Sofo A, Nuzzo V, Tataranni G, Manfra M, De Nisco M, Scopa A (2012). Berry morphology and composition in irrigated and non-irrigated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* 169: 1023-1031.
- Stines AP, Grubb J, Gockowiak H, Henschke PA, Høj PB, Heeswijck R van (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 150-158.

- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten C, Beemster GTS, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19: 2186-2196.
- Wample RL, Smithyman R (2002). Regulated deficit irrigation as a water management strategy in *Vitis vinifera* production. *Water Reports* 22, 89-101. Rome (FAO Publications).
- Wen PF, Chen JY, Kong WF, Pan QH, Wan SB, Huang WD (2005). Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. *Plant Science* 169: 928-934.
- Wheeler S, Loveys B, Ford C, Davies C (2009). The relationship between the expression of abscisic acid biosynthesis genes, accumulation of abscisic acid and the promotion of *Vitis vinifera* L. berry ripening by abscisic acid. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 195-204.

## ***7. DISCUSIÓN GENERAL***

---





La vid es un cultivo económicamente muy importante a nivel mundial pero gran parte de los viñedos están situados en regiones con sequía estacional, como sucede por ejemplo en zonas con clima mediterráneo, donde el suelo y el déficit de agua atmosférica, junto con las altas temperaturas, ejercen las grandes limitaciones en el rendimiento y la calidad de la cosecha. En el sur de Europa el número de días secos por año ha aumentado durante los últimos años (Luterbacher y col. 2007), y esta tendencia probablemente se acentuará en el futuro según predicen los modelos de cambio climático (IPCC 2007). Estas alteraciones junto con la necesidad de reducir la cantidad de agua destinada a los cultivos ([www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html](http://www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html)) previsiblemente modificarán el desarrollo de la vid lo que a su vez, tendrá un gran impacto sobre la viticultura (Jones y Davis 2000, Schultz 2000, Webb y col. 2007), dado que la producción y la calidad de la uva están enormemente condicionadas por la disponibilidad hídrica durante la estación de crecimiento (Myburgh 2003, Salazar-Parra y col. 2010). Además, es previsible que dicho impacto no sea uniforme en todas las variedades (Jones y col. 2005, Schultz 2007) por lo que los viticultores tendrán que depender cada vez más de una adecuada utilización del riego para estabilizar el rendimiento y mejorar la calidad del fruto y del vino (Downey y col. 2006).

En algunas zonas de España, al igual que en otras regiones vitivinícolas de clima semiárido, el agua es un recurso natural escaso y aunque la vid es una especie bastante tolerante al déficit hídrico, durante mucho tiempo se ha regado por debajo de sus necesidades. Así en España, su riego ha estado prohibido hasta 1996. Desde entonces, el manejo del riego durante la estación de crecimiento resulta fundamental para controlar el vigor de la planta y obtener el tamaño y la calidad de la uva deseadas (Cifré y col. 2005, Ruiz-Sánchez y col. 2010). Un exceso de riego puede afectar indirectamente a la calidad de la uva debido a la prolongación del crecimiento vegetativo, el cuál competiría con los racimos por los carbohidratos necesarios para la maduración de la uva. Dicho incremento en el crecimiento

vegetativo también puede dificultar la correcta exposición solar del racimo retrasando además la obtención de la concentración de azúcares adecuada. Por otra parte, un riego deficitario controlado durante toda la estación de crecimiento o durante algunos momentos fenológicos concretos puede ser una estrategia adecuada para mejorar la composición del fruto porque, por una parte, aumenta el vigor de la cepa y la exposición de los racimos a la radiación solar, y por otra, reduce el crecimiento de la baya concentrándose así, los compuestos fenólicos (McCarthy y col. 2000, Kriedemann y Goodwin 2004).

Como se ha descrito a lo largo de esta Memoria, un déficit hídrico moderado puede tener efectos muy diversos sobre la baya. Esta disparidad de resultados se debe, entre otros factores, a la gran diversidad de diseños experimentales planteados en los diferentes estudios, y también a variables tales como el momento, la severidad o la duración del déficit hídrico así como la variedad analizada. Dadas todas estas circunstancias, el estudio presentado se ha realizado en condiciones ambientales controladas con el objetivo de establecer una relación entre el balance hormonal de la baya, su composición y la calidad en condiciones de riego deficitario regulado e implantado en diversos momentos del desarrollo y maduración de la uva. El estudio se inició desarrollando un primer objetivo en el que se caracterizó la respuesta de la composición fenólica de dos variedades de uva tinta ampliamente cultivadas en España, Tempranillo y Graciano, a un déficit hídrico mantenido durante todo el desarrollo y la maduración de la uva. Los resultados obtenidos corroboraron la hipótesis inicial de que la aplicación del déficit hídrico alteraría tanto la evolución como la composición fenólica en las dos variedades. En ambos casos, la concentración de antocianinas y flavonoles aumentó durante la maduración mientras que los flavan-3-oles monoméricos (o catequinas) y los ácidos hidroxicinámicos se acumularon en la baya verde (estadio de tamaño guisante) para después descender hasta la maduración. Además, los análisis realizados en la cosecha mostraron que la composición individual de cada una de las familias de compuestos fenólicos resultó

profundamente modificada tanto por la variedad como por el nivel hídrico propuesto. En plantas sometidas a riego deficitario, Graciano obtuvo mayores concentraciones de antocianinas, flavonoles y catequinas pero menor concentración de ácidos hidroxicinámicos que Tempranillo, lo que sugiere que en condiciones limitantes de agua, la evolución de la composición fenólica de Graciano podría haber propiciado una mejor calidad del fruto.

Estos últimos años se ha publicado bastante información sobre el papel que desempeñan las hormonas vegetales en el control del crecimiento y la maduración de la uva (Davies y Böttcher 2009). Sin embargo, hasta el momento no se había establecido cómo evoluciona el balance hormonal de la uva en respuesta a un déficit hídrico moderado. Los compuestos nitrogenados de la uva, y en especial los aminoácidos, tienen un gran interés en el proceso de vinificación porque constituyen la fuente principal para el crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Un buen equilibrio entre los diferentes aminoácidos del mosto tiene como resultado una mayor síntesis de ésteres etílicos, aldehídos y aromas en el vino (Herbert y col. 2005, Lacroux y col. 2008). Sin embargo, durante el proceso de vinificación también se producen otros compuestos nitrogenados, como son las aminas, que a altas concentraciones pueden provocar reacciones adversas en algunas personas (Gardini y col. 2005). Por consiguiente, en el segundo objetivo de este trabajo analizamos la influencia de las hormonas vegetales sobre el crecimiento y maduración de la baya en condiciones de riego deficitario sostenido y caracterizamos la evolución de los compuestos fenólicos y en especial, de los compuestos nitrogenados en la variedad Tempranillo. Los resultados obtenidos muestran que la aplicación del déficit hídrico modificó tanto los niveles como la evolución del ácido abscísico (ABA), el ácido indol-3-acético (IAA), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) durante el desarrollo y maduración de la uva. Los principales efectos del déficit hídrico fueron: 1) una reducción del tamaño de la baya (posiblemente mediada por los cambios en IAA); 2) un descenso en la concentración de los diferentes compuestos fenólicos

(posiblemente mediado por los cambios en ABA y SA), y 3) una significativa acumulación de aminas procedentes de la descarboxilación de los aminoácidos que podrán afectar negativamente a la calidad del fruto.

A pesar de los conocidos efectos que tiene el déficit hídrico en la maduración de la uva no se puede ignorar que el momento en el que se impone la limitación hídrica puede producir efectos muy diferentes en el resultado final (Romero y col. 2010). En consecuencia, un mejor conocimiento de los efectos del momento de imposición del riego sobre la producción y la composición de la uva así como de sus causas puede ser clave para conseguir la cosecha y calidad deseadas (Ortega-Farias y col. 2012). En este sentido desarrollamos el tercer objetivo de este trabajo en el que tratamos de relacionar los cambios en el balance hormonal y la composición de la baya con las respuestas a déficits hídricos impuestos en diferentes momentos del desarrollo de la uva valorando así la sensibilidad fenológica de Tempranillo y Graciano a la escasez de agua en el suelo. Los datos obtenidos indican claramente que la diferente sensibilidad al momento fenológico en que se impuso el riego deficitario (pre-envero y post-envero) de cada variedad estuvo condicionada por los cambios producidos en el estado hormonal de la baya durante los tratamientos. En Tempranillo, un déficit hídrico temprano (pre-envero) incrementó la cantidad de polifenoles y aminoácidos, pero disminuyó la acumulación de antocianinas, mientras que en Graciano, se redujo el tamaño de la baya lo que contribuyó a la mayor concentración de antocianinas, aminoácidos y aminas. En Tempranillo, un déficit hídrico tardío (post-envero) mejoró el contenido de polifenoles, pero en Graciano, aumentaron las concentraciones de antocianinas, aminoácidos y aminas. La concentración de aminoácidos así como su composición varió significativamente en función de la variedad y el tratamiento de riego aplicado, siendo este efecto más positivo en Graciano.

En conjunto, los resultados de este trabajo muestran que tanto la imposición de un déficit hídrico prolongado como estacional influyeron sobre la composición fenólica de las bayas de forma diferente en cada variedad analizada. Así, un déficit hídrico prolongado podría mejorar la calidad fenólica de Graciano, mientras que la aplicación de un déficit hídrico estacional (temprano o tardío) podría contribuir a incrementar el contenido polifenólico general de Tempranillo y a mejorar los niveles de antocianinas y precursores de compuestos aromáticos en Graciano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cifré J, Bota J, Escalona JM, Medrano H, Flexas J, 2005. Physiological tools for irrigation scheduling in grapevine (*Vitis vinifera* L.). An open gate to improve water-use efficiency? *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 159-170.
- Davies C, Böttcher C, 2009. Hormonal control of grape berry ripening. En: *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology* (Ed. KA Roubelakis-Angelakis), Springer: Dordrecht Heidelberg Londres Nueva York, pp. 229-261.
- Downey MO, Dokoozlian NK, Krstic MP, 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 257-268.
- Gardini F, Zaccarelli A, Belletti N, Faustini F, Cavazza A, Maruscelli M, Mastrocola D, Suzzi G (2005). Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control* 16: 609-618.
- Herbert P, Cabrita MJ, Ratola N, Laureano O, Alves A, 2005. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, subregion, and vintage. *Journal of Food Engineering* 66: 315-322.
- IPCC, 2007. *Climate change 2007: the physical basis summary for policy makers*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Jones GV, Davis RE, 2000. Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *American Journal of Enology and Viticulture* 51: 249-261.
- Jones GV, White MA, Cooper OR, Storchmann C, 2005. Climate change and global wine quality. *Climatic Change* 73: 319-343.
- Kriedemann PE, Goodwin I, 2004. Regulated deficit irrigation and partial root drying. *Land Water Australia*.

- Lacroux L, Tregoat O, van Leeuwen C, Pons A, Tominaga T, Lavine-Cruege V, Dubourdieu D, 2008. Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv Sauvignon Blanc. *Journal International de Science de la Vigne et du Vin* 42: 125-132.
- Luterbacher J, Liniger MA, Menzel A, Estrella N, Della-Marta PM, Pfister C, Rutishauser T, Xoplaki E, 2007. The exceptional European warmth of autumn 2006 and winter 2007: Historical context, the underlying dynamics, and its phenological impacts. *Geophysical Research Letters* 34: 1-6.
- McCarthy MG, Loveys BR, Dry PR, Stoll M, 2000. Regulated deficit irrigation and partial rootzone drying as irrigation management techniques for grapevines. *Deficit irrigation practices*. FAO Water Reports No 22, Rome, Italy, pp. 79-87.
- Myburgh PA, 2003. Responses of *Vitis vinifera* L. cv. Sultanina to water deficits during various pre- and post-harvest phases under semi-arid conditions. *South African Journal for Enology and Viticulture* 24: 25-33.
- Ortega-Farias S, Fereres E, Sadras VO, 2012. Special issue on water management in grapevines. *Irrigation Science* 30: 335-337.
- Romero P, Fernández-Fernández JI, Martínez-Cutillas A, 2010. Physiological thresholds for efficient regulated deficit-irrigation management in wine grapes grown under semiarid conditions. *American Journal of Enology and Viticulture* 61: 300-312.
- Ruiz-Sánchez MC, Domingo R, Castel JR, 2010. Review: deficit irrigation in fruit trees and vines in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8: S5-S20.
- Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F, 2010. Effects of climate change scenarios on Tempranillo grapevine (*Vitis vinifera* L.) ripening: response to a combination of elevated CO<sub>2</sub> and temperature, and moderate drought. *Plant and Soil* 337: 179-191.

Schultz HR, 2000. Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6: 2-12.

Schultz HR, 2007. Climate change: implications and potential adaptation of vine growth and wine composition. En: *Proceedings Congress on Climate and Viticulture*. Centro de Transferencia Agroalimentaria, 87-92 (Zaragoza, España).

Webb LB, Whetton PH, Barlow EWR, 2007. Modeled impact of future climate change on the phenology of winegrapes in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 13: 165-175.



## ***8. CONCLUSIONES GENERALES***

---



1. La imposición de déficits hídricos de similar intensidad en distintos momentos fenológicos del ciclo ha puesto de manifiesto la diferente sensibilidad de Tempranillo y Graciano a los tratamientos.
2. La aplicación de un déficit hídrico prolongado (desde cuajado hasta madurez) redujo el tamaño de la baya y modificó tanto la composición fenólica de las variedades Tempranillo y Graciano. Esta última variedad obtuvo mayores concentraciones de antocianinas, flavonoles y catequinas pero menor concentración de ácidos hidroxicinámicos que Tempranillo, lo que apunta a que el déficit hídrico puede mejorar la calidad fenólica de Graciano.
3. El déficit hídrico prolongado produjo cambios en los niveles del ácido abscísico (ABA), el ácido indol-3-acético (IAA), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) así como en su evolución a lo largo del desarrollo y la maduración de Tempranillo.
4. En Tempranillo, el déficit hídrico prolongado provocó un descenso en la concentración de compuestos fenólicos (posiblemente mediado por los cambios en ABA y SA), y una acumulación de aminas que podría comprometer la calidad del fruto.
5. Las diferencias en la sensibilidad fenológica de cada variedad al déficit hídrico pre-envero y post-envero podrían, en parte, estar causadas por cambios en el estado hormonal de la baya durante los tratamientos.
6. Un déficit hídrico temprano (pre-envero) aumentó las concentraciones de polifenoles y aminoácidos y disminuyó la acumulación de antocianinas en Tempranillo. Sin embargo, en Graciano, este tratamiento incrementó las concentraciones de antocianinas, aminoácidos y aminas.

7. Un déficit hídrico tardío (post-envero) favoreció la acumulación de compuestos fenólicos en Tempranillo mientras que en Graciano, se produjo un incremento en las concentraciones de antocianinas, aminoácidos y aminos.
8. En general, los efectos del déficit hídrico fueron más acentuados en Graciano, donde se observó un descenso en la extractabilidad de las antocianinas, que conllevaría mayor facilidad en su extracción, junto con cambios en la composición de aminoácidos que podrían contribuir a mejorar las cualidades aromáticas de esta variedad.
9. Los resultados muestran que existe una gran influencia del régimen de riego sobre la composición y la calidad de la uva. Por ello, según las características requeridas, sería recomendable seleccionar el tipo de tratamiento hídrico en función de las propiedades cualitativas a fomentar en cada variedad.