



35º REUNIÓN

GRUPO DE TRABAJO
**EXPERIMENTACIÓN EN
VITICULTURA Y ENOLOGÍA**

.....

ESTACIÓN DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA - EVENA
Gobierno de Navarra. Olite

10 y 11 de mayo de 2023



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN



35º REUNIÓN

GRUPO DE TRABAJO
**EXPERIMENTACIÓN EN
VITICULTURA Y ENOLOGÍA**

.....

ESTACIÓN DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA - EVENA
Gobierno de Navarra. Olite

10 y 11 de mayo de 2023



Gobierno de Navarra
Nafarroako Gobernua



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN

2023



Aviso Legal: los contenidos de esta publicación podrán ser reutilizados, citando la fuente y la fecha, en su caso, de la última actualización.

Título:

35º Reunión Grupo de Trabajo. Experimentación en Viticultura y Enología.

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
Secretaría General Técnica.
Centro de Publicaciones.

Unidad proponente:

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
Dirección General de la Industria Alimentaria.
Subdirección General de de la Calidad Alimentaria y Laboratorios Agroalimentarios.

Diseño y maquetación:

Centro de Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Impresión y encuadernación:

NIPO papel: 003-23-090-4

NIPO línea: 003-23-091-X

D.L.: M-34583-2023

Distribución y venta:

Paseo de la Infanta Isabel,1
28014 Madrid
Teléfono: 91 347 55 41

Tienda virtual:

www.mapa.gob.es
<https://servicio.mapama.gob.es/tienda/>

e-mail:

centropublicaciones@mapa.es

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:

<https://cpage.mpr.gob.es/>

En esta publicación se ha utilizado papel libre de cloro de acuerdo con los criterios medioambientales de la contratación pública.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
PROGRAMA	6
RELACIÓN DE ASISTENTES	10
DESARROLLO DE LA REUNIÓN	20
CONCLUSIONES	21
TRABAJOS PRESENTADOS.....	25
VITICULTURA	27
ENOLOGIA	229
TRANSVERSALES	339

INTRODUCCIÓN

Durante los días 10 y 11 de mayo de 2023 ha tenido lugar la Reunión, que, con carácter itinerante y periodicidad anual, realiza el Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología.

Estas reuniones, coordinadas por la Subdirección General de Calidad Diferenciada y Agricultura Ecológica del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, se vienen desarrollando sin interrupción desde 1988, salvo los años 2020, 2021 y 2022 debido a las restricciones por el COVID, siendo la celebrada en esta ocasión su 35ª edición.

El Grupo está integrado por especialistas en viticultura y enología de las Comunidades Autónomas y del Estado, incorporándose a lo largo del tiempo significativas personalidades de la investigación y la docencia con inquietudes convergentes con el Grupo.

Atendiendo la invitación efectuada en la anterior Reunión del Grupo, celebrada en Zaragoza y organizada por CTA del Gobierno de Aragón en abril de 2019, la 35ª edición se ha realizado en la Estación de Viticultura y Enología de Navarra del Gobierno de Navarra, encargándose de la organización el personal de la Sección de Viticultura y Enología-EVENA. Resaltar la excelente organización de la Reunión, así como la hospitalidad manifestada por todos los organizadores hacia los componentes del Grupo.

Durante las sesiones de trabajo se presentaron y debatieron trabajos relacionados con las materias previstas en la anterior reunión y otros en turno libre, siempre relacionados con la actualidad y problemática de la vitivinicultura española, así mismo se realizó una excelente visita técnica que han permitido conocer parte de la realidad de vitivinicultura navarra.



PROGRAMA

Martes 9 de mayo de 2023

20:00 - 21:00. - Recepción asistentes en Enozentrum.

Miércoles 10 de mayo de 2023

8:30 – 8:45 - Recogida de participantes en Olite y traslado a EVENA. Entrega de documentación

8:45 – 9:00 - Inauguración de las jornadas a cargo del Director General de Desarrollo Rural de Gobierno de Navarra D. Fernando Santafé.

9:00 - 11:00 - Bloque I: Sesiones técnicas

- El Registro de Variedades de Vid. *Ramón Martínez García, (IMIDA)*
- Reducción de la relación hojas-racimos antes del envero: efectos vegetativos, productivos y cualitativos, en cv. Verdejo. *Jesús Yuste Bombín (ITACYL)*
- Aptitud enológica y rendimiento de variedades de vid recuperadas y adaptadas a zonas de alta montaña. *Joaquín Montenegro Rodríguez (Estación Experimental de Aula Dei)*
- La variedad Listán Prieto en la Comunidad de Madrid: entre el pasado y el futuro. *Gregorio Muñoz Organero (IMIDRA)*
- Oneca, una variedad antigua recuperada e inscrita en Navarra. *Alfredo Rueda Díez (EVENA)*
- Comportamiento agronómico y enológico de la variedad minoritaria Bruñal en dos portainjertos en la D.O. Arribes. *José Antonio Rubio Cano (ITACYL)*
- Nuevas variedades de vid en la Región de Murcia, 2000 - 2023. Historia de una selección, fases y criterios empleados. *José Ignacio Fernández Fernández (IMIDA)*
- Parámetros físico-químicos de vinos obtenidos de variedades resistentes a enfermedades en La Rioja. *Sara I. Blanco González, (Universidad de La Rioja)*
- Secuenciación metagenómica para evaluar el impacto de 20 años de aplicación continuada de residuos orgánicos compostados en el funcionamiento del suelo. *Lur Epelde (NEIKER)*
- Efecto de distintas formas de manejo de la línea sobre el estado nutricional de la vid (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo). *Ignacio Martín Rueda (ICVV)*



- Implicaciones del uso de herbicidas, laboreo o cubiertas vegetales bajo las cepas sobre la microbiota del suelo. *Maidier Velaz Barbarin (UPNA)*
- ¿Podemos utilizar gemelos digitales para aprender/enseñar a podar? *Mónica Galar Martínez (UPNA)*

11:00 - 11:30. - Pausa café. Visita Banco Germoplasma de EVENA.

11:30 - 14:00. - Bloque II: Sesiones Técnicas

- Evaluación de estrategias combinadas de fungicidas químicos y agua ozonizada en el control de mildiu: efecto sobre el micro bioma de la hoja y la baya. *David Gramaje (ICVV)*
- Polilla del racimo: 14 años de seguimiento de la plaga. *Carmen Goñi Górriz (INTIA)*
- Efecto del calentamiento global sobre la transpiración y maduración del racimo de uva (*Vitis vinifera* L.). *Andrea Cabodevilla Afra (Universidad de Navarra-BIOMA)*
- Acciones protectoras vitícolas frente al incremento de temperatura asociado al cambio climático. Técnicas de sombreado de racimos. *Sergio Ibáñez Pascual (ICVV)*
- Influencia de las cubiertas vegetales en producción y calidad de la uva en diferentes sistemas productivos del centro de la Península Ibérica. *Andrés García Díaz (IMIDRA)*
- Influencia de una cubierta vegetal espontánea sobre la concentración de nutrientes en peciolo (var. Graciano). *Roberto Pérez Parmo (NEIKER)*
- Efecto combinado del riego y la aplicación de pizarra como acolchado inorgánico en la variedad Mencía. *Mar Vilanova de la Torre (ICVV)*
- Evaluación de suelos de viñedo en la DOP Ribeiro bajo distintos tipos de manejo. *Pilar Blanco Camba (EVEGA)*
- Gestión del riego en parcelas demostrativas de viña en la Vall del Corb (DO Costers del Segre). *Elisabet Perna Armengol (INCAVI)*
- Efecto del momento de aplicación de deshojados en Garnacha en dos campañas climáticamente diferentes. *Nazareth Torres (UPNA)*
- Impacto de la aplicación ácido monosilícico a la vid en la composición química de vinos tintos jóvenes de Mencía. *Manuel Losada (UPM)*

14:00 - 14:15 - Coloquio.

14:15 - 15:45 - Comida.



16:00 - 18:00 - Bloque III: Sesiones Técnicas

- La aplicación foliar de jasmonato de metilo mejora la composición aromática, fenólica y nitrogenada de la variedad Tempranillo Blanco en la D.O.Ca. Rioja. *Teresa Garde Cerdán (ICVV)*
- Caracterización de los vinos de Maceración Carbónica. *Ana Rosa Gutiérrez Viguera (ICVV)*
- Influencia del tiempo de criomaceración sobre la composición y calidad sensorial de los vinos de Tempranillo Blanco. *Juana Martínez García (ICVV)*
- Aplicación de la levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* XG3 para la elaboración de vino Treixadura en bodegas de la D.O. Ribeiro. *Pilar Blanco Camba (EVEGA)*
- Fermentación aeróbica para reducir el grado alcohólico. *Pilar Morales Calvo (ICVV)*
- Selección de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vinos tintos. *Rocío Escribano Viana (ICVV)*
- *Lachancea thermotolerans*: herramienta biotecnológica para acidificar y su efecto en el desarrollo de la fermentación maloláctica. *Gemma Roca (INCAVI-IRTA)*
- Interacción entre genotipos de vid y productos de control biológico basados en especies de *Trichoderma*. *Ester Abarquero Diezhandino (EVEGA)*

18:00 - 20:30 - Traslado y visita a la finca Experimental Baretón y a la Bodega Pagos de Araiz

20:30 - 21:00 - Traslado de vuelta a Olite.

Jueves 11 de mayo de 2023

8:30 - Recogida de participantes en Olite y traslado a EVENA

9:00 - 11:00 - Bloque IV: Sesiones Técnicas

- Modificación del nivel de la relación pámpanos-racimos antes del envero: efectos vegetativos, productivos y cualitativos, en cv. Verdejo. *Jesús Yuste Bombín (ITACYL)*
- Estudio sobre los efectos del cambio climático en la calidad y la composición fenólica de diferentes variedades de vid. *Inmaculada Pascual Elizalde (Universidad de Navarra-BIOMA)*
- Control de virus de vid para certificación sanitaria. *Carlos Padilla Martínez (IMIDA)*



- Enfermedades víricas en la viticultura: prevalencia de virus de testaje obligatorio y otros virus en viñedos. *Sara Crespo Martínez (UPNA)*
- Evaluación de las características de la madera del portainjerto 110 Richter. *Ana Villa Llop (VITIS NAVARRA)*
- Identificación del origen molecular de variantes clonales mejoradas de Tempranillo mediante un estudio de genómica comparativa. *Pablo Carbonell Bejerano (ICVV)*
- El análisis de la variación genómica intra-varietal de Tempranillo Tinto identifica sus principales rutas de diseminación en la Península Ibérica. *Javier Tello Moro (ICVV)*
- Garnacha en blanco. Clones navarros para certificar. *José Félix Cibriáin Sabalza (EVENA)*
- Situación actual de la selección clonal del cv. Garnacha blanca en el Valle del Ebro: situación actual en La Rioja. *Elisa Baroja Hernández (ICVV)*
- Selección clonal en vid de las variedades Tempranillo y Graciano en el marco del proyecto europeo VITISAD. *Luis Rivacoba (ICVV)*
- Análisis de ADN antiguo de vid y su aplicación en el estudio de restos arqueológicos y herbarios. *Carolina Royo Brun (ICVV)*
- Recursos genéticos para la adaptación de la viticultura a la crisis climática. *José Miguel Martínez Zapater (ICVV)*

11:00 - 11:30 - Pausa café

11:30 - 13:15 - Sesión Magistral y Conclusiones

- Situación actual de la OIV. Nuevas resoluciones. *Manuel Roldán, (MAPA)*
- Itinerario de la viticultura española en los últimos 50 años. *Enrique García Escudero.*
- Reflexiones sobre la evolución de la enología en España en los últimos 50 años. Una mirada a través del GTEVE. *Ernesto Franco Aladrén*

13:15 - 14:15 - Cata vinos experimentales.

14:15 – 15:30 - Presentación de vinos D.O. Navarra y degustación de productos Reyno Gourmet.



RELACIÓN DE ASISTENTES

ABAD ZAMORA, FRANCISCO JAVIER
INTIA
Av. Serapio Huici, 22, 31610 Villava, Navarra 948 01 30 40
jabad@intiasa.es

ABARQUERO DIEZHANDINO, ESTER
Estación de Viticultura y Enología de Galicia - EVEGA
Ponte San Clodio, s/n. 32428 Leiro (Orense) 988 48 80 33
ester.abarquero.diezhandino@xunta.gal

ARTEAGAGOITIA RUIZ, URTZI
Estación de Fruticultura de Zalla.
Diputación Foral Bizkaia
Avda. Lehendakari Aguirre, nº44. 48860 Zalla - Bizkaia. Telf. 94.639.03.27
urtzi.artegoitia@bizkaia.eus

BAROJA HERNÁNDEZ, ELISA
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)
Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80.
ebaroja@larioja.org

BLANCO CAMBA, PILAR
Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-AGACAL)
Ponte San Clodio. 32428. Leiro (Orense) 988 48 80 33
pilar.blanco.camba@xunta.gal

BLANCO GONZÁLEZ, SARA I.
Dpto. de Agricultura y Alimentación. Universidad de la Rioja
C/Madre de Dios 51, 26006 Logroño (La Rioja)
sablanc@unirioja.es

CABODEVILLA AFRA, ANDREA
Universidad de Navarra-BIOMA. Grupo de Fisiología del Estrés en Plantas (Unidad Asociada al
CSIC, EEAD, Zaragoza)
Calle Irunlarrea 1, 31080, Pamplona, España. +34948425600 Ext:806227
acabodevill@alumni.unav.es



CARBONELL BEJERANO, PABLO

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-Gobierno de La Rioja-UR)

Finca La Grajera, Carretera de Burgos km 6, 26007 Logroño, España

941 89 49 80

pablo.carbonell@icvv.es

CIBRIÁIN SABALZA, JOSÉ FÉLIX

Sección de Viticultura. DRyMA - Gobierno de Navarra

Valle de Orba, 34, Olite 31390. 848 43 36 01

jcibrias@navarra.es

CRESPO MARTÍNEZ SARA

Dpto. Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra, Campus

Arrosadia, 31006 Pamplona, Navarra, España. 948 16 912

sara.crespo@unavarra.es

DIZY SOTO, MARTA

Dpto. de Agricultura y Alimentación. Universidad de la Rioja. ICVV

C/Madre de Dios 51, 26006 Logroño (La Rioja). +34 941 299 748

marta.dizy@unirioja.es

EPELDE SIERRA, LUR

NEIKER-Basque Institute for Agricultural Research and Development. Basque Research and Technology Alliance (BRTA).

Parque Tecnológico de Bizkaia, Parcela 812. Berreaga 1. 48160 Derio (Bizkaia) 627976041

lepelde@neiker.eus

ESCRIBANO VIANA, ROCIO

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) (Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja, CSIC)

Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80.

rocio.escribano@unirioja.es

FERNÁNDEZ FERNANDEZ, JOSE IGNACIO

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario, (IMIDA). Estación enológica de Jumilla.

Avenida de la Asunción nº 24, 30520 Jumilla (Murcia) 968757580

josei.fernandez@carm.es



FRAILE CAVA, LAURA
Estación experimental de Aula dei – CSIC (Zaragoza)
Av. Montañana, 1005. 50059 Zaragoza.
lfraile@eead.csic.es

FRANCO ALADRÉN, ERNESTO
Centro de Transferencia Agroalimentaria
Av. Movera s/n Zaragoza, 50194 976 586500
efranco@aragon.es

GALAR MARTÍNEZ, MÓNICA
Dpto de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra (UPNA),
Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, Navarra
monica.galar@unavarra.es

GARCÍA DÍAZ, ANDRÉS
Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario – IMIDRA
Finca El Encín, Ctra. A-2, Km 38,200, 28800 Alcalá de Henares (Spain). Tel. 918879483
andres.garcia.diaz@madrid.org

GARDE CERDÁN, TERESA
Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Gobierno de La Rioja,
Universidad de La Rioja), Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja).
941 89 49 80.
teresa.garde@icvv.es

GARIJO JIMÉNEZ, PATRICIA
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)
Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80.
pgarijo@larioja.org

GOGORCENA AOIZ, YOLANDA
Grupo de Genómica de Frutales y Vid, Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC), Avda
de Montañana 1005, 50059 Zaragoza
aoiz@eead.csic.es

GONZALEZ GARCÍA, RAMÓN
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)
Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80.
rgonzalez@icvv.es



GOÑI CASTAÑARES, IBAI
DRyMA
Gonzalez Tablas nº9 31005 Pamplona
ibai.goni.castanares@navarra.es

GOÑI GORRIZ, CARMEN
INTIA
Avd. Serapio Huici nº 22 31610 Villava (Navarra). 650 67 58 81
cgoni@intiasa.es

GRAMAJE PÉREZ, DAVID
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)
Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80.
david.gramaje@icvv.es

GUTIERREZ VIGUERA, ANA ROSA
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja, CSIC). Finca La Grajera, Ctra. LO-20- salida 13, 26071, Logroño, España. +34 941 894 980
ana-rosa.gutierrez@unirioja.es

IBAÑEZ MARCOS, JAVIER
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)
Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80.
javier.ibanez@icvv.es

IBAÑEZ PASCUAL, SERGIO
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja).
Finca La Grajera. Carretera Burgos, km 6. 26071 Logroño (La Rioja). Apartado Postal Nº 1.042 -
26080 Logroño.
Tfno. 941 05 30 89
sibanezp@larioja.org

JIMENO MENDOZA, KARMELE
Sección Enología, DRyMA - Gobierno de Navarra
C./ Valle de Orba, 34. 31390. Olite (Navarra) 848 43 36 01
mc.jimeno.mendoza@navarra.es

LOIDI ERVITI, MAITE
Universidad Pública de Navarra (UPNA)
Campus Arrosadía, 31006 Pamplona, Navarra
maite.loidi@unavarra.es



LOSADA ARIAS, MANUEL MAXIMINO

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid
manuelmaximino.losada@upm.es

LOUREIRO RODRIGUEZ, MARIA DOLORES

Estación de Viticultura y Enología de Galicia - EVEGA
Ponte San Clodio, s/n. 32428 Leiro (Orense) 988 48 80 33
maria.dolores.loureiro.rodriguez@xunta.gal

MARÍN EDERRA, DIANA

Sección de Producción y Sanidad Vegetal. DRyMA. Gobierno de Navarra
C/Gonzalez Tablas nº9, 1ª planta. 31005 Pamplona (Navarra). 848 426693
diana.marin.ederra@navarra.es

MARTÍN RUEDA, IGNACIO

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, ICVV (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja). Servicio de Investigación Vitivinícola. Finca La Grajera, Ctra. Burgos km 6. 26071 Logroño (La Rioja; España). +34 941 053 087
ignacio.martin@icvv.es

MARTÍNEZ, JOHANN

Universidad de Navarra
Irunlarrea 1,E 31008, Pamplona, Navarra
Universidad de Navarra
johannml@gmail.com

MARTÍNEZ APPIOLAZA, LILIANA

Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza (Argentina)
Dpto. de Agricultura y Alimentación. Universidad de la Rioja.
C/Madre de Dios 51, 26006 Logroño (La Rioja).
lmartinez@fca.uncu.edu.ar

MARTINEZ GARCIA, JUANA

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja. CSIC. Universidad de La Rioja). Servicio de Investigación Agraria y Sanidad Vegetal. Finca La Grajera Ctra Burgos Km. 6. 26071 Logroño (La Rioja).
jmartinezg@larioja.org



MARTÍNEZ GARCÍA, RAMÓN

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA)
C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia). Teléfono: 968 101149
ramon.martinez8@carm.es

MARTÍNEZ ZAPATER, JOSÉ MIGUEL

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)
Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80
zapater@icvv.es

MENÉNDEZ MENÉNDEZ, CRISTINA

Universidad de la Rioja
C/Madre de Dios 51, 26006 Logroño (La Rioja)
cristina.menendez@unirioja.es

MONTENEGRO RODRÍGUEZ, JOAQUÍN

Estación Experimental de Aula Dei (EEAD),
Avda de Montañana 1005, 50059 Zaragoza
jmontenegro@eead.csic.es

MORALES CALVO, PILAR

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Gobierno de la Rioja, Universidad de La Rioja),
Finca La Grajera, Carretera de Burgos km 6, 26007 Logroño, La Rioja, España. 941894984
pilar.morales@icvv.es

MORALES IRIBAS, FERMÍN

Instituto de Agrobiotecnología – CSIC
Av. de Pamplona, 123, 31192 Mutilva Baja, Navarra
fermin.morales@csic.es

MOTILVA CASADO, MARIA JOSE

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)
Finca La Grajera. Ctra. Burgos, Km: 6; 26071 Logroño (La Rioja). 941 89 49 80
motilva@icvv.es

MUÑOZ ORGANERO, GREGORIO

Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA),
Finca El Encín, Ctra. A-2, Km 38,200, 28800 Alcalá de Henares (Spain). Tel. 918879483
gregorio.munoz@madrid.org



ORIA OSTIZ, IZASKUN

Sección de Viticultura y Enología. DRyMA - Gobierno de Navarra
Calle Valle de Orba, nº34. 31390 Olite (Navarra)
izaskun.oria.ostiz@navarra.es

PADILLA MARTÍNEZ, CARLOS

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA).
C/Mayor s/n, 3150 La Alberca (Murcia). Tlf: 968368583
carlosv.padilla@carm.es

PASCUAL ELIZALDE, INMACULADA

Universidad de Navarra-Instituto BIOMA, Grupo de Fisiología del Estrés en las Plantas (Unidad Asociada al CSIC; EEAD, Zaragoza), Irunlarrea 1,E 31008, Pamplona, Navarra
Universidad de Navarra
ipascual@unav.es

PAVON FREIRE, ALBERTO

Centro de Transferencia Agroalimentaria (Gobierno de Aragón).
Avda Movera 580, 50194 Movera (Zaragoza). 976586500 / 656595146
apavon@aragon.es

PÉREZ PARMO, ROBERTO

NEIKER Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario.
Calle Berreaga, 1; 48160 Derio (Bizkaia)
rperezparmo@neiker.eus

PÉREZ SOTES, JOSÉ LUIS

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja),
Finca La Grajera, Carretera de Burgos km 6, 26071 Logroño, La Rioja, España. 941894984
joseluis.perez@icvv.es

PERNA ARMENGOL, ELISABET

Institut Català de la vinya i el vi. (INCAVI)
Polígon Industrial Domenys II, Plaça l'Àgora, 2-3, 08720 Vilafranca del Penedès, Barcelona
eperna@gencat.cat

RIVACOBA, LUIS

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja).
Finca La Grajera. Carretera Burgos, km 6. 26071 Logroño (La Rioja). (Apartado Postal
Nº 1.042 - 26080 Logroño). Tfno. 941 05 30 94
Irivacoba@larioja.org



ROCA DOMENECH, GEMMA

Institut Català de la vinya i el vi. (INCAVI)

Polígon Industrial Domenys II, Plaça l'Àgora, 2-3, 08720 Vilafranca del Penedès, Barcelona

grocad@gencat.cat

RODRÍGUEZ LORENZO, MAITE

C/Artajona 5, 2ºD. 31300 Tafalla

m.rodriquezlf@gmail.com

ROLDAN CONTRERAS, MANUEL

MAPAMA

Pº Infanta Isabel Madrid 28071

mroldanc@mapama.es

ROYO BRUN, CAROLINA

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino

Finca La Grajera, Ctra. de Burgos km. 6 (LO-20- Salida 13), Logroño.

941894980

carolina.royo@icvv.es

RUBIO CANO, JOSÉ ANTONIO

Unidad de Cultivos Leñosos. Inst. Tecnológico Agrario. de Castilla y León.

Ctra. Burgos km 119. 47071 Valladolid. Tfno. 983 317452

rubcanjo@itacyl.es

RUEDA DIEZ, ALFREDO

Sección de Enología. DRyMA – Gobierno de Navarra

C./ Valle de Orba, 34. 31390. Olite (Navarra) 848 433601

alfredo.rueda.diez@navarra.es

SAGÜÉS SARASA, ANA

Sección Viticultura y Enología, DRyMA - Gobierno de Navarra

C./ Valle de Orba, 34. 31390. Olite (Navarra) 848 433601

ana.sagues.sarasa@navarra.es

SAN MIGUEL IBAÑEZ, ELENA

Laboratorio Agroalimentario de Navarra – Laboratorio Enológico

Av. Serapio Huici, s/n, 31610 Villava, Navarra 848 427996

me.sanmiguel.ibanez@navarra.es



SANTAMARIA AQUILUÉ, PILAR

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)

Finca La Grajera, Ctra. de Burgos km. 6 (LO-20- Salida 13), Logroño.

941894980

pilar.santamaria@icvv.es

SANTESTEBAN GARCÍA, GONZAGA

Universidad Pública de Navarra (UPNA)

Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, Navarra.

gonzaga.santesteban@unavarra.es

SOTES RUIZ, VICENTE

Universidad Politécnica de Madrid – Dpto. Producción Agraria

Avda. Puerta Hierro, nº 2-4. 28040 Madrid

vicente.sotes@upm.es

TELLO MORO, JAVIER

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV)

Finca La Grajera, Ctra. de Burgos Km. 6, 26007 Logroño * 941 05 30 98

javier.tello@icvv.es

TORRES MOLINA, NAZARETH

Universidad Pública de Navarra (UPNA)

Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, Navarra.

nazareth.torres@unavarra.es

USÓN BALLESTAR, JESÚS JUAN

Centro de Transferencia Agroalimentaria (Gobierno de Aragón)

Avda Movera 580 MOVERA (ZARAGOZA) 50194 976586500 654225468 jjuson@aragon.es

VELAZ BARBARIN, MAIDER

Dpto. de Agronomía, Biotecnología y Bromatología, Universidad Pública de Navarra,

Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, Navarra, España

maider.velaz@unavarra.es

VILANOVA DE LA TORRE, MAR

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CSIC-Universidad de La Rioja-Gobierno de La Rioja, Logroño

mar.vilanova@csic.es



VILLA LLOP, ANA

Dpto. de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra (UPNA)

Campus Arrosadía, 31006 Pamplona, Navarra.

Vivero Vitis Navarra, Larraga, Navarra,

ana.villa@unavarra.es

YUSTE BOMBÍN, JESÚS

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León

Ctra. Burgos km.119, 47071 Valladolid. 983 317460.

yusbomje@itacyl.es



DESARROLLO DE LA REUNIÓN

La Reunión se ha desarrollado en todos los aspectos de forma ágil y organizada. La documentación e información facilitada en el transcurso de la reunión se compartió mediante un enlace a una carpeta compartida en Google Drive.

La inauguración de las jornadas corrió a cargo de D. Fernando Santafé Aranda, Director General de Desarrollo Rural de Gobierno de Navarra quien manifestó su gratitud por la elección de Navarra como sede de la 35ª reunión del GTEVE. En sus palabras de bienvenida valoró el Grupo de Trabajo y la puesta en común de la experimentación e investigación que se lleva a cabo en los diferentes Centros.

A la reunión han asistido 80 técnicos e investigadores de 25 Centros tecnológicos y empresas. Se han presentado un total de 48 comunicaciones orales, 33 de viticultura, 12 de enología, 3 transversales, y se dictaron 3 conferencias magistrales en el cierre de la Reunión.



CONCLUSIONES

El Grupo agradece a EVENA la cálida acogida, así como su hospitalidad y atención recibida durante la 35ª Reunión, en particular a los técnicos, personal y responsable que han hecho posible que la reunión se desarrolle de forma magistral y con gran eficiencia.

Como en las últimas reuniones, ha sido de gran interés la actualización de los trabajos conjuntos entre los Centros de Aragón, Cataluña, Navarra y Rioja relativos a los diferentes estadios en la que se encuentra la selección clonal de la variedad Garnacha Blanca, poniendo al día la situación del proyecto en cada comunidad autónoma.

Como se puso de manifiesto en anteriores reuniones, el grupo sigue teniendo gran interés por el material vegetal y la diversidad genética de variedades y clones. Se han presentado ocho comunicaciones que abordan aspectos vitícolas y enológicos relacionados con clones varietales de Tempranillo, variedades minoritarias como Oneca, Bruñal y Listan negro y los cruces de Monastrel con C. Sauvignon, Syrah, Tempranillo, Barbera y Verdejo.

En diez comunicaciones se han estudiado técnicas de manejo del viñedo como el riego, operaciones en verde en el viñedo, y la influencia de las cubiertas vegetales.

En cuatro comunicaciones se han abordado aspectos relativos a la crisis climática y la vitivinicultura. Como está impacta sobre la composición fenólica de la producción, y acciones de control de la canopia en situación de aumento de temperatura del racimo, fueron temas abordados.

En cinco comunicaciones se han trataron aspectos relativos a las enfermedades del viñedo, incluida las relativas a la madera. En este aspecto, hacer referencia a la Guía de enfermedades de madera de vid, que se ha incorporado en la última publicación, y que recopila los trabajos que se desarrollan por parte de los miembros del GTEVE y que coordinó David Gramaje.

Cuatro comunicaciones microbiológicas abordan aspectos relacionados con levaduras saccharomyces y no saccharomyces, así como la reducción de alcohol mediante fermentación aeróbica y acidificación biológica.

En cinco comunicaciones se han abordado aspectos de calidad enológica y sensorial de diferentes manejos de la vinificación o de la aplicación de elicitores.

Tres comunicaciones muy concretas versaron sobre aspectos importantes como, el análisis de ADN antiguo de vid, la caracterización de madera de portainjertos, y la metodología para el registro de variedades de vid.

De especial interés ha sido la visita, en la mañana de la primera jornada, al conservatorio de variedades de vid que Evena tiene en sus instalaciones, en la que los anfitriones explicaron la organización del conservatorio de cepas, y los trabajos para su conservación, manejo y ampliación. En la actualidad cuenta con 284 entradas de plantas, que corresponden con 66 variedades de las cuales 10 son desconocidas.



En la tarde de la primera jornada, se visitó el viñedo experimental de Baretón gestionado por la Sección de Viticultura y Enología de EVENA, donde pudimos conocer los distintos ensayos de material vegetal, cubiertas, abonado orgánico, etc. Se esbozaron aspectos de los proyectos que tienen en marcha desde la Sección, y se aportó información sobre la gestión de la parcela como modelo de transformación de secano a regadío del canal de Navarra, y modelo de gestión integrada de plagas. Posteriormente se realizó la visita a la bodega Pagos de Araiz de la familia Masaveu. Una finca de 150 hectáreas de viñedos de distintas variedades de uvas (tempranillo, graciano, garnacha, merlot, cabernet sauvignon y syrah), en donde amablemente fuimos invitados a probar los vinos correspondientes al Pago.

En la jornada del jueves, a primera hora continuaron las comunicaciones programadas que precedieron a las conferencias magistrales. En este punto, se incorporaron al grupo los Eméritos del vino, antiguos participantes del GTEVE, que coordina nuestra compañera Monserrat Iñiguez, y que en esta ocasión han querido acompañarnos en la jornada final.

Tres fueron las intervenciones magistrales que tuvieron lugar. La primera a cargo de Manuel Roldán, del MAPA, sobre la situación actual de la OIV y nuevas resoluciones que se aprobarán en el próximo Congreso en Jerez. Remarco la importancia que para la viticultura tienen dichas resoluciones, dado que posteriormente se trasponen a la normativa de UE. Otro aspecto importante fue la invitación que realizó a los técnicos e investigadores que participan en el GTEVE, para que se incorporen a la Comisión Española de OIV, destacando la importancia de esta comisión en las resoluciones que se aprueban.

La segunda intervención corrió a cargo de nuestro compañero Enrique García-Escudero, quien abordó una exposición sobre lo que entiende como "Itinerario de la Viticultura española en los últimos cincuenta años". A lo largo de su charla, nos comentaba que la transformación del cultivo de la vid para vinificación en este periodo, podría considerarse en cierto modo como una concatenación en el tiempo de palabras claves, tales como: producción, calidad, medio ambiente, cambio climático y sostenibilidad, que representan una sucesión de escenarios que en gran medida han determinado los cambios operados a lo largo de este periodo en lo que al cultivo de la vid se refiere, y que han supuesto una auténtica revolución basada en la tecnología, en la creciente preocupación medioambiental y en las demandas de un mercado cada día más comprometido, exigente y conocedor del vino que consume. Un camino recorrido, en el que se ha compatibilizado el desarrollo tecnológico, frente a una falta de profesionalización del sector en los primeros momentos, y la necesidad de mantener y mejorar los criterios de calidad de la uva en un sentido más amplio, es decir, no solo teniendo en cuenta los atributos habitualmente considerados de su nivel de maduración y de su estado sanitario, sino también todo aquello que actualmente se identifica con el respeto al medio ambiente, la seguridad, la salud o con la tipicidad de los vinos, entre otros. Asimismo, resulta importante considerar como la evolución del cultivo de la vid ha venido marcada por una normativa muy restrictiva, que en ocasiones se ha convertido en un factor limitante para su desarrollo y que persiste en la actualidad, muy ligada a las exigencias medioambientales y de calidad.

En este itinerario, identificó tres etapas que han venido marcadas por cambios sustanciales en lo que a la concepción de la viticultura se refiere. De esta manera, se refirió a una primera etapa de viticultura tradicional, como la que existía en la España de los años setenta, y que constituyó el punto de partida de esta transformación; posteriormente, habló de una viticultura con un matiz intensivo, cuyo objetivo primordial pasaba por la mejora de la producción



y de la disminución de los costes de cultivo; para finalmente, centrar su atención en el modelo de viticultura de calidad y de sostenibilidad que vivimos actualmente, y que en muchas regiones vitícolas sigue conviviendo con el modelo de viticultura intensiva.

La tercera conferencia “Reflexiones sobre la evolución de la enología en España en los últimos 50 años. Una mirada a través del GTEVE” la dictó Ernesto Franco Aladrén. Describió como la enología en 1979, en particular por la baja tecnificación de las bodegas, afectaba negativamente a localización del vino. En 1983, el INDO propone un Plan de Mejora de la Calidad de los vinos españoles, e incentiva la creación de Centros Enológicos. Enmarcado en esta estrategia, en enero de 1987 en una reunión del INDO, se crea el GTEVE con el objetivo de compartir las experiencias entre los centros de viticultura y enología. Así, en 1988 tuvo lugar la primera reunión en Madrid que han continuado hasta hoy. En 2023 ha tenido lugar la 35ª reunión. En 1993 comienza la publicación ordinaria de las actas de las reuniones, y extraordinariamente se han venido publicando separatas temáticas como la de cubiertas vegetales, levaduras no *Scharyomyces*, y enfermedades de madera de vid. Especial incidencia en el grupo tuvo la formación en análisis sensorial por parte del INDO, y las degustaciones que de modo sistemático se han realizado en las reuniones del GTEVE. En un futuro, posiblemente la metabolómica y su aplicación a las prácticas enológicas, jugará un papel importante en el avance del conocimiento del vino.

El Grupo después del debate de las comunicaciones, presenta las siguientes recomendaciones:

- Seguir recomendando a los diferentes centros el estudio de las levaduras no *Sacharomyces*, en particular con las variedades autóctonas y nuevas aplicaciones de las mismas.
- Remitir al MAPA las experiencias de enología que afecten a prácticas en fase de autorización o aquellas que modifican las condiciones de aplicación de cuando fueron autorizadas.
- Animar el trabajo que cuatro centros están realizando conjuntamente en la selección clonal de la variedad Garnacha Blanca. Coordinando los trabajos D. José Félix Cibriáin, del Departamento de Desarrollo Rural y Medio Ambiente del Gobierno de Navarra y cuando la selección concluya editar la Guía de la selección con los clones más destacados.
- Recomendar a los diferentes centros la continuación de la recopilación de información sobre variedades minoritarias de vid para robustecer la “Guía de Variedades Minoritarias”, en aspectos vitícolas y enológicos, al objeto de ir perfilando una revisión que incorpore caracteres novedosos de las variedades, tal que: menor grado alcohólico, tolerancia a esteres tanto abióticos como bióticos, etc.
 - Durante el debate se hizo referencia a la crisis climática, y se insistió en robustecer la recopilación de los trabajos que en diferentes ámbitos de la viticultura como: prácticas de cultivo, variedades, portainjertos, clones, tratamientos de viñedo, y desde el ámbito de la enología como: levaduras y bacterias, tratamientos físicos de mostos y vinos, etc., que afecten a los parámetros de los vinos, en especial a los que se modifican sustancialmente por los efectos del cambio climático, como es la concentración de azúcar y polifenoles.
- Se insistió nuevamente sobre la sugerencia al MAPA de la aceleración de los trámites para la certificación por Oficina Española de Variedades Vegetales (OEVV) de las



variedades minoritarias y se sugirió la necesidad de generar una nueva Guía de variedades recuperadas y que ya se hayan introducido en la lista de variedades comerciales.

- En el debate se vio la necesidad de coordinar, al menos entre los centros, la asignación de nombres a variedades recuperadas y que se encuentran en las colecciones de los Centros, dado que este aspecto es muy importante para el futuro comercial de las variedades. El primer contacto se realizará en fechas próximas, de coordinar y proponer fecha para reunión se encargará D. Gregorio Muñoz.

No hubo una propuesta para la sede de la próxima reunión, quedando pendiente la futura sede, que deberá gestionar el Coordinador.

Por razón de la jubilación del actual coordinador Ernesto Franco, el grupo aprobó que sea Félix Cibriáin Sabalza quien asuma la coordinación del GTEVE.

Agradecer la asistencia a la Reunión de todos los participantes y especialmente a los éméritos y a los que han dictado las conferencias, así como a EVENA por la acogida en sus instalaciones y en particular al personal de la misma por su dedicación y profesionalidad en la organización de la reunión. A Bodegas Pagos de Araiz por el tiempo y entusiasmo dedicado en la visita y la degustación de los distintos vinos que se presentaron, reflejo de aquellos que se producen en la D.O. Navarra. A Reyno Gourmet y a la D.O. Navarra por la degustación de los productos gastronómicos navarros y sus vinos.

Como colofón a la reunión de especial interés ha sido la visita, a la bodega experimental de EVENA y la cata de distintos vinos de varios Centros de variedades recuperadas y conservadas en los diferentes Bancos de Germoplasma autonómicos. La jornada concluyó con una degustación gastronómica navarra.

El Grupo felicito a Félix Cibriáin como nuevo coordinador del Grupo y ha agradecido, con reconocimiento y afecto, a Ernesto Franco la coordinación del Grupo en los últimos 15 años. Ambos han dado las gracias por las muestras de aprecio y manifiestan su total disponibilidad hacia todos los miembros del GTEVE.

En Olite y Zaragoza a once de octubre de dos mil veintitrés

Los Coordinadores del Grupo

Ernesto Franco Aladrén

Félix Cibriáin Sabalza

35º REUNIÓN

GRUPO DE TRABAJO
**EXPERIMENTACIÓN EN
VITICULTURA Y ENOLOGÍA**

.....

TRABAJOS PRESENTADOS

35º REUNIÓN

GRUPO DE TRABAJO
**EXPERIMENTACIÓN EN
VITICULTURA Y ENOLOGÍA**

.....

VITICULTURA

Acciones protectoras vitícolas frente al incremento de temperatura asociado al cambio climático. Técnicas de sombreado de racimos

Sergio Ibáñez y Luis Rivacoba

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja). Finca La Grajera. Carretera Burgos, km 6. 26071 Logroño (La Rioja). (Apartado Postal Nº 1.042 - 26080 Logroño). Tfno. 941 05 30 89; e-mail: sibanezp@larioja.org

Resumen

El efecto del incremento de la temperatura y de la radiación asociado al cambio climático puede ocasionar daños en bayas y racimos expuestos a estos factores extremos, contribuyendo en gran medida a la reducción del potencial enológico de la vendimia en términos de madurez, color o características organolépticas. Con el objeto de mitigar estos impactos, se ha planteado la técnica del sombreado de los racimos de la vid mediante mallas de protección. La experiencia planteada en este trabajo se ha centrado, durante los años 2021 y 2022, en la variedad Graciano que, en ciertas condiciones de cultivo, resulta sensible a sufrir golpe de sol o asurado.

Los resultados obtenidos han mostrado que la instalación de mallas de sombreado ha reducido notablemente la temperatura del racimo, evitando igualmente los daños por golpe de sol. En cuanto a los resultados en los parámetros productivos y de calidad del mosto y del vino, se han visto condicionados, en gran medida, por las características meteorológicas de las campañas estudiadas, siendo especialmente relevante la disminución del rendimiento unitario del tratamiento testigo en 2022.

1. Introducción

El cambio climático es una realidad que, hoy en día, pocos ponen en duda y que se refiere a la alteración del clima debido, directa o indirectamente, a la actividad humana que modifica la composición de la atmósfera, afectando entre otros aspectos a la distribución y desarrollo de la vegetación y los ecosistemas. Es cierto que el clima es cíclico y que históricamente en nuestro planeta se han sucedido periodos de tiempo con escenarios ambientales cambiantes. El problema reside en que estos ciclos se están acelerando con gran intensidad y, para la mayoría de seres vivos, resulta complicada la adaptación a este ritmo tan rápido.

La vid no es una excepción, y la modificación del clima de una región puede condicionar tanto las características del mosto y del vino obtenidos como su calidad y tipicidad, ya que variaciones en parámetros como la radiación, la temperatura o el régimen de precipitaciones que traen consigo el cambio climático, afectan directamente al desarrollo y a la fisiología de la planta (van Leeuwen et al., 2019).

Posiblemente, una de las consecuencias del cambio climático con más impacto en la viticultura sea el incremento de la temperatura (Ghiglieno et al., 2020). En general, este aumento térmico tiende a producir un adelanto en el proceso de acumulación de azúcar en la baya, haciendo



que la maduración se produzca en un período del ciclo más cálido y causando, de este modo, desequilibrios en el fruto que pueden perjudicar a ciertas propiedades cualitativas como el color, la acidez o las características organolépticas del mosto y del vino (Ramos y Martínez de Toda, 2020). Además, hay que considerar que los racimos son bastante sensibles a las temperaturas elevadas y que, en situaciones de estrés severo, podrían alcanzar una temperatura hasta 15°C superior a la del aire por falta de transpiración. Asimismo, existe un indicador, como es el número de días con temperaturas máximas por encima de 35°C, que se está viendo intensificado con el cambio climático, correlacionándose en gran medida con efectos fisiológicos negativos en la vid (Ollat et al. 2021).

Todos estos efectos, ligados al incremento térmico estival, son más notorios en algunas variedades especialmente sensibles como Graciano que, en ciertas condiciones de cultivo, son susceptibles de sufrir golpe de sol o asurado, un daño que provoca una decoloración en las bayas de tono amarillo, dorado o pardo, llegando en ocasiones a estar acompañado de una deshidratación de la misma que puede ocasionar, incluso, agrietado o pasificación (Ibáñez et al., 2022).

Ante esta situación, tenemos la necesidad de encontrar mecanismos y herramientas en viticultura que den respuesta a este nuevo escenario, planteando soluciones apropiadas para estas nuevas condiciones. Una de las alternativas de manejo del cultivo, que permite evitar que los racimos reciban una exposición excesiva, es el empleo de redes de sombreado, con capacidad protectora ante la radiación ultravioleta, instaladas para evitar tanto los efectos de las altas temperaturas como los impactos directos que éstas pueden ocasionar a los racimos (Oliveira et al., 2014 y Dufourcq et al., 2022).

En el presente trabajo, se ha buscado analizar el efecto de estas redes de sombreado para mitigar el impacto de las altas temperaturas sobre la vid y, concretamente, en la variedad Graciano, caracterizando asimismo la incidencia en el rendimiento, en la composición de la uva y del vino y en las características organolépticas de éste.

2. Material y Métodos

El trabajo se ha desarrollado en un viñedo localizado en Cenicero (La Rioja), propiedad de Bodegas La Rioja Alta, plantado en 2016 con la variedad Graciano sobre el portainjerto SO4 y conducido en doble cordón Royat con un marco de plantación de 2,60 x 1,20 m. Las líneas de espaldera se disponen en una orientación norte-sur, con desviación de -35°.

El ensayo se ha llevado a cabo durante las campañas 2021 y 2022. En la primera de ellas, se establecieron tres tratamientos: T- testigo; M50- malla de sombreado del 50% y M70- malla de sombreado del 70%. En 2022, se decidió ampliar la experiencia con dos tratamientos más, MP50 y MP70, en los que la colocación de la malla fue parcial en el tiempo, retirándose dos semanas antes de la fecha de vendimia, con el objeto de observar si, de este modo, se podía mejorar la maduración fenólica de la uva, manteniendo la protección durante la época de maduración. En todos los tratamientos con malla, ésta fue fabricada en polietileno de alta densidad, con protección contra la radiación ultravioleta, y con un metro de altura, colocándose en la cara oeste de la espaldera, tras el cuajado de la vid, protegiendo principalmente la zona de racimos expuesta al sol de la tarde. Los tratamientos se plantearon con tres repeticiones y treinta cepas por repetición.



La influencia de la red de sombreado sobre la temperatura del racimo se ha evaluado a través de mediciones con una cámara termográfica (Testo 885). Esta cámara ofrece una imagen térmica de los objetos que visualiza en función de las emisiones de radiación infrarroja de estos, donde cada pixel proporciona un dato de temperatura, obteniéndose la temperatura de toda la superficie del racimo fotografiada y no solo de un punto concreto. Se consideraron tres momentos para analizar la temperatura de los racimos de los distintos tratamientos, todos ellos entre los estados fenológicos de envero y maduración: los días 5 y 25 de agosto y 27 de septiembre en 2021 y los días 20 de julio y 10 y 30 de agosto en 2022. En el primer año, la medida del 5 de agosto se realizó centrada a las 12:30h, sin que el sol incidiera aún en la cara oeste de la espaldera, mientras que los dos restantes se plantearon a las 17:30h, para analizar el efecto térmico en dicha cara al recibir la luz solar. En 2022, y con la experiencia previa de la campaña anterior, se decidió tomar medidas en las dos franjas horarias para cada una de las jornadas analizadas. Los datos medios de temperatura del racimo se obtuvieron a partir de cinco imágenes por tratamiento, repetición y hora y día de medición.

En el momento de vendimia, para cada tratamiento y repetición, se evaluaron los siguientes componentes de la producción: el rendimiento unitario (kg/cepa), el número de racimos por cepa, el peso medio del racimo (g) y el peso de 100 bayas (g). Asimismo, se recogieron muestras de bayas con objeto de analizar los parámetros que intervienen en la acidez del mosto: pH, ácido málico (g/l), ácido tartárico (g/l) y potasio (mg/l). También en la cosecha, se efectuó una estimación de los daños producidos en racimos por el efecto del golpe de sol. Para ello, se realizó una valoración visual e individual de todos los racimos recolectados (cerca de 300 por tratamiento y repetición) en función del porcentaje aproximado de bayas afectadas en el total de cada racimo, obteniendo información de la cantidad de racimos afectados y de la intensidad de ese daño en el conjunto del racimo.

Todos los tratamientos se vendimiaron de forma separada, realizando después la microvinificación de los mismos en depósitos de 100 litros, aplicando una elaboración tradicional para vinos tintos en la que la uva fue despalillada, estrujada y sulfitada, inoculando tras ello levaduras secas activas para lograr una fermentación alcohólica homogénea y eficaz. Posteriormente, se realizó una siembra de bacterias seleccionadas para inducir la fermentación maloláctica. Una vez finalizada esta fermentación, y tras estabilizar en frío y sulfitar el vino, se procedió a analizar los vinos resultantes, determinando grado alcohólico (%vol), contenido en antocianos (mg/l) e índice de polifenoles totales (IPT 280 nm). Los vinos fueron sometidos a un análisis organoléptico por parte de un panel de seis catadores expertos.

El análisis estadístico de los datos resultantes se ha efectuado con el programa IBM SPSS, versión 29. Se han aplicado técnicas de análisis de la varianza (ANOVA) con el fin de conocer si existen diferencias en los distintos parámetros estudiados en función del tratamiento planteado. En los gráficos adjuntos, los asteriscos se refieren al nivel o grado de significación (g.s.). Así, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ y n.s.: no significativo. Por su parte, las letras distintas que siguen a los valores de cada variable, sirven para reflejar las diferencias entre tratamientos, estimadas mediante el test de separación de medias de Tukey.



3. Resultados

Analizando las temperaturas de los racimos de los distintos tratamientos y campañas estudiadas, se puede observar que han disminuido de forma significativa, en todas las fechas y franjas horarias estudiadas, por el efecto protector de las redes de sombreado (Tabla 1). Incluso en momentos en que los racimos no reciben directamente la radiación, como las medidas tomadas a las 12:30 h, la red ha conseguido reducir una media de 1,62 °C con respecto al testigo, reflejando de este modo la acción continuada de la radiación solar sobre los racimos que ofrecen una mayor exposición, como es el caso de los racimos del tratamiento testigo. Por su parte, en las medidas centradas en las 17:30, las diferencias han sido mucho más acusadas, llegándose a reducir la temperatura, con respecto a los racimos testigo, en más de 6 °C con la malla de 50% en 2021 y con una media de 3 °C en el conjunto de las dos campañas analizadas. Las diferencias entre los dos tipos de mallas no han sido significativas, si bien en la mayor parte de casos se ha logrado un mayor efecto refrigerante con M50 que con M70, a pesar de que este último tratamiento el que teóricamente cuenta con un porcentaje más elevado de sombreado. Posiblemente, esto haya sido debido a una combinación más eficaz de protección y aireación con la malla de 50% que con la de 70%.

Tabla 1. Temperatura media del racimo (°C)

año	2021			2022					
	5-ago	25-ago	27-sep	20-jul		10-ago		30-ago	
hora	12:30	17:30	17:30	12:30	17:30	12:30	17:30	12:30	17:30
T	25,97 a	38,73 a	28,31 a	28,71 a	30,56 a	31,89 a	33,71 a	32,75 a	36,35 a
M50	24,80 b	32,42 c	26,36 b	26,69 b	28,76 b	30,21 b	32,03 b	30,39 b	32,43 b
M70	25,35 ab	33,85 b	26,03 b	27,14 b	29,01 b	30,38 b	32,20 b	30,80 b	32,66 b
g.s.	*	***	***	***	***	***	***	***	***
g.s.	***			***					

La estimación de los daños en racimos por golpe de sol ha ofrecido resultados muy relevantes (Tabla 2). Así, se detectó que en 2021 algo más del 10% de los racimos del tratamiento testigo sufrieron daños por golpe de sol, en mayor o menor medida, alcanzando más del 50% en 2022, un año especialmente intenso en cuanto a temperatura estival. Mientras, en los tratamientos en los que se instaló malla, apenas se experimentó deterioro alguno en 2021 y se situó en torno al 15% en 2022. Por su parte, el daño total del racimo o de bayas del racimo afectadas, no llegó a superar el 1% en 2021 para el tratamiento testigo, alcanzando casi el 13% en 2022. Por el contrario, los tratamientos establecidos con malla tuvieron una incidencia, mayoritariamente, por debajo del 1%.

Tabla 2. Daño en racimo por golpe de sol

	Racimos dañados por golpe de sol (%)		Daño total del racimo (%)	
	2021	2022	2021	2022
T	10,64 a	53,26 a	1,41 a	12,93 a
M50	0,11 b	18,94 b	0,01 b	1,07 b
M70	0,47 b	14,95 b	0,03 b	0,89 b
MP50	-	15,02 b	-	0,84 b
MP70	-	16,00 b	-	0,91 b
g.s.	***	**	***	**



Considerando los valores obtenidos en los parámetros productivos del ensayo (Tabla 3), cabe señalar las escasas diferencias observadas en 2021 para el conjunto de los componentes determinados. Por el contrario, en 2022 el rendimiento unitario (kg/cepa) afectó significativamente al testigo, que sufrió una disminución media próxima al 30% con respecto al resto de tratamientos cubiertos con malla. En este sentido, los daños por golpe de sol en el tratamiento testigo fueron especialmente severos en esta campaña, repercutiendo principalmente en el peso del racimo, debido a mermas relevantes sufridas por marchitamiento, quemaduras o desecación. Esta depreciación cuantitativa del racimo debe considerarse, en buena medida, de cara a interpretar posteriormente su posible incidencia en los valores cualitativos obtenidos en el mosto y en el vino.

Tabla 3. Componentes de la producción

	Nº racimos/cepa		Kg/cepa		Peso racimo (g)		Peso 100 bayas (g)	
	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022
T	11,06	12,23	3,08	3,48 b	278,56	288,01 b	161,87	143,15
M50	11,22	12,89	3,21	4,50 a	286,20	349,37 a	158,70	148,18
M70	11,05	11,83	3,15	4,21 ab	284,20	357,07 a	161,57	141,67
MP50	-	13,24	-	4,88 a	-	368,93 a	-	149,80
MP70	-	11,96	-	4,40 ab	-	367,56 a	-	150,78
g.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.

Uno de los parámetros que más podría verse afectado por la acción del sombreado es la acidez (Tabla 4) y, en concreto, el ácido málico acumulado en la baya. Este ácido orgánico ve limitada su síntesis con temperaturas superiores a 38°C y, además, disminuye su contenido a partir de envero bien por su transformación en azúcares o bien por combustión respiratoria, la cual se ve acelerada por temperaturas particularmente altas o por exposiciones prolongadas. Aunque, a priori, podía interpretarse que la acción de la malla de sombreado tendría cierta influencia en un aumento del contenido de ácido málico con respecto al testigo, los resultados en el mosto muestran una variación significativa sustancial del mismo únicamente en 2022, si bien es cierto que la tendencia observada en 2021 indicó también un ligero aumento de ácido málico relacionado con la protección con red. Por otro lado, el ácido tartárico, el otro ácido orgánico de mayor importancia en la uva junto con el ácido málico, ha ofrecido valores más próximos entre tratamientos, siendo ligeramente mayor el del testigo en 2021 y el de los tratamientos con red en 2022. En cualquier caso, la acidez real del mosto, en términos de pH, no se ha visto alterada significativamente por efecto de la malla de sombreado. Solo cabe destacar el valor del contenido en el catión potasio en 2022, que se ha visto incrementado en los casos en los que se ha aplicado sombreado con malla, aunque de una forma variable entre repeticiones, lo que ha originado que las diferencias no fueran significativas. Según Smart et al. (1985), el microclima sombreado provoca la acumulación de potasio en los brotes antes del envero, repercutiendo posteriormente en niveles altos de este elemento en la baya. Sin embargo, esta situación se refiere a un sombreado más completo, que incluye a racimos y al resto de la vegetación. No es el caso de esta experiencia, en donde la vegetación por encima de la zona de racimos ha permanecido sin proteger por la red. Por tanto, pueden plantearse otras hipótesis alternativas de tipo fisiológico, ligadas a un verano de estrés térmico severo, como las que implican la regulación, mediante la fitohormona del ácido abscísico, de la carga de cationes de potasio por el xilema (Gaymard et al., 1998).



Tabla 4. Parámetros de acidez del mosto

	pH		Ácido Tartárico (g/l)		Ácido Málico (g/l)		Potasio (mg/l)	
	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022
T	3,34	3,57	7,30	7,01	1,25	0,81 b	1308,64	1596,67
M50	3,39	3,63	6,80	7,32	1,37	1,11 a	1391,28	1845,37
M70	3,40	3,66	6,87	7,19	1,35	1,12 a	1380,80	1815,97
MP50	-	3,68	-	7,29	-	1,19 a	-	1923,15
MP70	-	3,65	-	7,16	-	1,13 a	-	1811,25
g.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.

En lo relativo a los parámetros de calidad del vino analizados, que se han considerado que podrían tener cierta relevancia en los tratamientos de este ensayo (Tabla 5), el grado alcohólico no mostró diferencias significativas en ninguno de los dos años estudiados. Tampoco fue así en 2022, una campaña en la que el testigo sufrió una considerable pérdida de producción unitaria que, aunque con frecuencia suele vincularse con un aumento en la acumulación de azúcares, en este caso no se produjo tal circunstancia, pudiera ser porque el alto estrés térmico sufrido limitara dicha acumulación. Por su parte, la carga polifenólica del vino tampoco ha manifestado variaciones significativas, si bien en 2021 el contenido en antocianos se vio incrementado por acción del sombreado, detectándose en 2022 un efecto inverso. Igualmente, el IPT tampoco ha permitido discriminar con claridad los tratamientos. En consecuencia, y aunque la malla haya podido ejercer un impacto protector sobre la uva ante la degradación de antocianos por altas temperaturas, como las observadas en 2021, los valores obtenidos en la siguiente añada no permiten garantizar esta consideración.

Tabla 5. Parámetros de calidad del vino

	Grado alcohólico (%vol)		IPT 280nm		Antocianos (mg/l)	
	2021	2022	2021	2022	2021	2022
T	12,72	13,07	49,86	59,33	763,7	738,60
M50	13,02	12,77	50,02	53,78	835,5	640,87
M70	12,87	12,90	49,94	51,51	799,6	608,67
MP50	-	12,83	-	54,91	-	661,57
MP70	-	13,18	-	55,92	-	643,17
g.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

A pesar de que los datos analíticos del mosto y del vino no han mostrado resultados concluyentes entre los tratamientos analizados, la valoración organoléptica del vino, llevada a cabo por un panel de catadores expertos, sí que ha revelado una preferencia destacada hacia los vinos procedentes de los tratamientos con malla. En este sentido, el análisis sensorial ha sido más determinante que el análisis químico, al menos para el global de los dos años considerados. En conjunto, los tratamientos que proporcionan sombreado, ya sea de forma total o parcial en el tiempo, han manifestado una valoración global positiva por encima del testigo, destacando principalmente los aspectos relacionados con la calidad gustativa y la armonía del vino (Gráfico 1).

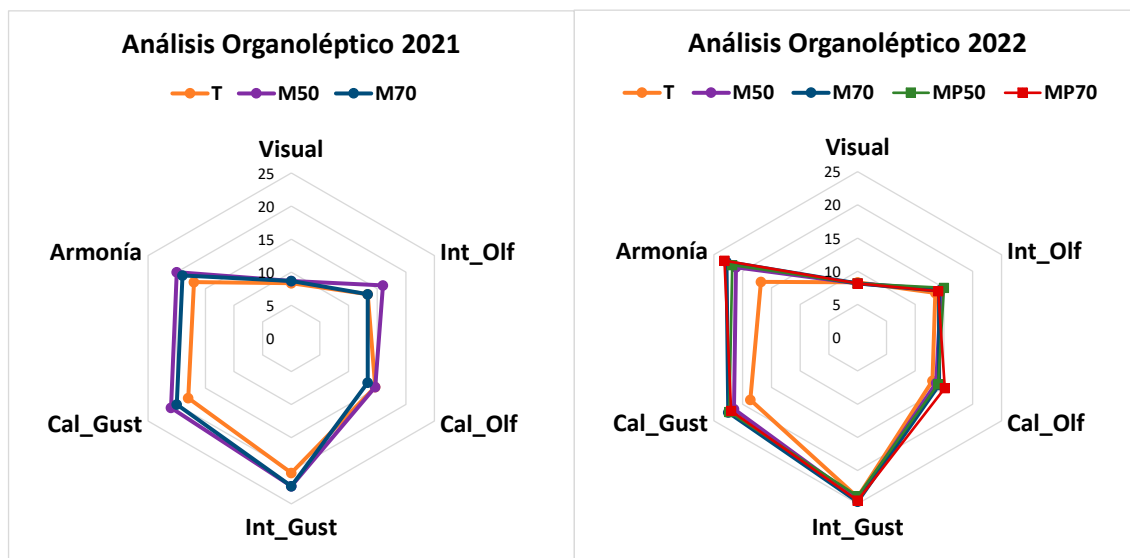


Fig. 1. Análisis organoléptico del vino

4. Conclusiones

La experiencia de sombreado de racimos ha permitido comprobar, sobre todo, el papel protector de las mallas empleadas y su capacidad para disminuir notablemente la temperatura del racimo en la etapa estival. Asimismo, en campañas extremadamente calurosas como la acaecida en 2022, que resultan cada vez más frecuentes debido al cambio climático, los daños por golpe de sol sobre la variedad Graciano se han visto minimizados, de forma altamente significativa, gracias a estas mallas. En este tipo de añadas, con estrés térmico intenso, las redes de sombreado también han logrado mitigar las pérdidas de rendimiento observadas en el testigo.

A pesar de que los resultados de los parámetros de calidad del mosto y del vino no han sido demasiado categóricos, y sería preciso ampliar los datos obtenidos con algún año adicional de experiencias, el análisis organoléptico ha permitido diferenciar, claramente, el tratamiento testigo de los tratamientos protegidos con red, siendo mejor valorados los vinos procedentes de estos últimos. Por esta razón, sería interesante abordar, en próximos trabajos, estudios de composición fenólica detallados, que pudieran aportar información más precisa de cómo actúa la malla y a qué compuestos exactamente afecta y en qué medida.

5. Bibliografía

1. DUFOURCQ, T.; THOMAS, A.; LOPEZ, F.; VERGNES, D. and FEILHES, C. 2022. **Effect of partial net shading on the temperature and radiation in the grapevine canopy, consequences on the grape quality of cv. Gros Manseng in PDO Pacherenc-du-vic-Bilh.** Conference: terclim2022. XIVth International Terroir Congress 2nd ClimWine Symposium. Bordeaux, France, July 3-8.
2. GAYMARD, F.; PILOT, G.; LACOMBE, B.; BOUCHEZ, D.; BRUNEAU, D.; BOUCHEREZ, J.; MICHAUX-FERRIÈRE, N.; THIBAUD, J.B. ET SENTENAC, H. 1998. **Identification and**



- Disruption of a Plant Shaker-like Outward Channel Involved in K⁺ Release into the Xylem Sap.** Cell 94 (5), 647-655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81606-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81606-2).
3. GHIGLIENO, I.; MATTIVI, F.; COLA, G.; TRIONFINI, D.; PERENZONI, D.; SIMONETTO, A.; GILIOLI, G. and VALENTI, L. 2020. **The effects of leaf removal and artificial shading on the composition of Chardonnay and Pinot noir grapes.** OENO One 54(4), 761–777. DOI: <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.4.2556>.
 4. IBÁÑEZ, S.; RIVACOBBA, L. y GARCÍA-ESCUADERO E. 2022. **Prácticas vitícolas de adaptación al cambio climático. Experiencias de sombreado de racimos en la variedad Graciano.** Vida Rural 511, 50-58.
 5. OLIVEIRA, M.; TELES, J.; BARBOSA, P.; OLAZABAL, F. y QUEIROZ, J. 2014. **Shading of the fruit zone to reduce grape yield and quality losses caused by sunburn.** OENO One 48(3), 179–187. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2014.48.3.1579>.
 6. OLLAT, N.; ZITO, S.; RICHARD, Y.; AIGRAIN, P.; BRUGIÈRE, F.; DUCHÊNE, E.; GARCIA de CORTAZAR, I.; GAUTIER, J.; GIRAUD, E.; HANNIN, H.; TOUZARD, J.M. et BOIS, B. 2021. **La diversité des vignobles français face au changement climatique: simulations climatiques et prospective participative.** Climatologie 18, 3. <https://doi.org/10.1051/climat/202118003>
 7. RAMOS, M.C. Y MARTÍNEZ DE TODA, F. 2020. **Variability in the potential effects of climate change on phenology and on grape composition of Tempranillo in three zones of the Rioja D.O.Ca. (Spain).** European Journal of Agronomy 115, 126014. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126014>.
 8. SMART, R.E.; ROBINSON, J.B.; DUE, G.R. and BRIEN, C.J. 1985. **Canopy microclimate modification for the cultivar Shiraz. II. Effects on must and wine composition.** Vitis 24, 119-128.
 9. VAN LEEUWEN, C.; DESTRAC-IRVINE, A.; DUBERNET, M.; DUCHÊNE, E.; GOWDY, M.; MARGUERIT, E.; PIERI, P.; PARKER, A.; DE RESSÉGUIER, L. and OLLAT, N. 2019. **An Update on the Impact of Climate Change in Viticulture and Potential Adaptations.** Agronomy 9, 514. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090514>.

6. Agradecimientos

Este trabajo se enmarca dentro de las actuaciones del proyecto “Estrategias y prácticas vitícolas sostenibles de adaptación al cambio climático” (VITISAD), cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020).

Análisis de ADN antiguo de vid y su aplicación en el estudio de restos arqueológicos y herbarios

Carolina Royo^{1,2*}, Javier Tello¹, Yolanda Ferradás¹, Guillem Pérez-Jordà³, Leonor Peña-Chocarro², Javier Ibáñez¹, José Miguel Martínez-Zapater¹

¹*Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Finca La Grajera, Ctra. de Burgos km. 6 (LO-20- Salida 13), Logroño. 941894980. *carolina.royo@icvv.es, javier.tello@icvv.es, yolanda.ferradas@icvv.es, zapater@icvv.es, javier.ibañez@icvv.es*

²*Instituto de Historia, calle Albasanz 26-28, 28037 Madrid. leonor.chocarro@csic.es,*

³*Universitat de València, avenida Blasco Ibáñez 28, 46010 Valencia. guillem.perez@uv.es*

Resumen

El ADN conservado en especímenes vegetales antiguos permite investigar los procesos evolutivos acontecidos en los genomas de las plantas a lo largo del tiempo. Sin embargo, recuperar la información genómica contenida en dichos especímenes es un gran desafío, ya que el ADN suele encontrarse degradado, fragmentado, contaminado con otros ADNs y con presencia de sustancias secundarias que limitan su recuperación y uso. La extracción de ADN se ha de realizar siguiendo protocolos optimizados y en laboratorios específicos para evitar la contaminación con ADN actual. Cuando la extracción es de calidad, pueden obtenerse secuencias y perfiles marcadores de ADN nuclear y cloroplástico y compararlos con los disponibles para variedades actuales en bases de datos internacionales (ICVV, VVC). Esta comparación permite identificar las relaciones entre variedades antiguas y variedades actuales. Por ejemplo, el análisis del genoma cloroplástico de semillas de vid encontradas en yacimientos ibéricos sugiere su origen oriental en el caso de variedades cultivadas por los fenicios, mientras que los romanos utilizarían variedades locales. Por otro lado, el análisis de un herbario de vid serbio de 200 años ha permitido identificar algunos de los especímenes como variedades que se cultivan actualmente en los Balcanes. Estos trabajos proporcionan información sobre el cultivo y usos de la vid a lo largo de la historia.

1. Introducción

La paleogenómica, o estudio del ADN antiguo, permite reconstruir el uso de diversas especies de plantas en el pasado (la agricultura, la dieta o la vegetación), representando las economías pasadas, ecología, migraciones o comercio. La paleogenómica es una potente herramienta científica que proporciona información directa en el espacio y en el tiempo del proceso evolutivo. El estudio del ADN antiguo presente en muestras arqueológicas es una ventana abierta al pasado que permite datar esa historia. A partir del ADN se puede obtener identificación genética de variedades antiguas, relaciones genéticas con las variedades actuales, determinación de su origen geográfico, información sobre las características de las variedades antiguas y sobre algunas prácticas vitícolas.

La domesticación de la vid ha modificado el cultivo, seleccionando variedades con flores hermafroditas, racimos, frutos y semillas más grandes, y mayor contenido en azúcar en bayas (This *et al.*, 2006). Los datos arqueológicos localizan la domesticación primigenia de la vid en el Cáucaso hace 8000 años, donde se han encontrado los restos más antiguos de una vasija cuyo



contenido podía ser vino (McGovern *et al.*, 2017). La diseminación de la cultura del vino y esquejes de plantas domesticadas en Europa tuvo lugar de este a oeste (Mercati *et al.*, 2021). Sin embargo, la comparación de las secuencias genómicas de más de 3000 variedades de vid sugieren una domesticación de uva de vinificación en el Cáucaso y una domesticación de uva de mesa en la región del oriente próximo que ocupan actualmente países como Líbano, Israel y Siria (Dong *et al.*, 2023). Variedades surgidas de este suceso de domesticación parecen ser las más próximas a las variedades de vinificación la mayor parte de las zonas vitícolas circunmediterráneas. Estas variedades se habrían generado mediante múltiples sucesos de introgresión de germoplasma de vides silvestres locales (*Vitis vinífera ssp. sylvestris*) (Mercati *et al.*, 2021) y una reSelección de características adecuadas para la vinificación.

A pesar de contar con escritos de viticultura de la época de los romanos, hay un milenio de incertidumbre sin referencias hasta finales de la Edad Media. Un milenio en el que la reproducción de la vid por semillas generó toda una generación de nuevas variedades. De hecho, al final de la Edad media existían denominaciones varietales conocidas en la actualidad (Alonso de Herrera, 1513) y distintos textos, entre ellos un libro portugués del siglo XVIII, hablan de la propagación por semillas y el manejo del viñedo (Alarte, 1712). Como consecuencia de estas prácticas el 75% de las variedades conocidas estén emparentadas en primer grado.

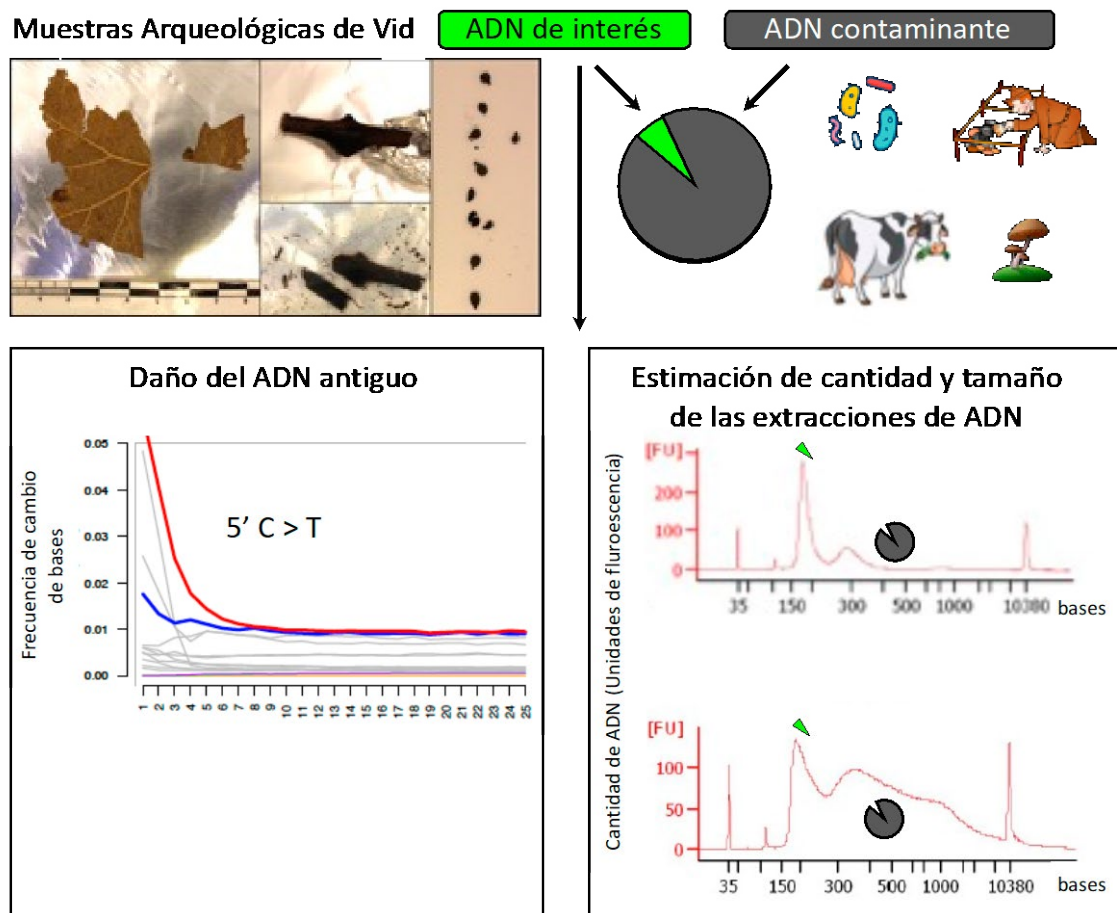


Fig. 1. Muestras arqueológicas de estudio, visualización del daño en los extremos y estimación de la cantidad de ADN antiguo (\cong 170 bases) y el ADN contaminante (> 300 bases) extraído al mismo tiempo.



Los genomas contienen toda la información genética de un individuo por la combinación de cuatro bases. En las células vegetales hay tres genomas: mitocondrial, cloroplástico y nuclear. En la vid podemos caracterizar el genoma cloroplástico y el nuclear para responder a algunas preguntas sobre su historia y evolución. La secuencia del genoma de las variedades actuales de una especie es un compendio de su historia, y en ella se pueden reconocer huellas de los procesos de diversificación, domesticación, migraciones, origen y evolución, incluso dentro de una misma variedad.

El genoma cloroplástico se presenta en múltiples copias y es de herencia materna. En este genoma pueden identificarse en base a su secuencia cuatro grupos principales también denominados clorogrupos. El clorogrupo A es el más abundante en el oeste de Europa (Península Ibérica, Francia) y norte de África propio de variedades de uva de vino occidental. El clorogrupo B abunda en las variedades de origen caucásico. Las uvas de mesa presentan el clorogrupo C, y el D predomina en variedades de uva de vino balcánico (Arroyo-García *et al.*, 2006; Tabidze *et al.*, 2014).

En cambio, el genoma nuclear se compone de dos copias por célula procedente de los dos progenitores de cada variedad. El perfil de marcadores del genoma nuclear permite identificar variedades, determinar relaciones de parentesco entre las mismas y desvela características agronómicas de interés como el color de las bayas o el aroma moscatel. En el ICVV se dispone de una base de datos con el perfil de más de 2700 variedades diferentes de *Vitis vinifera ssp. sativa* y de 650 plantas de *Vitis vinifera ssp. sylvestris* para comparar los resultados entre las muestras antiguas y las actuales. Además, disponemos de acceso a varias bases de datos, incluida la base de datos internacional VIVC (*Vitis* International Variety Catalogue, <https://www.vivc.de/>).

El ADN antiguo procedente de restos arqueológicos o herbarios de otros siglos se caracteriza por presentarse en muy poca cantidad y ser de muy baja calidad. Este ADN está degradado en pequeños fragmentos, con los extremos dañados, con cambios de nucleótidos en los extremos, y además está contaminado por ADN de otros organismos como humanos, animales, hongos, bacterias o virus (**Fig. 1**). Por ello se requiere trabajar en condiciones especiales para evitar aumentar la contaminación con ADN moderno, especialmente de la especie de estudio (Fulton and Shapiro, 2019) (**Fig. 2**). Los laboratorios donde se realizan las extracciones de ADN antiguo, también llamados salas blancas) y preparación de este para secuenciar (preparación de librerías) deben tener presión positiva para que no entren contaminantes del exterior. Los manipuladores de estas muestras evitan contaminarlas utilizando trajes y máscaras. Los laboratorios se esterilizan antes y después de su uso con lejía, alcohol y luz UV para eliminar cualquier microorganismo o fragmentos de otros ADNs actuales. Además, se asignan cabinas de trabajo diferentes para cada tipo de tarea y de este modo se evita la contaminación cruzada.



Fig. 2. Laboratorio para manipular ADN antiguo, y el equipo personal (EPI).

Los estudios de ADN procedentes de semillas arqueológicas han revelado que todas ellas derivan de uva de vino cercanas genéticamente a las variedades de Europa central y oriental. Además, se identificaron relaciones de parentesco entre semillas halladas en yacimientos romanos y medievales de norte a sur de Francia. También se determinaron relaciones de parentesco con variedades actuales. Esto sugiere que el transporte y propagación por esquejes fue una práctica vitivinícola en la época romana temprana y este sistema se ha mantenido en nuestros días. Prueba de ello es la identificación genética de una semilla de más de 1000 años como perteneciente a la variedad Traminer (Ramos-Madrugal *et al.*, 2019).

El estudio de ADN antiguo en la Península Ibérica tiene como objetivo revelar qué variedades se cultivaban en distintas épocas históricas, intentar trazar su origen y dilucidar si distintas culturas o comunidades religiosas cultivaban distintas variedades. El objetivo del estudio del herbario serbio es descubrir las prácticas vitivinícolas y la diversidad de la vid cultivada localmente antes de que se introdujera la filoxera en estas áreas tradicionalmente vitivinícolas.

2. Material y Métodos

Por un lado, se analizaron semillas (pepitas) de vid procedentes de 9 yacimientos de la Península Ibérica conservadas en estado carbonizado, desecado o embebidas en agua; y 10 trozos de sarmientos encontrados en un pecio a orillas de Villajoyosa (Alicante) hundido en el siglo I BC. Las semillas cubrían un rango arqueológico desde la época de los fenicios (siglos IX-VIII BC) a la Edad Media tardía (siglo XVI CE). Por otro lado, se analizaron 103 muestras de un herbario recolectado entre los años 1812-1824 encontrado en Sremski Karlovci (Serbia). Por las descripciones de los pliegos, las muestras herborizadas incluían variedades de uva tinta y blanca por igual, y algunas variedades podrían estar repetidas. El flujo de trabajo se muestra en la **Fig. 3**.

Las extracciones de ADN antiguo se realizaron incluyendo controles negativos en cada uno de los pasos del protocolo. Para la extracción de ADN antiguo de semillas y sarmientos de vid se utilizó el protocolo de Oliveira *et al.* (2012), con una incubación de una hora en una solución con CTAB y purificación del ADN con el kit 'MinElute PCR purification' (Qiagen). La extracción de ADN de muestras de herbario se realizó siguiendo el protocolo de Latorre *et al.* (2020). Este protocolo parte de una pequeña cantidad de material (100 mg) y una incubación mínima de 12 horas con una solución de lisis con PTB.

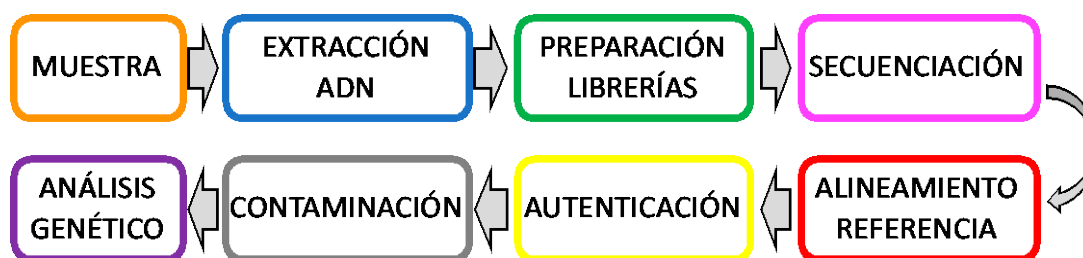


Fig. 3. Esquema de trabajo seguido para el análisis de ADN antiguo.

El ADN de semillas arqueológicas se procesó para su secuenciación masiva con lecturas cortas de Illumina siguiendo el protocolo de preparación de librerías de Meyer and Kircher (2010). La secuenciación masiva se llevó a cabo en diferentes servicios (CRG, Barcelona; MPI de Biología, Alemania; Novogene, GB). Las secuencias se analizaron siguiendo el protocolo de Latorre *et al.* (2020). A partir de las secuencias alineadas al genoma de referencia PN40024 12Xv2, se analizaron marcadores moleculares -48 SNPs (Cabezas *et al.*, 2011) y 10.000 SNPs (Laucou *et al.*, 2018)- para compararlos con la base de datos de 2700 variedades del ICVV y con un panel de 783 variedades (Laucou *et al.*, 2018), respectivamente.

El análisis de 13 marcadores microsatélites en las muestras de herbario se llevó a cabo en las instalaciones del ICVV. El perfil de estos marcadores se comparó con el de las variedades de las bases de datos del ICVV y la del VIVC.

3. Resultados

La extracción de ADN de semillas tuvo éxito en el 20% de las semillas que se conservaban embebidas en agua o desecadas, cubriendo todo el rango cronológico. Con las semillas carbonizadas no se obtuvo ADN. Cuanto mayor fue la antigüedad de las muestras menor cantidad de ADN de vid se recuperó. El éxito en las extracciones de ADN de muestras del herbario de unos doscientos años de antigüedad (66%) fue muy superior al de las muestras arqueológicas. Esta diferencia se puede deber al buen estado de conservación de las muestras -condiciones estables de baja humedad y temperatura en un sótano, sin conservantes químicos que pudieran inhibir las reacciones de análisis de marcadores- y a la menor antigüedad de las muestras.

Las secuencias de las semillas antiguas revelaron los daños propios de ADN antiguo. Con más de un 30% de daño en los extremos en las muestras de más de dos milenios. El clorogrupo identificado en las semillas arqueológicas mostró que las semillas más antiguas podrían tener un origen oriental, al ser portadoras de clorogrupos C (uva de mesa, Oriente Próximo) y D (Balcanes). Sin embargo, la mayoría de muestras de los últimos 2000 años presentaron clorogrupo A predominante en el Mediterráneo occidental. Estos datos sugieren que los fenicios podrían viajar con sus sarmientos, y plantarlos en la Península Ibérica, mientras que a partir de la civilización romana y posteriormente habrían utilizado variedades descendientes de la introgresión de vides locales.

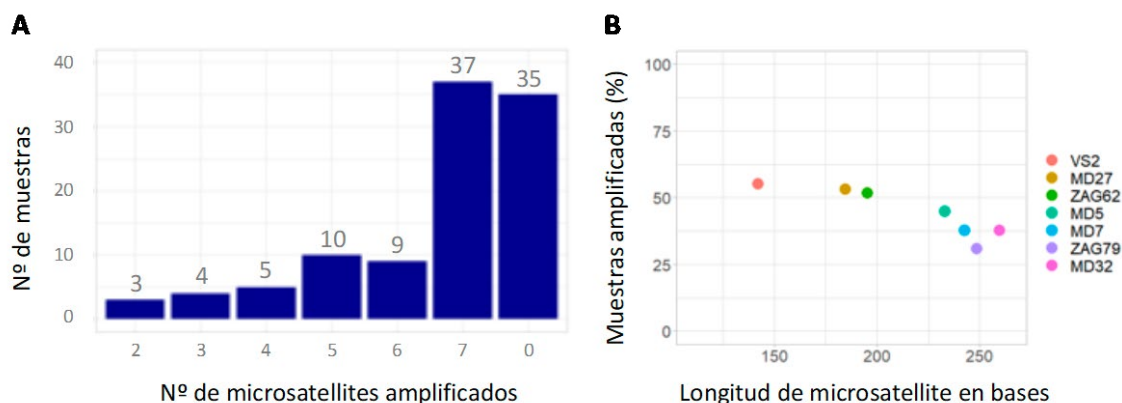


Fig. 4. Resultados del perfil de marcadores microsatélites obtenidos en las muestras de herbario. A) Distribución de las muestras por número de microsatélites amplificados. B) Porcentaje de muestras en las que se ha amplificado cada microsatélite, en función de la longitud del mismo.

El análisis de marcadores moleculares de semillas arqueológicas reveló que una semilla datada del siglo XVI coincide en un 86.9% (167 alelos de 192) con la variedad Monastrell. Adicionalmente, se identificaron 21 posiciones en homocigosis en el ADN antiguo que coincidían con un alelo presente en heterocigosis en la variedad Monastrell actual. Esta pérdida de un alelo es frecuente en este tipo de materiales por la degradación del ADN. La identificación de la variedad es coherente con el contexto del yacimiento ubicado en el interior de la provincia de Valencia, zona donde se cultiva habitualmente. Aunque hay escritos romanos que hablan de una variedad con este nombre, no hay evidencia de que sea la misma variedad. Sin embargo, a partir del siglo XIV hay escritos que describen esta variedad tal y como la conocemos actualmente (Eiximenis, 1327).

El ADN extraído de las muestras herborizadas fue analizado para siete microsatélites en 68 de las 103 muestras, con diferente grado de éxito desde muestras que no se amplificaron hasta muestras que funcionaron tan bien como muestras modernas (Fig. 4A). Los microsatélites más cortos funcionaron mejor, y a partir de 225 bases la tasa de éxito decae (Fig. 4B). Este resultado sugiere que el tamaño medio de los fragmentos de ADN antiguo es de ca. 200 nucleótidos. Los perfiles genéticos obtenidos de las muestras herborizadas se compararon con los almacenados en bases de datos internacionales (ICVV y VIVC). En las 32 muestras en las que se obtuvieron mejores resultados se analizaron seis microsatélites adicionales para obtener un perfil de 13 marcadores genéticos y confirmar las identidades obtenidas con el perfil de siete marcadores. Esta tarea permitió identificar con éxito 27 de las muestras herborizadas como variedades conocidas de los Balcanes Occidentales y regiones vecinas. Nueve muestras se identificaron con seis variedades actuales de uva tinta, como Kadarka Kek. Mientras que 18 especímenes correspondieron a 13 variedades de uva blanca. Estos resultados apuntan al cultivo ininterrumpido durante más de 200 años de estas 19 variedades en esa zona.



4. Conclusiones

El estudio de muestras arqueológicas de vid a través de la paleogenómica proporciona información novedosa sobre las prácticas de viticultura en tiempos donde no hay escritos que la describan. La extracción y análisis de ADN antiguo permite analizar marcadores cloroplásticos y dilucidar el origen geográfico de las muestras a través del linaje materno. Adicionalmente, el análisis de marcadores moleculares del genoma nuclear permite identificar qué variedades existían en el pasado, de semillas arqueológicas o de muestras de herbario. Esta identificación revela que algunas variedades se cultivan continuamente desde el siglo XIV o siglo XVI. El análisis conjunto de muestras antiguas y modernas permite establecer posibles relaciones entre ellas, dilucidando la evolución histórica del cultivo en cada región.

5. Bibliografía

1. ALARTE, V. 1712. **Agricultura das vinhas: & tudo o que pertence a ellas até perfeito recolhimento do vinho, e relação das suas virtudes, e da cepa, vides, folhas, e borras.** Lisboa: Na Officina Real Deslandesiana.
2. ALONSO DE HERRERA, G. 1513. **Agricultura general : que trata de la labranza del campo y sus particularidades, crianza de animales, propiedades de las plantas que en ella se contienen, y virtudes provechosas a la salud humana.** Ed: Carlos Sanchez.
3. ARROYO-GARCÍA, R; RUIZ-GARCÍA, L; BOLLING, L; OCETE, R; LÓPEZ, MA; ARNOLD, C; ERGUL, A; SÖYLEMEZOGLU, G; UZUN, HI; CABELLO, F; IBÁÑEZ, J; ARADHYA, MK; ATANASSOV, A; ATANASSOV, I; BALINT, S; CENIS, JL; COSTANTINI, L; GORISLAVETS, S; GRANDO, MS; KLEIN, BY; MCGOVERN, PE; MERDINOGLU, D; PEJIC, I; PELS, F; PRIMIKIRIOS, N; RISOVANNAYA, V; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, KA; SNOUSSI, H; SOTIRI, P; TAMHANKAR, S; THIS, P; TROSHIN, L; MALPICA, JM; LEFORT, F; MARTINEZ-ZAPATER, JM. 2006. **Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms.** *Mol Ecol* 15, 3707-3714.
4. CABEZAS, JA; IBANEZ, J; LIJAVETZKY, D; VELEZ, D; BRAVO, G; RODRIGUEZ, V; CARRENO, I; JERMAKOW, AM; CARRENO, J; RUIZ-GARCIA, L; THOMAS, MR; MARTINEZ-ZAPATER, JM. 2011. **A 48 SNP set for grapevine cultivar identification.** *BMC Plant Biol* 11, 153.
5. DONG, Y; DUAN, S; XIA, Q; LIANG, Z; DONG, X; MARGARYAN, K; MUSAYEV, M; GORYSLAVETS, S; ZDUNIC, G; BERT, PF; LACOMBE, T; MAUL, E; NICK, P; BITSKINASHVILI, K; BISZTRAY, GD; DRORI, E; DE LORENZIS, G; CUNHA, J; POPESCU, CF; ARROYO-GARCIA, R; ARNOLD, C; ERGUL, A; ZHU, Y; MA, C; WANG, S; LIU, S; TANG, L; WANG, C; LI, D; PAN, Y; LI, J; YANG, L; LI, X; XIANG, G; YANG, Z; CHEN, B; DAI, Z; WANG, Y; ARAKELIAN, A; KULIYEV, V; SPOTAR, G; GIROLLET, N; DELROT, S; OLLAT, N; THIS, P; MARCHAL, C; SARAH, G; LAUCOU, V; BACILIERI, R; ROCKEL, F; GUAN, P; JUNG, A; RIEMANN, M; UJMAJURIDZE, L; ZAKALASHVILI, T; MAGHRADZE, D; HOHN, M; JAHNKE, G; KISS, E; DEAK, T; RAHIMI, O; HUBNER, S; GRASSI, F; MERCATI, F; SUNSERI, F; EIRASDIAS, J; DUMITRU, AM; CARRASCO, D; RODRIGUEZ-IZQUIERDO, A; MUNOZ, G; UYSAL, T; OZER, C; KAZAN, K; XU, M; WANG, Y; ZHU, S; LU, J; ZHAO, M; WANG, L; JIU, S; ZHANG, Y; SUN, L; YANG, H; WEISS, E; WANG, S; ZHU, Y; LI, S; SHENG, J; CHEN, W. 2023. **Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution.** *Science* 379, 892-901.
6. EIXIMENIS, F. 1327. **Lo Crestià.**
7. FULTON, TL; SHAPIRO, B. 2019. **Setting Up an Ancient DNA Laboratory.** Springer New York, 1-13.



8. LATORRE, SM; LANG, PLM; BURBANO, HA; GUTAKER, RM. 2020. **Isolation, Library Preparation, and Bioinformatic Analysis of Historical and Ancient Plant DNA**. *Curr Protoc Plant Biol* 5, e20121.
9. LAUCOU, V; LAUNAY, A; BACILIERI, R; LACOMBE, T; ADAM-BLONDON, AF; BERARD, A; CHAUVEAU, A; DE ANDRES, MT; HAUSMANN, L; IBANEZ, J; LE PASLIER, MC; MAGHRADZE, D; MARTINEZ-ZAPATER, JM; MAUL, E; PONNAIAH, M; TOPFER, R; PEROS, JP; BOURSQUOT, JM. 2018. **Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs**. *PLOS ONE* 13, e0192540.
10. MCGOVERN, P; JALABADZE, M; BATIUK, S; CALLAHAN, MP; SMITH, KE; HALL, GR; KVAVADZE, E; MAGHRADZE, D; RUSISHVILI, N; BOUBY, L; FAILLA, O; COLA, G; MARIANI, L; BOARETTO, E; BACILIERI, R; THIS, P; WALES, N; LORDKIPANIDZE, D. 2017. **Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E10309-E10318.
11. MERCATI, F; DE LORENZIS, G; MAUCERI, A; ZERBO, M; BRANCADORO, L; D'ONOFRIO, C; MORCIA, C; BARBAGALLO, MG; BIGNAMI, C; GARDIMAN, M; DE PALMA, L; RUFFA, P; NOVELLO V; CRESPIAN M; SUNSERI F. 2021. **Integrated Bayesian Approaches Shed Light on the Dissemination Routes of the Eurasian Grapevine Germplasm**. *Front Plant Sci* 12, 692661.
12. MEYER, M; KIRCHER, M. 2010. **Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing**. *Cold Spring Harb Protoc* 2010, pdb prot5448.
13. OLIVEIRA, HR; CIVAN, P; MORALES, J; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, A; LISTER, DL; JONES, MK. 2012. **Ancient DNA in archaeological wheat grains: preservation conditions and the study of pre-Hispanic agriculture on the island of Gran Canaria (Spain)**. *J Archaeol Sci* 39, 828-835.
14. RAMOS-MADRIGAL, J; RUNGE, AKW; BOUBY, L; LACOMBE, T; SAMANIEGO CASTRUITA, JA; ADAM-BLONDON, AF; FIGUEIRAL, I; HALLAVANT, C; MARTÍNEZ-ZAPATER, JM; SCHAAL, C; TÖPFER, R; PETERSEN, B; SICHERITZ-PONTÉN, T; THIS, P; BACILIERI, R; GILBERT, MTP; WALES, N. 2019. **Palaeogenomic insights into the origins of French grapevine diversity**. *Nat Plants* 5, 595-603.
15. TABIDZE, V; BARAMIDZE, G; PIPIA, I; GOGNIASHVILI, M; UJMAJURIDZE, L; BERIDZE, T; HERNANDEZ, AG; SCHAAL, B. 2014. **The complete chloroplast DNA sequence of eleven grape cultivars. simultaneous resequencing methodology**. *OENO ONE* 48, 99-109.
16. THIS, P; LACOMBE, T; THOMAS, MR. 2006. **Historical origins and genetic diversity of wine grapes**. *Trends Genet* 22, 511-519.

6. Agradecimientos

Este trabajo forma parte de varios proyectos de investigación que han financiado su realización. El proyecto del plan nacional MI-PLANTS, el proyecto de la Generalitat Valenciana FRUITCOM. Además, el Ministerio de Agricultura, Forestales, y Manejo del Agua de la República de Serbia financió el estudio del herbario de Sremski Karlovci. La estancia de Carolina Royo en el grupo de Detlef Weigel en el MPI de Biología y la Universidad de Tübingen fue financiada por la COST Action 17111.

Agradecemos a Terry Brown de la Universidad de Manchester, Nathan Wales de la Universidad de York y Cosimo Posth de la Universidad de Tübingen por permitir el uso de salas blancas para la extracción de ADN antiguo y preparación de éste para la secuenciación. Gracias a Konstantina Drosou por sus consejos y apoyo en el laboratorio y en el análisis de secuencias.

Comportamiento agronómico y enológico de la variedad minoritaria Bruñal en dos portainjertos en la D.O. Arribes

José Antonio Rubio Cano*, Alberto Martín, Isabel Andrés, Maroua Dchraoui, Enrique Barajas

Unidad de Cultivos Leñosos. Inst. Tecnológico Agrario de Castilla y León. Ctra. Burgos km 119. 47071 Valladolid.
*Tfno. 983 317452. *E-mail: rubcanjo@itacyl.es

Resumen

Se ha localizado una amplia población de cepas de la variedad tinta Bruñal (sinonimias: Albarín Tinto y Baboso Tinto) en viñedos viejos de la D.O. Arribes (Zamora y Salamanca). Los vinos elaborados con esta variedad se caracterizan por su buena estructura y color, armonía y buenas cualidades para envejecimiento en barrica, con aromas complejos de frutos rojos y negros, balsámicos y minerales de marcada personalidad.

El objetivo de este trabajo es conocer la aptitud agronómica y enológica de la variedad minoritaria Bruñal en dos portainjertos, 110-R y 3309-C en la DO Arribes. El estudio se llevó a cabo en periodo 2014-2019 en un ensayo ubicado en la localidad de Villarino de los Aires (Sa). Las cepas han sido conducidas en espaldera, orientación NNE-SSO y formación en cordón Royat bilateral. El suelo del ensayo, característico de la D.O. Arribes, es ligeramente ácido, poco profundo, con textura franco-arenosa y bajo en materia orgánica.

Se determinaron parámetros de desarrollo vegetativo (madera de poda, número de sarmientos y peso del sarmiento), de producción de uva (rendimiento, número de racimos y peso de baya) y de calidad de la uva (concentración de azúcares, acidez titulable, pH y potasio).

Los resultados muestran que el portainjerto 3309 C es ligeramente más productivo que el 110-R, mostrando mayor número de racimos por cepa y mayor rendimiento. En cambio, el desarrollo vegetativo de 110-R indica que es más vigoroso que el 3309-C, con mayor peso de madera de poda y del sarmiento. Los parámetros de calidad de la uva indicaron que el portainjerto 3309-C alcanza un grado alcohólico probable y una acidez total superior al 110-R. Según los resultados, el portainjerto 3309-C ha mostrado mejor comportamiento en suelo ligeramente ácido al mostrar mejor equilibrio vegetativo y productivo con una buena calidad de la uva.

1. Introducción

El Instituto Tecnológico Agrario de Castilla León (ITACyL) llevó a cabo desde el año 2002 trabajos de prospección y recuperación de posibles variedades minoritarias y locales que abarcaron gran parte de las zonas vitivinícolas de Castilla y León. Como fruto de estos trabajos de prospección, identificación y caracterización, se logró identificar un conjunto de variedades minoritarias con interés agronómico y enológico en Las Arribes del Duero (Rubio *et al.*, 2005).

Entre ellas se encontraba la variedad Bruñal, con racimo pequeño y apretado, baya pequeña, con el hollejo grueso, y a priori con unas características de la uva muy interesantes, con buen contenido de azúcares, notable acidez, intenso color y alto contenido en antocianos y



polifenoles. Estas características se han confirmado tras la elaboración de diversos vinos monovarietales, manteniendo buena estructura e intenso color, gran equilibrio, potencia, y con claras posibilidades para envejecimiento en bodega. Además, presentan aromas distintos y propios, con una personalidad bien marcada. (Pérez-Magariño *et al.*, 2022).

A partir de la caracterización llevada a cabo desde el ITACyL, se constató que era una variedad claramente reconocida por viticultores de la comarca vitivinícola de Las Arribes del Duero, y que también era conocida en otras zonas con distintas sinonimias. Tras la evaluación de la OEVV, la variedad Bruñal fue registrada (BOE, 2011) y recogida en el Registro de Variedades Comerciales de España con el nombre de Bruñal, con dos sinonimias oficiales: Albarín Tinto y Baboso Tinto. También está presente en Portugal, como Alfrocheiro, en las Denominaciones de Origen Controladas “Alentejo”, “Bairrada” y “Dao” (www.ivv-min-agricultura.pt).

Con la dispersión que presenta y sus diferentes sinonimias, el origen de la variedad Bruñal es difícil de precisar con exactitud. García de los Salmones (1914) indicó su presencia como Bruñal en Salamanca, y cita Albarín en Lugo y Asturias, y Alvarín en Pontevedra. Santana (2011) indica la relación filogenética de Bruñal como parental de Gajo Arroba, y la relación como hermanos completos entre Bruñal y Prieto Picudo. Además, (Santana *et al.*, 2010) encontraron una relación genéticamente muy próxima entre Bruñal y Estaladiña.

Cunha *et al.* (2015) confirman que entre la progenie de los parentales Alfrocheiro y Cayetana Blanca se encuentran Gajo Arroba y Juan García, y que Alfrocheiro y Patorra son los parentales de Mencía. Santana (2011) sugirió la participación de Bruñal en la génesis de algunas variedades del noroeste de la Península Ibérica, aspecto que corroboraron Cunha *et al.* (2015). Los datos aportados por los investigadores citados confirman algunas citas históricas (Lobo, 1790, citado por Cunha *et al.*, 2015) indicando un origen ibérico (Santana, 2011; Cunha *et al.*, 2015). La variedad ya ha sido autorizada en la DO Arribes (noroeste de Salamanca y suroeste de Zamora), y además está presente con pequeña superficie de cultivo en varias DDOO de las Islas Canarias como Baboso Negro (Cabello *et al.*, 2011) y como Albarín Negro en Asturias (www.docangas.es).

Cabello *et al.* (2011) confirman que se está potenciando su cultivo en Asturias, Galicia, Castilla y León y Canarias, y ensayando en Madrid y Castilla La Mancha, por lo que, con su interesante potencial enológico, estos autores indican que podría en un futuro llegar a sustituir a Cabernet Sauvignon en algunas mezclas con Tempranillo para aportar acidez.

La expansión en menor ó mayor medida de esta variedad minoritaria en los próximos años requiere en lo posible por un lado contar con material vegetal de garantía sanitaria y cualitativa, y, por otro lado, conocer su comportamiento y adaptación a distintos portainjertos, aspectos que en el caso de variedades locales ó minoritarias apenas se conocen. En el caso del material vegetal, se dispone de diversos clones certificados de Bruñal, con origen en viñedos viejos de la comarca de Las Arribes del Duero y que pueden ser distribuidos al sector viverístico (CL-27; CL-54; CL-89; CL-92; CL-93; CL-95; CL-96; CL122; CL-291; CL-819).

Por otro lado, puesto que la variedad Bruñal se localizó en la comarca vitivinícola de Las Arribes del Duero y algunas de sus zonas de expansión presentan también suelos ácidos, se planteó el interés de estudiar la adaptación de esta variedad sobre dos portainjertos: un portainjerto con buena adaptación a suelos ácidos, 3309 Couderc, y uno de los portainjertos más utilizados en la viticultura española, 110 Richter.



El portainjerto 110 Richter (*Vitis berlandieri* Resseguier nº 2) x (*Vitis rupestris* Martín) es un portainjerto que tiene buena resistencia filoxérica, una adaptación satisfactoria a terrenos calizos, pedregosos ó no, y es un portainjerto rústico y bastante vigoroso (Marcilla, 1954; citado por Cabello *et al.*, 2011). Es el más utilizado en la viticultura española, llega a resistir el 17% de caliza activa, es muy resistente a sequía, sensible al exceso de humedad, y retrasa la maduración (Cabello *et al.*, 2011). 3309 Couderc (*Vitis riparia* Tomentosa x *Vitis rupestris* Martín), resiste 11% de caliza activa, es poco resistente a sequía y al exceso de humedad en el suelo, poco resistente a nemátodos y adelanta la maduración (Cabello *et al.*, 2011). Se adapta bien a terrenos sueltos, no le convienen terrenos muy secos, su resistencia filoxérica es muy satisfactoria, y su afinidad es muy satisfactoria con muchas viníferas, pudiendo dar con ellas fructificación bastante abundante y regular (Marcilla, 1954; citado por Cabello *et al.*, 2011).

El objetivo del presente trabajo es conocer la interacción y adaptación de una variedad minoritaria reconocida legalmente hace unos años, Bruñal, mediante el estudio de su aptitud agronómica y enológica sobre dos portainjertos, 110 Richter y 3309 Couderc, en la DO Arribes.

2. Material y Métodos

El estudio se realizó durante 6 años, desde 2014 hasta 2019. Los trabajos se realizaron en un viñedo experimental (Finca "Las Bozas") perteneciente al Ayuntamiento de Villarino de los Aires (Salamanca), a una altitud de 622 metros. (41°16'22''N - 6°23'58''O), en la DO Arribes. El suelo del ensayo es un *Cambisol eútrico*, siendo representativo de los suelos de la comarca. Tiene un pH de 6,45, poca materia orgánica (0,75 %) y textura franco-arenosa. En cuanto a la orientación de la parcela de viñedo, éste está situado en una ladera pronunciada con exposición totalmente sur, con orientación de las filas de cepas NNE-SSO.

El material vegetal utilizado fueron cepas de la variedad de vid Bruñal, (*Vitis vinifera* L.), en concreto de 5 clones certificables, injertadas sobre 110 Richter y 3309 Couderc, plantadas en 2005. Se trata de cepas con un sistema de conducción apoyado vertical, en espaldera, y con el sistema de poda corta cordón Royat bilateral, con 16 yemas/cepa (8 pulgares de 2 yemas por brazo). El marco de plantación fue 2,5 x 1,5 m, que supone una densidad de 2.666 plantas/ha. El diseño experimental contó con 5 parcelas elementales de 10 plantas en cada portainjerto distribuidas al azar, con 6 repeticiones en total por cada tratamiento que corresponden con los 6 años de estudio. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) con el programa Statgraphics Centurion 17.2.

Los parámetros que hacen referencia a la producción y al rendimiento fueron el número de racimos por cepa, la producción, el peso del racimo, el peso de la baya, la fertilidad y el índice de Ravaz. En el caso del control del desarrollo vegetativo, se tomaron los datos de número de sarmientos por cepa, el peso de madera de poda y el vigor del sarmiento. La calidad de la uva se determinó a partir de la concentración de azúcares (°Brix), el pH, la acidez total, el ácido málico, el ácido tartárico, el potasio y el índice de polifenoles en mosto (IPT, medida de la absorbancia del mosto a 280 nm) de las plantas de cada portainjerto en el momento de la vendimia.

Se vendimiaron las cepas de ambos portainjertos al mismo tiempo. La vendimia se realizó cada año cuando los dos portainjertos llegaron al mínimo del entorno de 22 °Brix, independientemente de que el otro lo hubiera sobrepasado.



3. Resultados

Los datos de temperatura media y precipitación en el entorno del viñedo experimental se muestran en la **Tabla 1**. Destaca el año 2017 con temperaturas medias más altas entre febrero y junio, que en conjunto hicieron de ese año el de temperatura media marcadamente más alta de los años de estudio. Las precipitaciones anuales fueron acordes a la zona excepto en 2015 y 2017, años con precipitaciones en torno a la mitad de lo habitual. La zona donde se ubica el ensayo está marcada por el relieve, con inviernos fríos y veranos muy calurosos y largos, ya que en las laderas y valles de las Arribes del Duero se alcanzan temperaturas elevadas que superan en unos 5 °C a las de la penillanura, en que el régimen térmico es semejante al del resto de la cuenca, con inviernos fríos y largos y veranos cortos y calurosos (www.doarribes.es).

Tabla 1. Temperatura media, TM (°C) y precipitación, P (mm) de los años 2014 a 2019, con datos de la estación meteorológica automática de Villarino de los Aires (Sa).

	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Año
TM 2014	7,3	6,3	8,1	13,4	15,1	18,8	22,0	21,8	19,6	14,4	9,9	5,3	13,5
TM 2015	4,7	4,8	8,5	11,8	16,8	21,8	24,6	22,2	18	14,2	10,3	7,9	13,3
TM 2016	8,1	7,1	7,7	10,2	14,1	19,9	24,8	24,3	20,7	15,5	8,7	6,1	13,9
TM 2017	5,3	8,6	10,4	14,2	17,7	23,3	23,4	23,5	19,5	17,9	9,5	6,2	15
TM 2018	6,5	5,4	7,2	11,8	15,2	19,4	22	24,7	22,9	14,5	9,1	7,6	13,9
TM 2019	5,4	8,7	10,6	11,2	16,2	18,6	23,4	23	19,6	15,1	9,2	7,6	14,1
P 2014	N/A	N/A	N/A	N/A	32	23,8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	34,8	N/A
P 2015	22,9	5,7	9,1	5,6	6,3	58,7	0,2	1,2	87,4	34,6	13	21,4	266
P 2016	154	64,8	46,2	149	71,6	4	0	4,8	0	76,4	71,4	28,2	516
P 2017	20,4	80	18,4	11,8	59,2	12,6	8,4	4,4	0	12,4	29,6	72,4	330
P 2018	30	52,6	169	70	47	69,6	10,2	0	5,2	26,2	126	34,4	610
P 2019	20,6	16	31,4	114	2,4	43	41,2	19,6	23,2	81,8	98,8	49,2	541

El suelo de la parcela, ligeramente ácido, poco profundo, suelto y poco fértil, junto al régimen de temperaturas y de precipitaciones irregulares en junio y escasas en julio, agosto y septiembre han sometido a las plantas a condiciones duras de aridez y de severo estrés hídrico, que limita el crecimiento vegetativo. Estas condiciones marcan las respuestas de ambos portainjertos, con una presión muy fuerte del entorno durante el ciclo vegetativo de las cepas.

Es importante indicar que a priori y a la vista del estado de las plantas en el ensayo durante un periodo dilatado de estudio, y con condiciones ambientales de cultivo exigentes, la afinidad entre la variedad Bruñal y ambos portainjertos, 110-R y 3309-C, es adecuada, no se ha apreciado ningún problema vegetativo a lo largo de los años de toma de datos.

Con estas premisas, los parámetros productivos (**Tabla 2**) expresan tendencias claras entre los dos portainjertos. Las plantas de Bruñal sobre el portainjerto 110-R mantienen valores de



los parámetros vegetativos algo superiores a los de 3309-C, mientras que éste portainjerto mantiene valores más altos en los parámetros productivos, destacando el mayor número de racimos por cepa, con diferencias significativas. Estas diferencias significativas también se producen en el rendimiento, relacionadas directamente con el número de racimos, ya que no hay diferencias apreciables en el peso del racimo ni en el peso de la baya. Estas tendencias coinciden con los datos que indicaron Barajas *et al.* (2019), en el caso de los mismos portainjertos con la variedad blanca Puesta en Cruz (Rabigato) en la misma ubicación.

En el caso de Bruñal sobre el portainjerto 110-R, los datos de desarrollo vegetativo obtenidos en este ensayo son algo menores que los obtenidos por Yuste *et al.* (2016) en un ensayo en Valladolid, con un suelo más profundo y una textura más equilibrada entre sus componentes, además de la aplicación de riego deficitario.

El número de racimos por cepa que alcanza Bruñal sobre 3309-C es alto, lo que repercute en una fertilidad muy alta, aspecto que refleja la interacción de una variedad de por sí fértil, como es Bruñal, con un portainjerto que también tiene tendencia a dar conseguir una fructificación abundante y regular (Marcilla, 1954, citado por Cabello *et al.*, 2011). La fertilidad y el rendimiento que alcanza en el portainjerto 110-R en el ensayo de Villarino (**Tabla 2**) son ligeramente más bajas que las obtenidas por Yuste *et al.* (2016) en Valladolid, aunque depende en este último ensayo del clon de Bruñal estudiado.

Tabla 2. Valores medios de 2015-2018 de los parámetros: número de racimos por cepa; peso del racimo; peso de baya; rendimiento en uva, número de sarmientos por cepa; peso del sarmiento; Índice de Ravaz y Fertilidad, de Bruñal sobre 110 Richter y sobre 3309 Couderc. Nivel de significación estadística (Sign): ns = no significativo, *=p<0,05, **p<0,01.

Portainjerto	N Rac	P Rac (g)	P Bay (g)	Rdto (Kg/ha)	N Sar	P sar (g)	I Ravaz	Fertilidad (rac/sarm)
110 Richter	21,4	87,2	0,96	5.170	14,3	30,7	4,51	1,51
3309 Couderc	24,6	94,1	1,11	6.275	13,7	27,9	6,19	1,82
Sign	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns

El fuerte estrés en las plantas que induce la situación de la parcela y el escaso suelo produce un desarrollo vegetativo limitado, pero no en tanto en producción de fruto, por lo que el índice de Ravaz alcanza niveles aceptables y con valores apreciables teniendo en cuenta la presión de clima y suelo. Aunque el índice de Ravaz es mayor en las plantas del portainjerto 3039-C, en el caso de las plantas sobre 110-R también es apreciable, aspecto que puede indicar su adaptación de Bruñal a la zona y a condiciones futuras (Rubio *et al.*, 2018). Además, esa adaptación de Bruñal parece ser satisfactoria en ambos portainjertos. Parece que ambos portainjertos han suplido sus desventajas: el 110-R está mejor adaptado a suelos calcáreos, pero parece que se ha adaptado a un suelo ligeramente ácido obteniendo resultados aceptables, aprovechando al máximo su capacidad de adaptación a suelos secos; el 3309-C se adaptaría mejor a suelo ácido, y ha aprovechado al máximo esa cualidad, pero ha extremado su adaptación a un suelo seco y pobre.



En cuanto a calidad de la uva (**Tabla 3**), el portainjerto 3309-C cumple con su característica de adelantar la maduración (Cabello *et al.*, 2011), ya que en la misma fecha de vendimia obtiene diferencias significativas en la acumulación de azúcares respecto a 110-R, teniendo en cuenta su mayor rendimiento en uva, y además con tendencia a mantener a la vez una acidez total mayor, aunque sin marcar diferencias significativas, coincidiendo con los resultados de Barajas *et al.* (2019) con la variedad Puesta en Cruz.

Tabla 3. Valores medios de 2014-2019 de los parámetros: sólidos solubles totales; pH; acidez total, ácido málico, ácido tartárico, concentración de potasio e índice de polifenoles totales, de Bruñal sobre 110 Richter y sobre 3309 Couderc. Nivel de significación estadística (Sign): ns = no significativo, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$.

Variedad	S.S.T. (° Brix)	pH	Ac. Total (g/L A. Tart.)	A. Málico (g/L)	A. Tartárico (g/L)	Potasio (mg/l)	IPT
110 Richter	22,1	3,83	3,86	1,71	5,75	1.935	19,1
3309 Couderc	24,0	3,68	4,13	1,60	5,80	1.813	18,2
Sign	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Los resultados en cuanto a la concentración de azúcares de Bruñal sobre 110-R en la DO Arribes son claramente más altos que con el mismo portainjerto 110-R en Valladolid (Arranz *et al.*, 2014; Yuste *et al.*, 2016), por lo que se ha de atender con precaución el comportamiento de la variedad Bruñal sobre portainjertos vigorosos en zonas más frescas que el entorno de la DO Arribes.

Finalmente, los resultados muestran que la variedad minoritaria Bruñal puede adaptarse bien tanto en su combinación con 110 Richter como sobre 3309 Couderc, sin ningún problema de afinidad pues en condiciones exigentes y sin mantener las condiciones más favorables para cada portainjerto y en combinación con la variedad en el ensayo de la DO Arribes, ambos han resistido y se han adaptado a las exigentes condiciones edafoclimáticas, con rendimientos similares a otras zonas más frescas y con mejor suelo. En este aspecto, de debe razonar bien y afinar mucho el lugar y la parcela donde se plante la variedad Bruñal con portainjertos vigorosos en zonas vitivinícolas más frescas y con suelos más profundos que los característicos de la D.O. Arribes, especialmente en el aspecto de la maduración de la uva, que es más lenta y con el riesgo de no llegar a completarla satisfactoriamente. En esas situaciones, con terrenos más fértiles y húmedos, la adaptación de Bruñal con 3309 Couderc seguramente sea más satisfactoria.

4. Conclusiones

El portainjerto 3309-C mantiene valores más altos en los componentes del rendimiento y resultando más productivo que el 110-R, con mayor número de racimos por cepa y mayor rendimiento en uva, con diferencias significativas. Es superior en el resto de componentes del rendimiento, aunque sin diferencias significativas.



El portainjerto 110-R ha mostrado valores mayores en los parámetros de desarrollo vegetativo, resultado ser ligeramente más vigoroso que el 3309-C mostrando mayor peso de la madera de poda y el peso del sarmiento aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

En el aspecto de calidad de la uva, el portainjerto 3309-C ha adelantado la acumulación de azúcares respecto al patrón 110 Richter de manera significativa, y con mayor contenido de acidez total, combinando esta maduración con mayor rendimiento, siendo el resto de parámetros de calidad de la uva bastante cercanos en ambos portainjertos.

Finalmente, los dos portainjertos, 110 Richter y 3309 Couderc en combinación con Bruñal han mostrado un buen comportamiento en suelo ligeramente ácido, suelto y poco profundo, característico de las laderas en la DO Arribes. Además, ambos patrones muestran una afinidad adecuada con la variedad. El equilibrio vegetativo y productivo con una buena calidad de la uva ha sido ligeramente mejor con 3309 Couderc.

5. Bibliografía

1. ARRANZ, C.; RODRÍGUEZ, D.; YUSTE, J.; BARAJAS, E.; RUBIO, J.A. 2014. **Caracterización y comparación de 6 variedades minoritarias, próximas entre sí filogenéticamente, del oeste de Castilla y León**. 28ª Reunión del G.T.E.V.E (2013). Murcia. Centro de Publicaciones. MAPA. Madrid. I.S.B.N.: 978-84-491-1382-6.
2. BARAJAS, E.; ANDRÉS, M^a.I.; VÉLEZ, S.; MARTÍN, A.; RUBIO, J.A. 2019. **Comportamiento agronómico y enológico de la variedad minoritaria Puesta en Cruz en dos portainjertos en la D.O. Arribes**. XVIII Congreso Nacional de Enólogos. Palencia, 4-6 de abril de 2019.
3. B.O.E. 2011. Orden ARM/624/2011. (B.O.E. 24 marzo 2011). Ministerio de Presidencia. Madrid.
4. CABELLO, F.; Ortiz, J.M.; Muñoz, G.; Rodríguez, I.; Benito, A.; Rubio, C.; García, S.; Sáiz, R. 2011. **Varietades de vid en España**. Editorial Agrícola Española, S.A. Madrid. I.S.B.N.: 978-84-92928-13-2.
5. CUNHA, J.; ZINELABIDINE, L.H.; TEIXEIRA-SANTOS, M.; BRAZÃO, J.; FEVEREIRO, P.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; IBÁÑEZ, J.; EIRAS-DIAS, E. 2015. **Grapevine cultivar 'Alfrocheiro' or 'Bruñal' plays a primary role in the relationship among Iberian grapevines**. Vitis 54 (Special Issue): 59-65.
6. GARCÍA DE LOS SALMONES, N. 1914. **Memoria General de las Sesiones del Congreso y Ponencias Presentadas**. C. N. de Viticultura, Pamplona. Imprenta Provincial. Pp. 521-524.
7. PÉREZ-MAGARIÑO, S.; BUENO, M.; CURIEL, M.; CANO, E.; MARTÍN-BAZ, A.; BARAJAS, E.; RUBIO, J.A. 2022. **Caracterización enológica de vinos tintos elaborados con variedades minoritarias de Castilla y León**. XV Congreso Nacional de Investigación Enológica-Gienol 22. Murcia, 23-26 mayo, 2022.
8. RUBIO, J.A.; GARCÍA, A.; ANDRÉS, M^a.I.; BARAJAS, E. 2018. **Caracterización preliminar agronómica y enológica de 6 variedades minoritarias de vid en Arribes del Duero**. 32ª Reunión del G.T.E.V.E. (2017), en Valladolid. Centro de Publicaciones. MAPA. Madrid. ISBN: 978-84-491-1505-9.
9. RUBIO, J.A.; YUSTE, J.; ARRANZ, C.; MARTÍN, J.P.; ORTIZ, J.M. 2005. **Varietades autóctonas de vid de Arribes del Duero: descripción y sinonimias**. Vitic. y Enología Profesional, 99: 5-17.



10. SANTANA, J.C. 2011. **Identificación genética, estructura y orígenes de las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en Castilla y León.** Tesis Doctoral. ETSIA Palencia. U. Valladolid. 192 pp.
11. SANTANA, J.C. 2011. **Identificación genética, estructura y orígenes de las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en Castilla y León.** Tesis Doctoral. ETSIA Palencia. U. Valladolid. 192 pp.
12. SANTANA, J.C.; HEUERTZ, M.; ARRANZ, C.; RUBIO, J.A.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; HIDALGO, E. 2010. **Genetic structure, origins, and relationships of grapevine cultivars from the Castilian Plateau of Spain.** Am. J. Enol. Vitic. 61 (2): 214-224.
13. YUSTE, J.; ARRANZ, C.; BARAJAS, E.; RUBIO, J.A. 2016. **Comparación preliminar, agronómica y cualitativa, de 3 clones preseleccionados de la variedad tinta Bruñal, en Valladolid, durante el periodo 2012-2014.** 30^a Reunión del G.T.E.V.E. (2015). Zalla, (Vizcaya). Centro de Publicaciones. MAPA. Madrid. ISBN: 978-84-491-1450-2.
14. www.doarribes.es
15. www.docangas.es
16. www.ivv-min-agricultura.pt

6. Agradecimientos

La elaboración de este trabajo ha sido posible por la aportación de proyectos financiados con fondos de la Junta de Castilla y León, fondos FEADER (proyecto VarMinVid del PDR de Castilla y León), con la colaboración de los compañeros de la Estación Enológica del ITACyL y del Grupo de Viticultura, y con la colaboración del Ayto. de Villarino de los Aires (Salamanca).

Efecto combinado del riego y la aplicación de pizarra como mulch inorgánico en la variedad Mencía (Galicia)

Mar Vilanova^{1,3}, María Fandiño², Bianca S. Costa¹, Marta Rodríguez-Febreiro², Javier J. Cancela^{2,3}

¹ Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC-Universidad de La Rioja-Gobierno de La Rioja, Logroño

² GI-1716. PROePLA. Escuela Politécnica Superior de Enxeñaría. Universidade de Santiago de Compostela, Lugo

³ CropQuality: Estrés en cultivos y sus efectos en la calidad (USC), Unidad Asociada al ICVV-CSIC

Resumen

El manejo de la cubierta vegetal en el viñedo requiere técnicas sostenibles que faciliten su control. Los restos de pizarra tienen propiedades físicas que mejoran el aislamiento térmico e impermeabilidad, pudiendo ser útil para el control de malas hierbas y evitar la evaporación del agua en el suelo. El estudio se desarrolló en un viñedo comercial de la variedad Mencía conducido en espaldera (Quiroga, Lugo). En las cosechas 2021-2022 se realizó un tratamiento de riego por goteo diario (T1), a partir de tamaño guisante (30 % de la ET_o) así como un tratamiento seco (T0), ambos en presencia de pizarra en la línea (T1SM-T0SM), frente a suelo desnudo. Cuando a T1 se le aplicó pizarra (T1SM), se observó un descenso en los parámetros de maduración en ambas campañas. En el caso de T0 sucede lo contrario, ya que cuando se aplica pizarra en la línea (T0SM), se produce una mayor maduración respecto a T0. A nivel de metabolitos secundarios se observó un incremento de la concentración de la fracción libre al aplicar pizarra en ambos tratamientos de riego (T0SM y T1SM), aunque sólo en la campaña 2022, más seca y calurosa. Por último, en la fracción glicosilada el incremento se observó en T0SM vs T0 para ambas campañas de estudio.

1. Introducción

El “mulching” o acolchado es una técnica agrícola que consiste en la cobertura de los suelos a través de un material orgánico o inorgánico con alguno de los siguientes objetivos: reducir la evaporación del agua en el suelo, la compactación a través de elementos naturales de los suelos, inhibir el crecimiento de hierbas no deseadas, o favorecer el contenido de materia orgánica y la microbiología del suelo.

El acolchado inorgánico a base de grava se ha estudiado en Suiza, EE. UU. y China, en viñedos y frutales. Esta técnica se enfocó a la conservación del agua de lluvia (Gale et al., 1993; Li, 2003), evitar la erosión y aumentar la temperatura y contenido de agua del suelo (Nachtergaele et al., 1998), con el objetivo final de mejorar la calidad de la uva.

En Galicia se extrae, elabora y transforma una roca imprescindible para la construcción: la pizarra. El sector pizarrero español es el mayor suministrador de este mineral a nivel mundial, por delante de China y Brasil convirtiéndose en una industria fundamental para la economía gallega. Sin embargo, los residuos de esta industria suponen un grave problema aún sin resolver.



Dadas sus características de durabilidad, aislamiento térmico e impermeabilidad de este material, se ha planteado aplicar restos de pizarra en la línea del viñedo con el objetivo de controlar la vegetación y la evaporación de agua del suelo, determinando su impacto sobre calidad de la variedad Mencía.

2. Material y Métodos

El estudio se realizó en un viñedo comercial de la variedad Mencía, situado en Quiroga (Lugo), conducido en espaldera. Durante los años 2021-2022 se realizó un tratamiento de riego por goteo diario (T1), a partir de tamaño guisante, cubriendo el 30 % de la ET_0 , así como un tratamiento secano (T0), ambos en presencia de pizarra en la línea (T1SM-T0SM) frente a suelo desnudo. El sistema de riego contó con goteros de 2 L h⁻¹, situados a ambos lados de la planta. Cada tratamiento consta de cuatro repeticiones al azar con 7 plantas control. Para realizar el seguimiento del contenido de agua en el suelo, se emplearon sondas TDR, a la profundidad de 60 cm, evaluando así la aplicación de riego realizada.

Tras la vendimia se tomaron muestras de uva con el objetivo de realizar un estudio del efecto combinado de ambos factores (riego y pizarra) sobre la calidad de la uva. Los mostos se analizaron para los parámetros físico-químicos clásicos, siguiendo los métodos propuestos por la OIV. También se realizó un estudio a nivel de metabolitos secundarios responsables del aroma en sus fracciones libre y glicosilada mediante GC-MS (Oliveira y col. 2008; Vilanova et al., 2019). Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y análisis de componentes principales utilizando el paquete estadístico XLSTAT (Adinsoft, Paris).



Fig. 1. Viñedo comercial de la variedad Mencía con aplicación de Pizarra y Riego. (Quiroga, Lugo)



3. Resultados

3.1. Parámetros físico-químicos de los mostos

Los resultados sobre la influencia de restos de pizarra en la línea de cepas y bajo diferentes estrategias de riego en la calidad de la uva, para los dos años de estudio (2021-2022), muestran tendencias en la maduración, así como en su composición química. (**Tabla 1**).

Como se puede observar en la **Tabla 1**, en el año 2022 los mostos mostraron un mayor °Brix en todos los tratamientos frente al año 2021 con fechas de vendimia de 21 y 23 de septiembre respectivamente. El clima de Quiroga es un clima cálido con noches frescas y moderadamente seco. Las condiciones climáticas en los años de estudio fueron muy diferentes ya que el año 2021 fue más lluvioso con una pluviometría anual de 842 mm frente a 445 mm en el año 2022. Por otra parte, la integral térmica eficaz fue de 1617 °C y 2017 °C en los años 2021 y 2022, respectivamente.

Cuando analizamos el efecto del tratamiento, observamos que en el tratamiento T1 con pizarra (T1SM) existe una tendencia al descenso en los parámetros de maduración en ambas cosechas (descenso de concentración de azúcares e incremento de la acidez total y el pH). En los tratamientos de secano se producen los mismos cambios, pero únicamente en el año 2021, sin embargo, sucede lo contrario en el año 2022, ya que cuando se aplica pizarra en la línea (T0SM) se produce una mayor maduración respecto a T0. Las condiciones climáticas del año 2022, más seco y caluroso, han propiciado estos cambios en la maduración de la uva, en especial en los tratamientos no regados.

A nivel de índice de polifenoles totales (IPT) se observó una tendencia al incremento en T0SM respecto a T0 en el año 2021, sin embargo, esta tendencia cambia en el año 2022, en el que el índice IPT aumentó en T0 vs T0SM. Esta última tendencia también se produce en T1 vs T1SM, en las dos campañas de estudio.

Tabla 1. Composición química de la uva Mencía en función de los tratamientos aplicados (riego y pizarra) en las campañas 2021-2022

Parámetros	Año 2021				Año 2022			
	T0	T0SM	T1	T1SM	T0	T0SM	T1	T1SM
Brix	22,17	22,00	21,83	21,25	24,00	24,63	24,27	23,83
pH	3,44	3,44	3,44	3,50	3,52	3,51	3,55	3,60
Acidez total (g/l)	4,10	3,73	3,87	3,90	4,08	4,25	3,80	4,48
Acido tartárico (g/l)	3,26	2,67	3,16	3,20	2,31	2,37	2,43	2,17
Acido cítrico (g/l)	0,16	0,15	0,15	0,16	0,32	0,32	0,24	0,43
Acido málico (g/l)	0,84	0,74	1,00	1,05	0,53	0,59	0,64	1,00
IPT	12,00	12,93	13,70	12,60	11,97	10,43	12,00	10,53
YAN (mg/l)	126,33	91,75	111,33	126,50	128,67	134,00	130,67	141,50
FAN (mg/l)	72,33	54,75	69,33	80,50	77,00	79,00	81,33	89,50
N amoniacal (mg/l)	53,67	37,00	42,00	45,75	51,67	55,25	49,33	52,00



3.2. Composición volátil de los mostos

A nivel de concentración total de metabolitos secundarios responsables del aroma, suma de fracciones libre y glicosilada, los resultados muestran una mayor concentración total en el año 2021 frente al 2022 en todos los tratamientos (**Fig.2**).

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los años de estudio, pero si se observaron tendencias. En el año 2021 se observó una tendencia a mayores concentraciones en ambos tratamientos de riego cuando no se aplicó pizarra en la línea de plantas (T0 y T1). Sin embargo, en el año 2022 la aplicación de pizarra en la línea incrementó la concentración total en ambos tratamientos de riego T0SM y T1SM frente a los controles T0 y T1.

Además, también se observó una tendencia a mayores concentraciones en los tratamientos de riego frente al secano independientemente de la pizarra, sobre todo en el año 2022 que fue el año más seco.

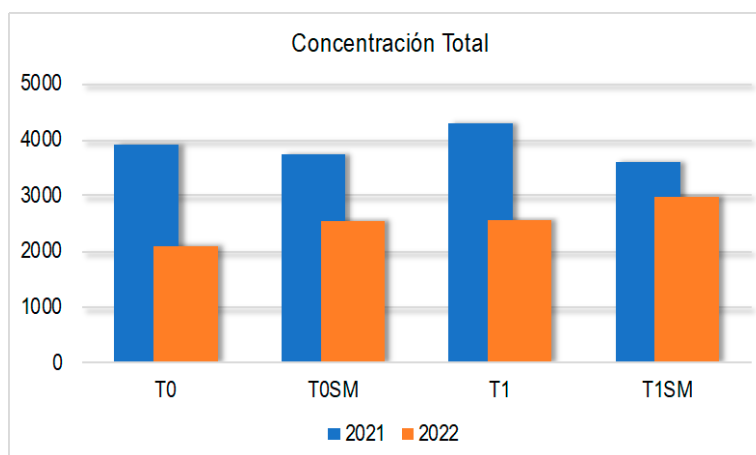


Fig. 2. Concentración volátil total ($\mu\text{g/L}$) en mostos de la variedad Mencía en función de los tratamientos aplicados (riego y pizarra) en las campañas 2021-2022

A nivel de fracciones de metabolitos secundarios responsables del aroma, los resultados no mostraron diferencias significativas entre tratamientos para ninguna de las fracciones analizadas (libre y glicosilada) en ninguno de los años de estudio, sin embargo, se observaron tendencias (**Fig. 3**).

Para la fracción libre se observó una tendencia al incremento de la concentración total en los tratamientos en los que se aplicó pizarra (T0SM y T1SM) frente a los controles (T0 y T1) pero esta tendencia únicamente se produjo en el año 2022, el año más seco y cálido, alcanzando el mayor valor el tratamiento regado y con pizarra (T1SM). En el año 2021 la fracción libre se vio afectada por el tratamiento de riego, mostrando una tendencia al incremento de la concentración en los tratamientos regados (T1 y T1SM) frente a sus tratamientos homólogos en secano (T0 y T0SM, respectivamente).



Con respecto a la fracción glicosilada, en el año 2022 se observó la misma tendencia que en la fracción libre, incrementándose la concentración en los tratamientos en los que se aplicó pizarra (T0SM y T1SM) frente a los controles (T0 y T1). Además, al igual que en la fracción libre, se alcanzó valor mayor en el tratamiento regado y con pizarra en la línea (T1SM). En el año 2021, más lluvioso y frío, la mayor concentración de la fracción glicosilada se observó en el tratamiento de secano con aplicación de pizarra en la línea (T0SM).

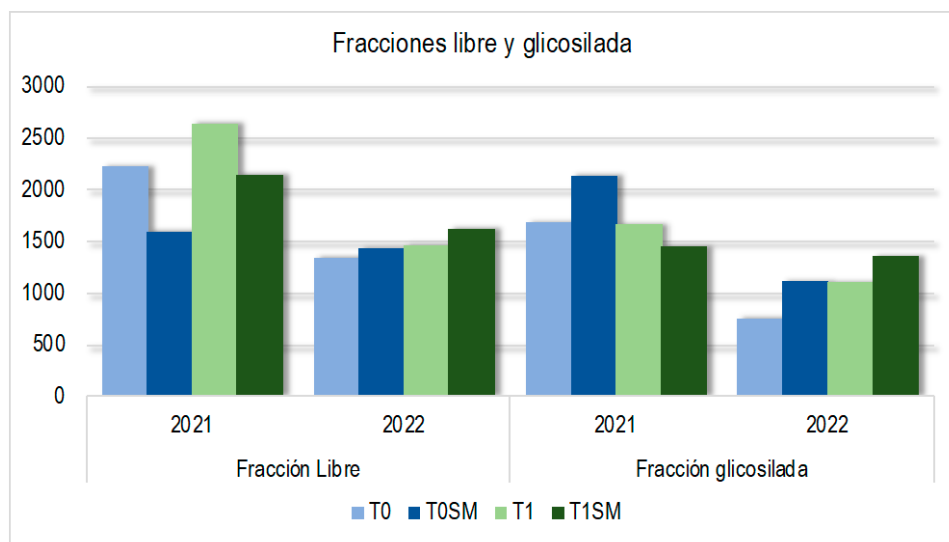


Fig. 3. Concentración de fracciones libre y glicosilada ($\mu\text{g/L}$) de los mostos de la variedad Mencía en función de los tratamientos aplicados (riego y pizarra) en las campañas 2021-2022

Por último, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de representar gráficamente los tratamientos y años en función de su composición volátil y glicosilada, así como de parámetros físico-químicos relacionados con la maduración ($^{\circ}\text{Brix}$, acidez total e IPT).

El ACP explica un total del 85,79 % de la varianza en sus dos componentes PC1 (67,63 %) y PC2 (18,16 %). En este análisis se puede observar que el efecto de la añada fue mayor que el efecto de los tratamientos aplicados al viñedo (**Fig. 4**).

El año 2021, más lluvioso y con una integral térmica eficaz menor, se caracterizó por mayores concentraciones de compuestos volátiles en sus dos fracciones, libre y glicosilada, así como un mayor valor de IPT. El año 2022, menos lluvioso y más cálido, estuvo caracterizado por una mayor acidez total y $^{\circ}\text{Brix}$, difiriendo estos parámetros entre tratamientos. Así, el $^{\circ}\text{Brix}$ fue mayor en los mostos de la variedad Mencía procedentes de los tratamientos T0 y T1. Sin embargo, cuando a estos dos tratamientos se les aplicó pizarra en la línea (T0SM y T1SM), se observó una tendencia a una menor maduración de la uva alcanzando una mayor acidez total y un menor $^{\circ}\text{Brix}$.

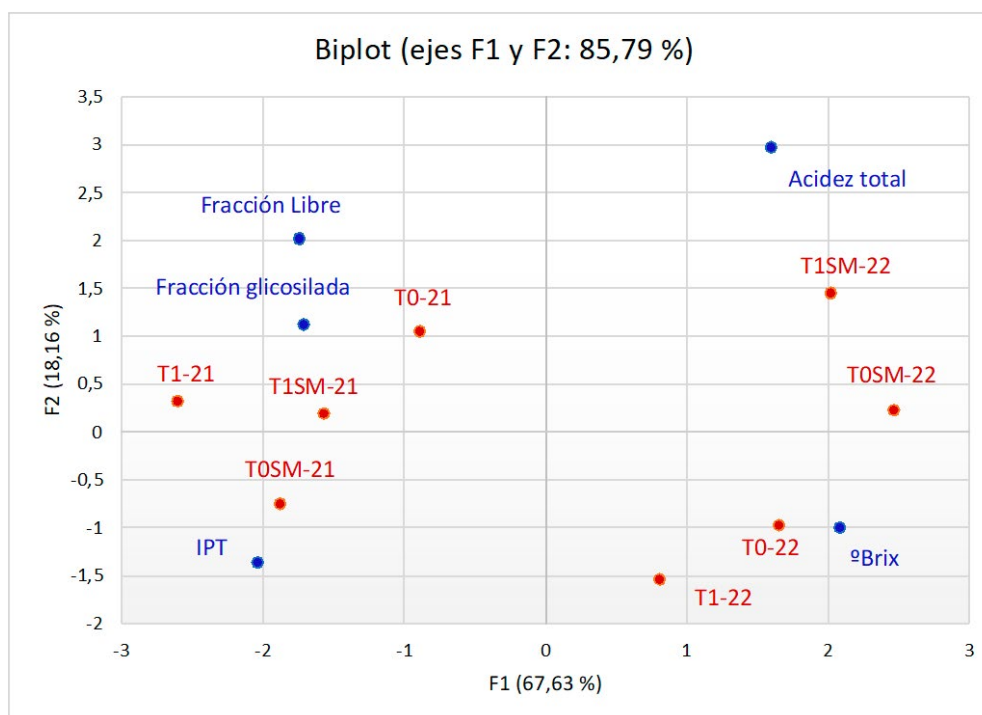


Fig. 4. Análisis de componentes principales (PCA) en base a parámetros de maduración, fracciones libre y glicosilada y años de estudio para los tratamientos aplicados: riego (T0 y T1) y pizarra (T0SM y T1SM)

Respecto al efecto combinado de riego y pizarra no existen trabajos previos que permitan la discusión de los resultados. Sin embargo, los trabajos derivados del efecto del riego en la composición aromática de la variedad Mencía, muestran que la mayor frecuencia de riego incrementa la composición responsable del aroma en su fracción glicosilada (Vilanova et al. 2023, en prensa). Este comportamiento difiere dependiendo de la variedad y el lugar de cultivo.

4. Conclusiones

Este trabajo intenta presentar una alternativa a productos químicos sintéticos utilizados en el manejo de la vegetación en el viñedo, intentando evitar la erosión y la evaporación del agua del suelo. Los resultados preliminares nos hacen intuir que puede ser una buena alternativa, ya que, combinado con determinados regímenes hídricos puede tener ciertas ventajas a nivel de retraso de maduración y mejora de la composición de la uva. Más años de estudio nos permitirán obtener conclusiones sólidas, evaluando así el uso de restos de pizarra como práctica de manejo de las malas hierbas en la línea de los viñedos gallegos.



5. Bibliografía

1. CANCELA J.J., YUSTE J. MONTORO A., FANDIÑO M., MANCHA L.A., TORIJA I., RODRÍGUEZ-FEBEREIRO M., MARTÍNEZ-PORRO D., COSTA B.S., URIARTE D., VILANOVA M. 2023. Irrigation frequency in grapevine red varieties in Spain: production and quality. *Acta Hortic.* (en prensa)
2. GALE, W. J., MCCOLL, R. W., FANG, X. 1993. Sandy fields traditional farming for water conservation in China. *J. Soil Water Conserve.*, 48(6), 474-477.
3. LI, X.Y. 2003. Gravel-sand mulch for soil and water conservation in the semiarid loess region of northwest China. *Catena*, 52(2), 105-127.
4. NACHTERGAELE, J., POESEN, J., VAN WESEMAEL, B. 1998. Gravel mulching in vineyards of southern Switzerland. *Soil Tillage Res*, 46(1-2), 51-59.
5. OLIVEIRA, J.M., OLIVEIRA, P. BAUMES, R.L., MAIA, M.O. 2008. Volatile and glycosidically bound composition of Loureiro and Alvarinho wines. *Food Sci. Technol. Int.* 2008, 14, 341-353.
6. VILANOVA, M., FANDIÑO, M., FRUTOS-PUERTO, S., CANCELA, J.J. 2019. Assessment fertigation effects on chemical composition of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño. *Food Chem.* 278, 636-643.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación obtenida del Ministerio de Ciencia e Innovación, a través de las ayudas a Proyectos I+D+i, en el marco de los Programas Estatales de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema I+D+i orientada a los Retos de la Sociedad, PID2019-105039RR-C44.

Efecto del calentamiento global sobre la transpiración y maduración del racimo de uva (*Vitis vinifera* L.)

Andrea Cabodevilla¹, Fermín Morales², Inmaculada Pascual¹

¹Universidad de Navarra-BIOMA. Grupo de Fisiología del Estrés en Plantas (Unidad Asociada al CSIC, EEAD, Zaragoza), Calle Irunlarrea 1, 31080, Pamplona, España. +34948425600 Ext:806227. acabodevill@alumni.unav.es, ipascual@unav.es

²Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Agrobiotecnología, Grupo Agricultura Sostenible y Biomonitorización, Avenida de Pamplona 123, 31192, Mutilva, España. +34948168015. fermin.morales@csic.es

Resumen

La transpiración es un proceso crucial para la vid (*Vitis vinifera* L.). Este proceso está condicionado por diferentes factores como la temperatura o la humedad relativa (HR). El Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC) prevé un aumento de la temperatura global y un descenso de HR. El objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto del calentamiento global sobre la transpiración y el desarrollo de la baya. Se cultivaron esquejes fructíferos de la variedad Tempranillo Tinto en dos invernaderos con condiciones controladas: condiciones control (T; 24°C/14°C y 55%/70% HR (día/noche)) versus simulación del calentamiento global (T+4; 28°C/18°C y 43%/58% HR (día/noche)). En este segundo invernadero, se aplicó un tratamiento de antitranspirante (VaporGard®) (AT+4) a la mitad de los racimos llegado el envero. Las plantas del tratamiento control mostraron tiempos de maduración más largos, bayas de mayor tamaño y menor tasa de transpiración en comparación con T+4. T+4 acumuló más sólidos solubles totales (SST) y favoreció la degradación de ácidos. El tratamiento AT+4 igualó la concentración de SST de T atenuando, parcialmente, el efecto de T+4. En resumen, un aumento en la transpiración (T+4) provocó cambios en la fenología y composición de la baya.

1. Introducción

La transpiración es un proceso crucial para el crecimiento y desarrollo de la planta que permite el intercambio gaseoso necesario para la fotosíntesis mediante la pérdida de agua a través de los estomas y la cutícula (Stålfelt, 1981). Este proceso representa el 90% del uso de agua de la planta. La transpiración está condicionada por factores ambientales como la temperatura, velocidad del viento, humedad relativa (HR) y la diferencia en el déficit de presión de vapor (VPD) entre los tejidos de la planta y la atmósfera (Gates, 1968) y factores específicos del cultivo como el área foliar y la conductancia cuticular (Zhang et al., 2017). Por lo tanto, la transpiración varía según la especie, las condiciones climáticas y la estación (Morandi et al., 2010). La transpiración del racimo de vid (*Vitis vinifera* L.) es un proceso importante para la maduración de la uva, ya que representa la mayor parte de la pérdida total de agua de las bayas independientemente de la etapa del desarrollo (Düring et al., 1987). Algunos estudios han demostrado que este proceso afecta a la acumulación de solutos y a la maduración de las bayas (Pascual et al., 2022).

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una de las especies más extensamente cultivadas, con una superficie global total de 7,4 millones de hectáreas de viñedos. La mayor parte está dedicada a la producción de vino, que en 2021 ascendió a 261 millones de hectolitros siendo España el tercer



productor mundial de vino (13,6% de la producción total) (OIV, s.f.). La actividad humana, especialmente de los últimos 50 años, ha contribuido de forma clara al aumento de la concentración de gases de efecto invernadero en la atmósfera, los cuales son responsables del calentamiento global (Webb et al., 2013). La concentración de CO₂ en el aire ha aumentado de 280 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (ppm) en el periodo pre-industrial a 420 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (ppm) en 2023 (CO₂levels, 2023). Para mediados y finales de siglo se espera que la concentración sea de 550 y 700 ppm, respectivamente (Houghton et al., 2001; Morales et al., 2014). Como consecuencia, los datos más recientes muestran una tendencia ascendente de la temperatura durante los últimos 30 años (Spinoni et al., 2015). Según el Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC, 2021) la temperatura media global puede aumentar 4°C en los próximos 100 años, por lo que el futuro escenario climático para la cuenca mediterránea podría no ser favorable para la viticultura (Lionello et al., 2014). Además, la humedad relativa (HR) del aire sobre el continente ha experimentado un descenso en los últimos años (Byrne and O’Gorman, 2018).

El aumento de temperatura está acortando el ciclo fenológico de la vid, provocando que la maduración se desarrolle en condiciones climáticas menos favorables. Este cambio en la temperatura está estrechamente relacionado con el desacoplamiento de la acumulación de azúcares con la síntesis/descomposición de metabolitos importantes relacionados con la calidad, tales como las antocianinas o los ácidos orgánicos, lo que lleva a cambios en los rasgos sensoriales del mosto como el color y la acidez, respectivamente (Sadras y Moran, 2012). Concretamente, el descenso en la acidez observado como consecuencia de un incremento de temperatura se ha asociado a una aceleración del catabolismo del ácido málico a través de la respiración (Pandell, 1999).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el impacto del aumento de temperatura y la reducción de la humedad relativa (HR) del ambiente previstos para finales de siglo sobre la transpiración, el desarrollo del racimo y la composición final de la uva.

2. Material y Métodos

El experimento se llevó a cabo en los invernaderos de la Universidad de Navarra, bajo condiciones controladas. Se emplearon esquejes fructíferos de vid de la variedad Tempranillo Tinto que se enraizaron siguiendo el método de Mullins (1966). Tras el cuajado de los racimos se implementaron 2 regímenes de temperatura y HR hasta la madurez: 24°C/14°C y 55%/70% día/noche (T) y 28°C/18°C y 42%/58% (T+4), este último simulando los cambios proyectados para finales de siglo. Además, a la mitad de las plantas del tratamiento T+4 se les redujo de forma artificial la transpiración del racimo a partir del inicio del envero mediante la aplicación periódica de un anti-transpirante, VaporGard al 10% (v/v) (AT+4). Durante el experimento, se determinó el desarrollo fenológico como el número de días transcurrido desde cuajado hasta madurez. En las fases fenológicas de guisante, garbanzo, inicio de envero, envero y madurez (aprox. 23 °Brix) se midió la transpiración del racimo, con un equipo basado en sensores de humedad relativa (Morales et al., 2022). Además, en madurez, se determinó la concentración de sólidos solutos totales (SST) mediante refractómetro (digital Abbe315 RS, Zuzi), la concentración de ácido málico mediante método enzimático (Enzytec L- Malic Acid, Boehringer Mannheim/ RBiopharm®) y la concentración de antocianinas totales (Ribereau-Gayon y Stonestreet, 1965). El análisis estadístico se realizó con SPSS, empleando un test T-student en las variables que se determinaron en guisante, garbanzo e inicio de envero y un ANOVA de una vía con un test post-hoc DMS en las determinaciones realizadas en envero y madurez.

3. Resultados

El calentamiento global está modificando la fenología de la vid, adelantando la cosecha (Kuhn et al., 2014). En el presente estudio, las plantas del tratamiento control (T) fueron las que más tiempo tardaron en madurar en comparación con el tratamiento T+4. Por su parte, la aplicación de anti-transpirante (AT+4) amortiguó parcialmente la aceleración en el desarrollo fenológico de los esquejes fructíferos provocado por la temperatura elevada (T+4) (Fig. 1A). Por otro lado, conforme las bayas se fueron desarrollando, la transpiración disminuyó (Fig. 1B). Los racimos cultivados bajo condiciones control (T) presentaron una tasa de transpiración significativamente menor a los del tratamiento T+4, debido a un menor déficit de presión de vapor (DPV) de la atmósfera asociado a la menor temperatura y mayor HR en T. Esto concuerda con lo observado por Zhang y Keller en 2015, donde en un experimento realizado en cultivares Syrah y Concord observaron que existe una relación lineal entre la tasa de transpiración de bayas y el DPV. Al aplicar antitranspirante a los racimos (AT+4), se observó una reducción en la tasa de transpiración con respecto a T+4, obteniéndose valores similares a los del tratamiento control (T).

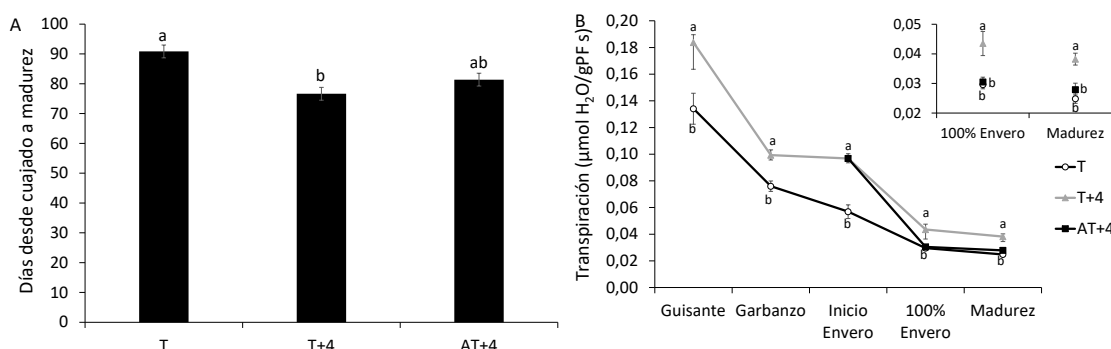


Fig. 1. Días desde el cuajado hasta la madurez (A) y evolución de la transpiración del racimo (B) en esquejes fructíferos de la variedad Tempranillo Tinto. La gráfica representa el promedio ± el error estándar. Medidas con letras en común dentro de cada fase de desarrollo no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) (test DMS).

Un aumento de temperatura está estrechamente relacionado con el desacoplamiento de la acumulación de azúcares con la síntesis/descomposición de metabolitos importantes relacionados con la calidad, tales como las antocianinas o los ácidos orgánicos (Sadras y Moran, 2012). El aumento de temperatura provocó un incremento significativo en la tasa de acumulación de azúcares. Aunque la aplicación de antitranspirante (AT+4) redujo esta tasa en relación a T+4, la acumulación de azúcares en AT+4 continuó siendo significativamente más rápida que en el tratamiento T (Fig. 2A).

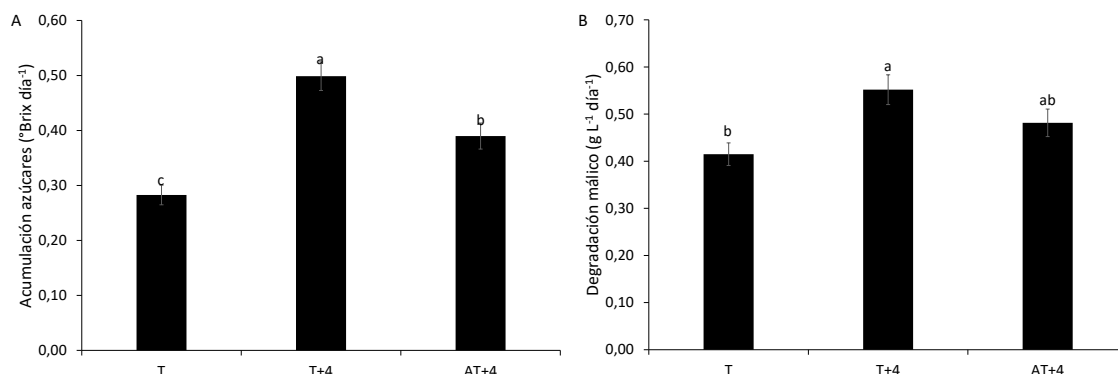


Fig. 2. Tasa de acumulación de azúcares (A) y de degradación de ácido málico (B) en bayas de esquejes fructíferos de la variedad Tempranillo Tinto. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar. Medidas con letras en común no son significativamente diferentes ($p>0,05$) (test DMS).

Las bayas del tratamiento T+4 presentaron una mayor tasa de degradación de ácido málico en comparación con T. Esto pudo deberse a una aceleración del catabolismo del ácido málico a través de la respiración como respuesta a un incremento de temperatura (Pandell, 1999). El tratamiento con antitranspirante AT+4 amortiguó parcialmente los efectos de la temperatura elevada en la degradación de este ácido (Fig. 2B).

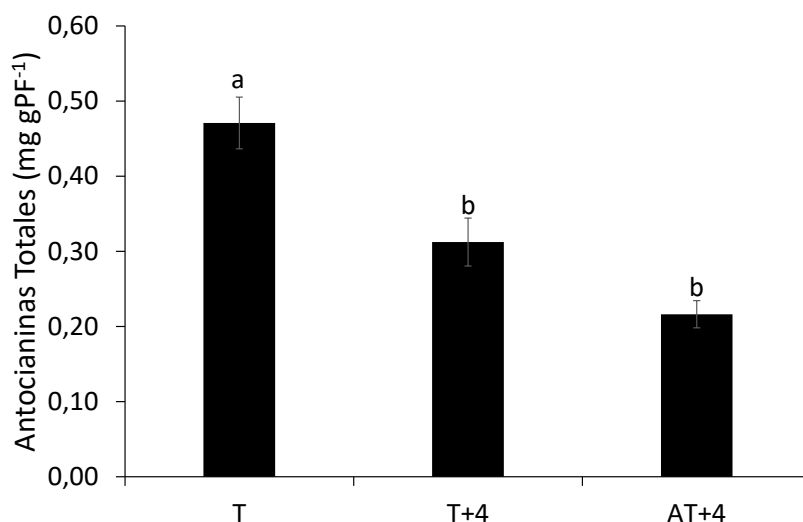


Fig. 3. Concentración de antocianinas totales en bayas de esquejes fructíferos de la variedad Tempranillo Tinto. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar. Medidas con letras en común no son significativamente diferentes ($p>0,05$) (test DMS).

Las antocianinas son pigmentos negros púrpuras que se acumulan en las vacuolas del hollejo de la baya de las variedades tintas. Además, estos pigmentos dan a la baya protección frente a la exposición solar y radiación ultravioleta (He et al., 2010). El tratamiento T presentó una mayor concentración de antocianinas en relación a los tratamientos de temperatura elevada, independiente de si se aplicara o no anti-transpirante (T+4 y AT+4) (Fig. 3). La temperatura elevada puede provocar un descenso en la acumulación de antocianinas en la baya, bien por inhibición de



su síntesis o por un aumento en su degradación (Arrizabalaga et al., 2018). En este caso, el tratamiento con anti-transpirante pareció intensificar el impacto negativo de la temperatura elevada en la concentración de antocianinas, aunque las diferencias entre los tratamientos T+4 y AT+4 no llegaron a ser estadísticamente significativas. La transpiración es un proceso que permite la refrigeración de los tejidos vegetales, por lo que al reducirse artificialmente con el anti-transpirante pudo provocar un sobrecalentamiento de las bayas en AT+4 favoreciendo todavía más la degradación de antocianinas.

4. Conclusiones

La temperatura elevada aceleró el ciclo fenológico de las plantas, aumentando la tasa de transpiración, acumulación de azúcares y degradación de málico. La aplicación de anti-transpirante en condiciones de temperatura elevada (AT+4) consiguió reducir la tasa de transpiración hasta conseguir valores similares a los del tratamiento T y atenuó parcialmente los efectos de la temperatura, retrasando el desarrollo fenológico de las bayas y disminuyendo las tasas de acumulación de azúcares y de degradación del málico. La concentración de antocianinas se vio negativamente afectada en los tratamientos con temperatura elevada, independientemente de la aplicación o no de anti-transpirante.

5. Bibliografía

1. ARRIZABALAGA, M., MORALES, F., OYARZUN, M., DELROT, S., GOMÈS, E., IRIGOYEN, J.J., HILBERT, G., PASCUAL I. (2018) **Tempranillo clones differ in the response of berry sugar and anthocyanin accumulation to elevated temperature**. Plant Sci. 267:74-83.
2. BYRNE, M., O'GORMAN, PA. (2018) **Trends in continental temperature and humidity directly linked to ocean warming**. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 115(19):4863-4868.
3. CO2levels. (2023) <https://www.co2levels.org/> Último acceso 15/04/2023
4. DÜRING, H., LANG, A., ÜGGJONN, F. (1987) **Patterns of water flow in Riesling berries in relation to developmental changes in their xylem morphology**. Vitis 26:126-131.
5. GATES, D.M. (1968) **Transpiration and Leaf Temperature**. Ann. Rev. Plant Physiol. 19(1): 211-238.
6. HE, F., MU, L., YAN, G.L., LIANG, N.N., PAN, Q.H., WANG, J., ... DUAN, C.Q. (2010) **Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes**. Molecules 15(12):9057-9091.
7. HOUGHTON, J.T., DING, Y.D.J.G., GRIGGS, D.J., NOGUER, M., VAN DER LINDEN, P.J., DAI, X., ... JOHNSON, C.A. (2001) **Climate change 2001: the scientific basis**. The Press Syndicate of the University of Cambridge.
8. IPCC (2021) Summary for Policymakers. En V. Masson-Delmotte et al. (Eds.), Climate change 2021: **The physical science basis**. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (pp. 3–32). Cambridge University Press.
9. KUHN, N., GUAN, L., DAI, Z.W., WU, B-H., LAUVERGEAT, V., GOMÈS, E., ET AL. (2014) **Berry ripening: recently heard through the grapevine**. J. Exp. Bot. 65(16):4543-4559.



10. LIONELLO, P., ABRANTES, F., GACIC, M., PLANTON, S., TRIGO, R., ULBRICH U. (2014) **The climate of the Mediterranean region: research progress and climate change impacts.** Reg. Environ. Chang. 14:1679-1684.
11. MORALES, F., PASCUAL, I., SÁNCHEZ-DÍAZ, M., AGUIRREOLEA, J., IRIGOYEN, J.J., GOICOECHEA, N., ... URDIAIN, A. (2014) **Methodological advances: using greenhouses to simulate climate change scenarios.** Plant Sci. 226:30-40.
12. MORALES, F., IRIGOYEN, J.J., ANTOLÍN, M.C., GOICOECHEA, N., SANTESTEBAN, H., OYARZUN, M. ... PASCUAL, I. (2022) **Novel, technical advance: A new grapevine transpiration prototype for grape berries and whole bunch based on relative humidity sensors.** Comput. Electron. Agric. 196:106890.
13. MORANDI, B., MANFRINI, L., LOSCIALE, P., ZIBORDI, M., CORELLI-GRAPPADELLI, L. (2010) **The positive effect of skin transpiration in peach fruit growth.** J. Plant Physiol. 167(13):1033-1037.
14. MULLINS, MG., RAJASEKARAN, K. (1981) **Fruiting cuttings: revised method for producing test plants of grapevine cultivars.** Amer. J. Enol. Vitic. 32:35-40.
15. OIV (s.f.) **Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, World Vitiviniculture situation.** www.oiv.int Ultimo acceso 15/04/2023
16. PANDELL, A.J. (1999) **The Acidity of Wine** <http://www.wineperspective.com/the-acidity-of-wine.htm> Ultimo acceso 15/04/2023
17. PASCUAL, I., ANTOLÍN, M.C., GOICOECHEA, N., IRIGOYEN, J.J., MORALES, F. (2022) **Grape berry transpiration influences ripening and must composition in cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.).** Physiol. Plant. 174:e13741.
18. RIBÉREAU-GAYON, P., STONESTREET E. (1965) **Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge: Determination of anthocyanins in red wine.** Bull. Soc. Chim. Fr. 9:2649-2652.
19. SADRAS, V.O., MORÁN, M.A. (2012) **Elevated temperature decouples anthocyanins and sugars in berries of Shiraz and Cabernet Franc.** Aust. J. Grape Wine Res. 18:115-122.
20. SPINONI, J., VOGT, J., BARBOSA, P. (2015) **European degree-day climatologies and trends for the period 1951-2011.** Int. J. Climatol. 35:25-36.
21. STÄLFELT, M.G. (1981) **Handbuch der Pflanzenphysiologie** (3rd ed.). Springer, Berlin. 351-372..
22. WEBB, L.B., WATTERSON, I., BHEND, J., WHETTON, P.H., BARLOW, E.W.R. (2013) **Global climate analogues for wine growing regions in future periods: projections of temperature and precipitation.** Aust. J. Grape Wine Res. 19:331-341.
23. ZHANG, Y., PEREZ, J., KELLER, M. (2017) **Grape berry transpiration: determinant factors, developmental changes, and influences on berry ripening.** Acta Hortic. 1188:51-56.
24. ZHANG, Y., KELLER, M. (2015) **Grape berry transpiration is determined by vapor pressure deficit, cuticular conductance, and berry size.** Amer. J. Enol. Vitic. 66(4):454-462.

6. Agradecimientos

Gobierno de Navarra (PC 144-145 MULTI-SENSOR) y Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra (ayuda predoctoral A. Cabodevilla). Agradecer especialmente a H. Santesteban, A. Urdiain, M. Oyarzun y M. Barbarin por su excelente asistencia técnica y a J.F. Cibriain (EVENA) por proporcionar el material vegetal para hacer el experimento.

Efecto del momento de aplicación de deshojados en Garnacha en dos campañas climáticamente diferentes.

Nazareth Torres^{1,2}, Purificación Fernández-Zurbano³, Ana Villa-Llop^{1,4}, Maite Loidi¹, Carlos Peñalosa¹, Sergio Musquiz¹, Luis Gonzaga Santesteban^{1,2}

¹Dept. de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra; ²Institute for Multidisciplinary Research in Applied Biology (IMAB-UPNA), Universidad Pública de Navarra, Pamplona-Iruñea, Navarra; ³Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (CSIC-GR-UR). Departamento de Enología, Finca La Grajera, Logroño, La Rioja;

⁴Viveros Vitis Navarra, 31251, Larraga, Navarra

(+34) 948 16 9718

nazareth.torres@unavarra.es

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del deshojado en distintos momentos de la maduración sobre el rendimiento y la composición de las bayas en el contexto de incremento de las temperaturas. El experimento se realizó durante dos campañas en un viñedo comercial de Garnacha en La Rioja e incluyó dos deshojados que diferían en el momento de realización: deshojado temprano (DTE) y tardío (DTA) y un control sin deshojar. Los resultados mostraron que ambos deshojados redujeron los azúcares en cosecha, pero sólo el tratamiento DTE retrasó la maduración en 2021, sin embargo, estos efectos se vieron condicionados por las variaciones estacionales de temperatura y precipitación, ya que se observaron aumentos en los azúcares y el pH durante la campaña 2022. Ambos deshojados disminuyeron el contenido de flavanoles y estilbenos y el DTE aumentó las antocianinas y los ácidos fenólicos en las bayas en el momento de la cosecha. El estudio sugiere que las prácticas de manejo de la canopy, como los deshojados tempranos, podrían seguir siendo interesantes, a pesar de las tendencias actuales de calentamiento en las regiones vitivinícolas, para mejorar algunos rasgos de calidad de las bayas sin afectar al rendimiento.

1. Introducción

El aumento de las temperaturas asociado al calentamiento de las regiones vitivinícolas provoca un avance de la fenología de la vid, disminución del rendimiento y aumento del contenido de azúcar y pH del mosto con menor contenido de polifenoles, especialmente antocianos, lo que conlleva la producción de vinos con menor color y mayor grado alcohólico (Arrizabalaga-Arriazu et al., 2020; Sadras y Moran, 2012).

Las prácticas de manejo de la canopy se llevan a cabo para controlar el equilibrio entre la fuente y el sumidero y mejorar el microclima del racimo, consiguiendo una mejor composición de las bayas. Una de las prácticas más extendidas es la del deshojado, que consiste en la eliminación de las hojas basales cercanas a los racimos, sin embargo, sus efectos dependen de cómo y cuándo se realice (Sternad-Lemut et al., 2013). Nuestra hipótesis de partida consiste en que la eliminación temprana de hojas (DTE) después del cuajado podría promover una maduración tardía; mientras que la eliminación tardía de hojas a mitad de la maduración (DTA) reduciría la acumulación de azúcar. Por lo tanto, se realizó un estudio de dos años para evaluar el momento óptimo de deshojado entre dos estados fenológicos (post-cuajado y envero tardío) como



herramienta para retrasar la maduración y reducir la acumulación de azúcares sin afectar a la composición fenólica; así como, determinar las implicaciones de la eliminación de hojas en el desacoplamiento entre la síntesis y acumulación de azúcares y antocianinas durante dos campañas climáticamente diferentes en cuanto a exposición solar y precipitación.

2. Material y Métodos

Material vegetal - El experimento se realizó con *Vitis vinifera* L. cv. Garnacha durante las campañas 2021 y 2022 en un viñedo comercial en Alfaro, La Rioja. Las vides se condujeron en vaso abierto con tres brazos y 5 pulgares de dos yemas. El diseño experimental consistió en bloques completos con dos tratamientos de deshojado que diferían en el momento de la realización: i) tratamiento de deshojado severo después del cuajado (DTE); y ii) deshojado severo después del envero (DTA) en comparación con un control sin deshojar (NT). Ambos tratamientos de deshojado consistieron en la eliminación de las hojas basales antes del segundo entrenudo. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones de 10 cepas. La cosecha comenzó cuando las bayas alcanzaron la madurez comercial (aproximadamente, 26°Bx) y se estudiaron las características de las bayas y su composición química.

Determinaciones de la calidad de las bayas y del perfil polifenólico - En la cosecha, se recogieron dos muestras de 100 y 200 bayas, respectivamente para determinar el peso de la baya y su composición química. La primera muestra de 100 bayas se pesó para obtener el peso de la baya, después se obtuvo mediante prensado manual el mosto, sobre el que se determinaron los sólidos solubles totales (TSS), el pH y la acidez titulable (AT). Los SST se determinaron utilizando un refractómetro compensador de temperatura de alta precisión (RF Mogul, EE. UU.). El pH y la AT del mosto se determinaron con un autotitulado (Crison, España). La AT se estimó por titulación con hidróxido de sodio 0,1 N hasta un punto final de 8,3 pH y se expresó en g/L de ácido tartárico.

Otra muestra de 200 bayas se trituró en un procesador de alimentos y 50 ml de la papilla resultante se usaron para determinar el perfil de polifenoles después de obtener las fracciones fenólicas (FF) de acuerdo al protocolo descrito en Alegre et al. (2020). Las FF se filtraron con filtros CHROMAFIL AO-20/15 MS de 2 µm (Düren, Alemania) y se transfirieron a viales de inyección (Royo et al., 2021). Luego, las muestras se analizaron con un sistema cromatográfico de líquidos Acquity Ultra Performance (Waters, MA, EE. UU.) acoplado a un sistema Xevo TQ MS (Waters, Reino Unido) que funciona con el software MassLynx XS. La separación cromatográfica de los compuestos fenólicos se realizó en una columna Waters Acquity HSS T3, 1,8 µm, 2,1 × 150 mm (Waters). Se empleó una columna de fase inversa (RP) Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 × 150 mm (Waters), protegida con una precolumna Acquity UPLC BEH C18, 1,7 µm, 2,1 × 5 mm (Waters).

Análisis estadístico - los análisis estadísticos se realizaron con R studio versión 3.6.1 (RStudio Team, 2020). El peso de la baya, los parámetros de composición química y los compuestos fenólicos se analizaron mediante el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con el año y el tratamiento como factores principales tras evaluar la normalidad de los datos. Se calcularon las medias ± errores estándar (EE) y, cuando la relación F fue significativa ($P \leq 0.05$), se realizó una prueba Posthoc HSD de Tukey utilizando el paquete "agricolae" 1.2–8 R (de Mendiburu, 2017).



Por otro lado, se calcularon las regresiones lineales entre antocianinas totales y SST y se estimó la significancia del análisis con el mismo software para cada tratamiento dentro del año y para cada año por separado. Para ambos análisis, las pendientes se compararon en $P \leq 0,05$ mediante análisis de covarianza (ANCOVA).

3. Resultados

3.1. Los efectos del momento de deshojado dependen de las condiciones climáticas durante la campaña.

Las dos campañas evaluadas en este estudio difirieron en su temperatura media y precipitaciones. Así, la campaña 2021-22 fue más cálida que la campaña 2020-21, con 1 °C más en la temperatura media diaria, 13 días más con temperatura superior a 35 °C y 37,2 mm menos de precipitación. El peso y la química de las bayas se vieron afectadas por los tratamientos de eliminación de hojas y el año de aplicación, pero no se observó interacción entre ambos factores (Tabla 1). El peso de baya disminuyó durante la campaña de 2022, presumiblemente porque la mayor exposición de las bayas durante la segunda campaña pudo reducir la conducción de fotoasimilados a los racimos durante el desarrollo (Torres et al., 2020). La campaña más cálida también representó un aumento de SST en las bayas, sin embargo, no se observó ningún efecto de los tratamientos de deshojado (Tabla 1). Se ha propuesto que el DTA reduce las tasas de acumulación de azúcar y retrasa la fecha de cosecha (Poni et al., 2018), pero estos efectos dependen en gran medida del entorno y de la variedad de vid, especialmente en vides cultivadas en secano (Buesa et al., 2019). Respecto a los parámetros relacionados con la acidez, el tratamiento DTE tendió a disminuir el pH y mientras que este parámetro se vio incrementado durante el 2022. La AT también se vio afectada por el factor año, ya que aumentó durante la campaña de 2022 sin ningún efecto de los tratamientos de deshojado. Del mismo modo, Torres et al. (2020) no encontraron diferencias en la AT del mosto obtenido de las cepas sobre las que se había realizado un deshojado. El aumento de pH y AT en 2022 podría explicarse por el menor tamaño de la baya en ese año, lo que podría concentrar los principales ácidos presentes en las bayas, a pesar de la posible degradación del ácido málico bajo temperaturas elevadas (Sweetman et al., 2014).

Los contenidos totales de los diferentes compuestos fenólicos medidos en este trabajo se muestran en la Tabla 2, donde no se observó interacción entre tratamientos de deshojado y el año de realización. El contenido de antocianinas en la cosecha aumentó con DTE y disminuyó en 2022. Estudios previos han demostrado que la acumulación de antocianinas en los hollejos es significativamente mayor a 20 °C que a 30 °C y que la etapa más sensible a la temperatura es de una a tres semanas después de que comience la coloración (Yamane et al., 2006), lo que explicaría la falta de efecto de DTA observada en nuestro estudio. Por otro lado, en estudios realizados con diferentes variedades se observaron contenidos de antocianinas mayores tras la aplicación de DTE (Pastore et al., 2017; Sternad Lemut et al., 2013). Las otras familias de compuestos polifenólicos mostraron la misma tendencia con contenidos reducidos de flavonoles, ácidos fenólicos y estilbenos durante la campaña de 2022 (Tabla 2), lo que sugiere que las tendencias de calentamiento explicaron la disminución de la síntesis y acumulación de estos compuestos (Sternad-Lemut et al., 2013; Bavaresco et al., 2008). Con respecto a los efectos del deshojado, ambos tratamientos de eliminación de hojas provocaron la disminución de flavanoles y estilbenos, mientras que el DTE aumentó los ácidos fenólicos.



Tabla 1: Peso de la uva, sólidos solubles totales (SST), pH y acidez total del mosto obtenido de las bayas de Garnacha sometidas al deshojado temprano (DTE) o tardío (DTA) comparado con un control sin tratar (NT) recogidas en Alfaro, La Rioja durante las campañas de 2021 y 2022.

Efectos principales		Peso de la uva (g)	SST (Brix)	pH	Acidez total (g/L)
Tratamiento	NT	1.41 ± 0.06	26.6 ± 0.3	3.52 ± 0.02 a	4.9 ± 0.1
	ELR	1.39 ± 0.06	25.6 ± 0.3	3.45 ± 0.02 b	5.0 ± 0.1
	LLR	1.42 ± 0.04	26.1 ± 0.3	3.49 ± 0.03 a	4.8 ± 0.2
Campaña	2021	1.72 ± 0.06 a	25.5 ± 0.2 b	3.46 ± 0.02 b	4.5 ± 0.1 b
	2022	1.09 ± 0.05 b	26.8 ± 0.3 a	3.51 ± 0.02 a	5.3 ± 0.1 a
ANOVA	Tratamiento	ns	ns	.	ns
	Campaña	***	*	*	***
	T x C	ns	ns	ns	ns

Los valores representan medias ± EE (n=10-15) separados por el test posthoc Tukey HSD ($p \leq 0.05$) en función de los efectos principales (tratamientos y campaña). Dentro de cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas según los efectos principales (manejo de la canopy (NT, DTE, DTA), campaña (2021, 2020) y sus interacciones (T × C). ns, ., * and *** indican no significancia o significancia a los niveles de probabilidad de 10%, 5%, y 0.1%, respectivamente.

Tabla 2: Antocianinas, flavonoles, proantocianidinas, ácidos fenólicos y estilbenos totales de las fracciones fenólicas obtenidas de las bayas de Garnacha sometidas al deshojado temprano (DTE) o tardío (DTA) comparado con un control sin tratar (NT) recogidas en Alfaro, La Rioja durante las campañas de 2021 y 2022.

Efectos principales		Antocianinas (mg/g baya)	Flavonoles (mg/g baya)	Proantocianidinas (mg/g baya)	Ácidos fenólicos (mg/g baya)	Estilbenos (mg/g baya)
Tratamiento	NT	412.2 ± 34.9 b	397.1 ± 50.0	61.8 ± 9.1 a	16.2 ± 2.8 b	3.0 ± 0.8 a
	DTE	503.9 ± 18.0 a	554.4 ± 62.3	46.3 ± 4.2 b	29.6 ± 8.9 a	1.6 ± 0.4 b
	DTA	383.4 ± 60.9 b	478.7 ± 103.4	46.6 ± 10.9 b	15.6 ± 4.8 b	2.0 ± 0.4 ab
Campaña	2021	672.1 ± 67.1 a	840.7 ± 135.3 a	55.4 ± 10.85	25.3 ± 9.4 a	3.1 ± 0.7 a
	2022	194.2 ± 8.5 b	112.9 ± 8.5 b	47.7 ± 5.2	15.6 ± 1.5 b	1.3 ± 0.4 b
ANOVA	Tratamiento	.	ns	.	.	.
	Campaña	***	***	ns	.	**
	T x C	ns	ns	ns	ns	ns

Los valores representan medias ± EE (n=10-15) separados por el test posthoc Tukey HSD ($p \leq 0.05$) en función de los efectos principales (tratamientos y campaña). Dentro de cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas según los efectos principales (manejo de la canopy (NT, DTE, DTA), campaña (2021, 2020) y sus interacciones (T × C). ns, ., ** and *** indican no significancia o significancia a los niveles de probabilidad de 10%, 1%, y 0.1%, respectivamente.



3.2. El desacoplamiento de azúcares y antocianinas se ve afectado por la exposición solar provocada por la defoliación

Las relaciones entre los contenidos de antocianinas y azúcares de las bayas se muestran en la Tabla 3. En 2021, DTE moduló la relación entre la acumulación de azúcar y antocianinas tal y cómo subraya el ANCOVA realizado ($p \leq 0.05$; Tabla 3). Sin embargo, en 2022, las regresiones de cada tratamiento no fueron diferentes. Por otro lado, el desacoplamiento térmico entre azúcares y antocianinas fue notable, con casi la mitad del contenido de antocianinas para los mismos contenidos de azúcar en 2022 en comparación con 2021. De acuerdo con estos resultados, investigaciones previas habían mostrado que los deshojados realizados en el envero disminuyen los SST con una potencial disminución de antocianinas mientras que el DTA no dirigió a cambios significativos en azúcares de bayas y antocianinas (Pastore et al., 2017; Tessarin et al., 2014).

Tabla 3: Relación entre el contenido en Antocianinas del mosto y los sólidos solubles totales de las vides de Garnacha sometidas a deshojado temprano (DTE) o tardío (DTA) en comparación con un control sin tratar (NT) recogidas en Alfaro, La Rioja durante las campañas de 2021 y 2022.

Campaña	Tratamiento	y	a		R	Valor p	ANCOVA
2021	NT	-1976.7	132.1	a	0.77	***	*
	DTE	-4016.8	224.4	b	0.93	***	
	DTA	-1605.5	115.8	b	0.51	*	
2021	NT	-1415.1	98.9		0.97	***	ns
	DTE	391.1	26.3		0.51	ns	
	DTA	-612.3	69.1		0.92	***	

“y” indica la intercepción, “a” es la pendiente de la recta de regresión, “r” el coeficiente de correlación, “valor p” es la significancia de acuerdo al test de correlación de Pearson y “ANCOVA” es la significación de las regresiones según el test de ANCOVA realizado cada año. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las regresiones ($p \leq 0.05$).

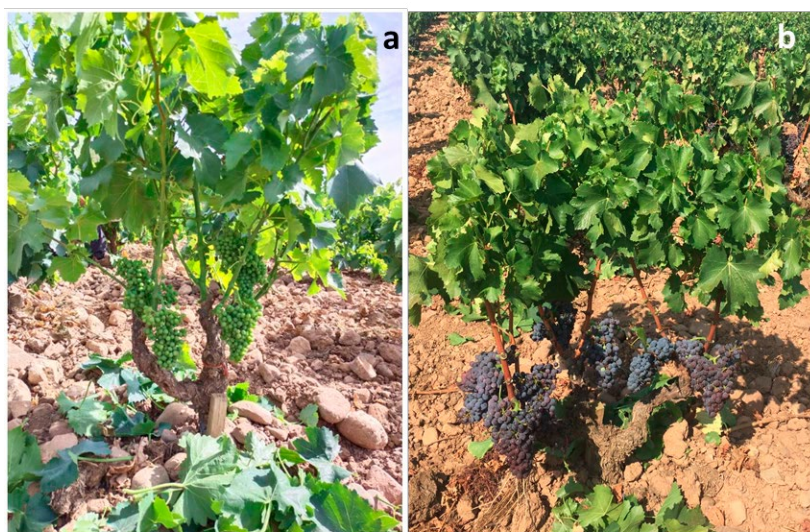


Fig. 1. Deshojados realizados en post-cuajado (a) y en envero (b).



4. Conclusiones

El estudio actual reveló que el aumento de la exposición de los racimos a la temperatura y la radiación afecta de manera considerable a los metabolismos primarios y secundarios. DTE podría reducir este desacoplamiento cuando las condiciones ambientales no son demasiado extremas, pero no se observó ningún efecto durante la campaña más cálida y seca. Por lo tanto, estos resultados sugirieron que las estrategias de eliminación de hojas, incluso bajo las condiciones actuales de calentamiento, podrían seguir siendo útiles en algunas circunstancias para obtener una mejora de algunos rasgos de calidad de la baya y su baja incidencia en el rendimiento.

5. Bibliografía

1. ALEGRE, Y., ARIAS-PÉREZ, I., HERNÁNDEZ-ORTE, P., FERREIRA, V., 2020. Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs). *Food Res. Int.* 127, 108728.
2. ARRIZABALAGA-ARRIAZU, M., GOMÈS, E., MORALES, F., IRIGOYEN, J.J., PASCUAL, I., HILBERT, G., 2020. High temperature and elevated carbon dioxide modify berry composition of different clones of grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Tempranillo. *Front. Plant Sci.* 11, 603687.
3. BAVARESCO, L., GATTI, M., PEZZUTTO, S., FREGONI, M., MATTIVI, F., 2008. Effect of Leaf Removal on Grape Yield, Berry Composition, and Stilbene Concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 3.
4. BUESA, I., CACCAVELLO, G., BASILE, B., MERLI, M.C., PONI, S., CHIRIVELLA, C., INTRIGLILOLO, D.S., 2019. Delaying berry ripening of Bobal and Tempranillo grapevines by late leaf removal in a semi-arid and temperate-warm climate under different water regimes. *Aust. J. Grape Wine Res.* 25, 70-82.
5. PASTORE, C., ALLEGRO, G., VALENTINI, G., MUZZI, E., FILIPPETTI, I., 2017. Anthocyanin and flavonol composition response to veraison leaf removal on Cabernet Sauvignon, Nero d'Avola, Raboso Piave and Sangiovese *Vitis vinifera* L. cultivars. *Sci. Hortic.* 218, 147–155.
6. PONI, S., GATTI, M., PALLIOTTI, A., DAI, Z., DUCHENE, E., TRUONG, T.-T., ET AL., 2018. Grapevine quality: a multiple choice issue. *Sci. Hortic.* 234, 445–462.
7. SWEETMAN, C., SADRAS, V.O., HANCOCK, R.D., SOOLE, K.L., FORD, C.M., 2014. Metabolic effects of elevated temperature on organic acid degradation in ripening *Vitis vinifera* fruit. *J. Exp. Bot.* 65, 5975–5988,
8. ROYO, C., FERRADÁS, Y., MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M., MOTILVA, M.J., 2021. Characterization of Tempranillo negro (VN21), a high phenolic content grapevine Tempranillo clone, through UHPLC-QqQ-MS/MS polyphenol profiling, *Food Chem.* 360, 130049.
9. SADRAS, V.O., MORAN, M.A., 2012. Elevated temperature decouples anthocyanins and sugars in berries of Shiraz and Cabernet Franc. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18, 115–122



10. STERNAD LEMUT, M., TROST, K., SIVILOTTI, P., ARAPITSAS, P., VRHOVSEK, U., 2013. Early versus late leaf removal strategies for Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.): Effect on colour-related phenolics in young wines following alcoholic fermentation. *J Sci Food Agric.* 93, 3670-81.
11. TORRES, N., MARTÍNEZ-LÜSCHER, J., PORTE, E., KURTURAL, S.K., 2020. Optimal Ranges and Thresholds of Grape Berry Solar Radiation for Flavonoid Biosynthesis in Warm Climates. *Front. Plant Sci.* 11, 931.
12. TESSARIN, P., BOLIANI, A. C., BOTELHO, R. V., RUSIN, C., VERSARI, A., PARPINELLO, G.P., ROMBOLÀ, A.D., 2014. Effects of late defoliations on chemical and sensory characteristics of cv. Uva Longanesi wines. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 14, 1021-1038.

6. Agradecimientos

A. Villa-Llop es beneficiaria de un contrato predoctoral Industrial del Gobierno de Navarra (Ref. 283E/2020). N. Torres es beneficiaria de un contrato Ramón y Cajal RYC2021-034586-I financiado por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y por "European Union NextGenerationEU/PRTR".

Efecto de distintas formas de manejo de la línea sobre el estado nutricional de la vid (*Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo)

Andreu Mairata, Alicia Pou, David Labarga, Luis Rivacoba, Javier Portu, Enrique García-Escudero, Javier Manzanares, Ignacio Martín

*Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, ICVV (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja).
Servicio de Investigación Vitivinícola. Finca La Grajera, Ctra. Burgos km 6. 26071 Logroño (La Rioja; España).
Teléfono: +34 941 053 087, Correo electrónico: ignacio.martin@icvv.es*

Resumen

El uso de acolchados orgánicos presenta múltiples ventajas para el cultivo y el suelo, como mejorar el manejo de malezas y reducir el uso de herbicidas, y de insumos químicos, reducir erosión, aumentar la disponibilidad de agua y nutrientes, favorecer la biodiversidad. Concretamente, la reutilización de subproductos agrícolas permite aprovechar nuevos materiales orgánicos, como la paja, los sustratos postcultivo de champiñón (SPCH) o restos de poda (GPD).

El objetivo de este trabajo es evaluar los efectos de diferentes técnicas de manejo del suelo, aplicadas en la línea, sobre el nivel de nutrición de la vid. Se comparan tres acolchados orgánicos: SPCH, GPD y Paja, con dos técnicas convencionales: Herbicida e Intercepas. Para ello, se analizó el contenido en nutrientes de limbos y pecíolos: N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, B y Na, tanto en floración como en envero durante 4 años consecutivos.

Los resultados muestran diferencias en los tejidos analizados entre los sistemas estudiados, debidas tanto al aporte de nutrientes, principalmente en el SPCH y GPD, como a efectos de concentración y dilución, por diferencias en la producción vegetal y/o en la disponibilidad en el suelo, incrementada o no, por los diferentes acolchados.

Palabras clave: Herbicida, Intercepas, SPCH, GPD, Paja, nutrición, nutrientes

1. Introducción

El manejo del suelo es fundamental para gestionar su productividad, sostenibilidad y la biodiversidad de ellos, siendo un aspecto fundamental en la adaptación de los sistemas productivos agrícolas a escenarios más exigentes, con una mayor incidencia de estreses abióticos: temperaturas extremas más habituales, menor disponibilidad hídrica y, por tanto, un estrés hídrico más alargado en el tiempo, menor tolerancia a enfermedades e incluso menor disponibilidad nutricional al reducirse el medio de transporte hacia el interior de la planta.

Respecto al manejo del suelo, el laboreo convencional sería la técnica de referencia, utilizada principalmente porque reduce la competencia de otras especies por los recursos hídricos y nutricionales. Sin embargo, esta técnica favorece la evaporación de agua del suelo, al mantenerlo desnudo prácticamente en su totalidad. De forma parecida, el uso de herbicidas evita esa misma competencia y reduce ligeramente la evaporación, pero requiere la utilización de sustancias químicas que requieren un coste y que pueden no ser totalmente inocuas para el



cultivo o para especies diferentes a las especies diana, así como para el medio, e incluso para los futuros consumidores.

Por otro lado, el “mulching” o acolchado, es una técnica de mantenimiento que consiste en cubrir el suelo, total o parcialmente, con una cobertura orgánica. El efecto de dicha cobertura dependerá de su naturaleza y de la intensidad de aplicación de ésta. El uso de estas coberturas orgánicas puede proporcionar numerosas ventajas, como el control de malezas (reduciendo el requerimiento de herbicidas), la conservación del suelo (al disminuir la erosión y reducir la temperatura, posiblemente retrasando el inicio de brotación), mejorar la biodiversidad del suelo, reducir la pérdida de agua, al evitar la incidencia directa de la luz solar, así como, a medida que se incorporan dichos recubrimientos, mejorar la composición orgánica del suelo. En este sentido, la mineralización de estos residuos orgánicos aportará nutrientes al medio, aumentando su disponibilidad para el cultivo y convirtiéndose en una fuente nutricional importante para la agricultura sostenible, pudiendo reducir las necesidades de fertilizantes. Además, estos materiales pueden ser muy valiosos, ya no sólo como enmienda orgánica sino también como agente de biocontrol de plagas y enfermedades y biorremediación, al aumentar la biodiversidad.

Sólo en La Rioja se producen más de 300.000 toneladas de sustratos postcultivo de hongos al año, por lo que la incorporación de estos materiales al suelo es una de las opciones de gestión de residuos ambientalmente más sensible y que puede revertir de manera positiva sobre el propio sector, principalmente en las comarcas agrícolas adyacentes a las zonas de producción de estos residuos.

El presente trabajo pretende evaluar el comportamiento de cinco formas de manejo del suelo sobre la línea, en relación a la absorción y traslocación de nutrientes por la planta, en un viñedo injertado con el cv. Tempranillo, en las condiciones edafo-climáticas de La Rioja.

2. Material y Métodos

En el período 2019-2022 se llevó a cabo un estudio de evaluación de distintos sistemas de mantenimiento de la línea en una parcela de vid situada en el término municipal de Aldeanueva de Ebro (La Rioja). El viñedo se estableció en 1983, con la variedad ‘Tempranillo’ injertada sobre el portainjerto 110-Richter, con orientación Noreste-Suroeste y una densidad de plantación de 3.200 cepas/ha (2,6 x 1,2 m). Las vides se conducen en espaldera, según un sistema Cordón Royat doble, manteniendo seis pulgares y entre 10 y 12 yemas por cepa.

El suelo de la parcela de ensayo presenta textura franca (USDA), sin limitaciones destacables a nivel físico-químico, con pH elevado (8,5), baja conductividad eléctrica (CE, 0,17 mS/cm) y aceptable nivel de materia orgánica (1,29%). Se observa presencia de carbonatos (19,4%) y un nivel considerable de caliza activa (11,4%) en el nivel superficial, aumentando ligeramente en profundidad ambos parámetros (21,9% y 13,6%, respectivamente) junto con un incremento de la CE (0,26 mS/cm). A nivel nutricional, no se observan desequilibrios nutricionales destacables, con buena reserva de todos los nutrientes. Las precipitaciones acumuladas entre noviembre y floración apenas superaron 200 mm al año para tres de los años estudiados, muy por debajo de la media del período 1998-2022, lo que se extiende hasta el enero, llegando apenas a 250 mm. Por otro lado, el único año que supera la media de precipitaciones es el año 2020, con 400 y 450 mm para ambos períodos (Fig.1).



El diseño experimental compara cinco formas de mantenimiento de la línea: **Herbicida**; **Intercepas**, aplicación de Sustrato Postcultivo de Champiñón (**SPCH**, procedente del cultivo de *Agaricus bisporus*, que se compone de paja, estiércol de ave y urea); Restos de madera de poda picados (**GPD**); y recubrimiento con **Paja** seca (procedente del sustrato postcultivo de *Pleurotus ostreatus*), dispuestos en tres bloques al azar, a modo de repeticiones. Las calles se mantienen con laboreo convencional y las cepas se sometieron al control de vegetación y tratamientos fitosanitarios necesarios, según las prácticas habituales en la zona. La parcela disponía de riego por goteo para realizar riegos de apoyo en situaciones de excesivo y continuado estrés hídrico.

En lo que compete a los resultados mostrados en este trabajo, se ha llevado a cabo una evaluación del estado nutricional del viñedo a partir del análisis de limbo y peciolo, en dos momentos del ciclo: floración y envero. En cada repetición, se muestrearon 30 hojas completas, sanas y totalmente desarrolladas, no senescentes, procedentes de 30 cepas representativas, de pámpanos fructíferos de vigor medio, en posición opuesta al primer racimo en floración y en posición opuesta al segundo racimo en el envero (Romero et al., 2010). Las diferentes exposiciones al sol también fueron consideradas, muestreándose ambos lados de la calle. Asimismo, en el momento de la vendimia se evaluaron diferentes componentes del rendimiento, contabilizándose pulgares, pámpanos y los racimos por cepa, y determinándose el peso del racimo y el rendimiento unitario por cepa para cada repetición.

Limbos y peciolos se lavaron con agua corriente y agua destilada y se secaron en estufa a 70°C. Las muestras secas se molieron con un molino ultracentrífugo de tamiz inferior a 0,5 mm. Se determinó el N total (N-orgánico+N-NH₄⁺) mediante el método Kjeldahl, y los nutrientes: P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, B y Na, mediante digestión con H₂SO₄ (95%) y H₂O₂ (30%) y determinación con ICP-AES. Las concentraciones se expresan en peso seco.

El estudio estadístico incluyó el test no paramétrico de Normalidad Shapiro-Wilks, el test de Levene para comprobar la homocedasticidad de los datos, así como la transformación a logaritmo cuando fue necesario. Para definir las diferencias entre tratamientos en cada momento de muestreo, los datos se analizaron mediante un procedimiento ANOVA, seguido del test de separación de medias Duncan, con un nivel de confianza $p \leq 0,05$. El programa estadístico utilizado ha sido el SPSS 22.0.

3. Resultados

En cuanto a componentes del rendimiento se refiere, se observa en general la tendencia del SPCH a una mayor producción unitaria por cepa y a un mayor peso de racimo respecto a Paja, Herbicida e Intercepas. Además, no se observaron diferencias en lo que respecta a vigor de la planta, valorado mediante el índice de Ravaz (datos no mostrados), lo que indicaría que a la mayor producción de uva en SPCH le acompañó una mayor producción de biomasa.

Respecto a los nutrientes y su disponibilidad se debe comentar primeramente que tanto limbo como peciolo mostraron resultados muy similares dentro de cada elemento, por lo que se muestra únicamente uno de estos tejidos para cada momento fenológico. Así, en general, el **nitrógeno en floración** muestra niveles más altos para el tratamiento SPCH en los tres ciclos de cultivo más secos (Fig. 1), sin mostrar diferencias en el año 2020, especialmente lluvioso (Fig. 1). Este resultado podría deberse al mayor aporte de nitrógeno asimilable que aportaría dicho



tratamiento, al conservar el SPCH estiércol y urea residual de la producción de champiñón. Además, en estos ciclos de cultivo, donde el desarrollo vegetativo se ve restringido por la limitación hídrica, se puede producir un efecto de concentración por ese desarrollo vegetativo más limitado. Por otro lado, el ciclo de cultivo 2020 no tendría estas limitaciones hídricas (Fig. 1) y el desarrollo vegetativo se vería favorecido por el mayor nivel de nitrógeno, por lo que el efecto de dilución para este nutriente, como consecuencia de una mayor producción de biomasa, se observaría principalmente en floración de este año (Fig. 3).

Por otro lado **en invierno**, cuando se reduce la demanda en años secos, la mayor disponibilidad en nitrógeno del SPCH volvería a constatarse, aunque también por el mismo motivo otros tratamientos, con menor desarrollo, acumularían nitrógeno y compensarían parcialmente las diferencias, como ocurriría para GPD, un tratamiento que también puede aportar nutrientes de origen orgánico (Fig. 3). En este sentido, la mayor producción de biomasa en SPCH quedaría constatada en la falta de diferencias en el Índice de Ravaz entre tratamientos (datos no mostrados), al registrar también mayor producción este tratamiento. Es de destacar que el tratamiento Paja mantiene niveles más bajos de nitrógeno en todo momento respecto a SPCH, lo que se debe atribuir a la demanda de este material, con alta relación C/N, que requiere nitrógeno para la mineralización de su materia orgánica, convirtiéndose en un competidor indeseado para la vid. De hecho, tras cuatro años de ensayo no se detecta que se produzca un retorno de nitrógeno disponible al suelo por la mineralización de este material (Fig. 3).

Por otro lado, el tratamiento GPD y, en menor medida el de Paja, parecen aportar o mantener, a medida que avanza el ensayo, cierta cantidad de **fósforo** asimilable frente a tratamientos como Intercepas o Herbicida, los cuales no han tenido fuente de recursos durante el transcurso del ensayo y presentan mayor dificultad para conservar humedad (Fig. 3). Al mismo tiempo, el tratamiento SPCH mostraría que este elemento sería uno de los más limitantes, al sufrir claramente procesos de dilución como consecuencia de su tendencia a mayor producción de biomasa, más acentuado en floración, y mayor producción, lo que se ve incrementado cuando la demanda aumenta por la disponibilidad hídrica, como es el caso de 2020 (Fig. 3).

El caso del **calcio** (Fig. 5), parece mantener un comportamiento similar al del fósforo, con menor concentración para SPCH frente a GPD y/o Paja. Se debe destacar que en este tratamiento, su menor producción de biomasa y su capacidad para mantener la humedad aumentarían la disponibilidad del fósforo en el tiempo, aunque pueda ser menor que en otros tratamientos, lo que le permitirá compensar sus concentraciones en la planta.

Respecto al **potasio** (Fig. 5), elemento con considerables necesidades anuales, parece detectarse cierta importancia del aporte procedente de GPD, y en menor medida de SPCH, frente a Herbicida e Intercepas, los cuales no tienen vía de reposición en estos tratamientos (Fig. 4). En el caso de SPCH, podría estar sufriendo procesos de dilución que, algunos años, enmascaran su mayor absorción frente a Intercepas y Herbicida. Por otro lado, es de destacar el comportamiento de la Paja en año húmedo, y en menor medida en seco, que por esa razón aprovecha la mayor disponibilidad de potasio frente a tratamientos sin aporte orgánico (Fig. 4).

Respecto al **magnesio** (Fig. 4), la contribución del SPCH parece hacerse notar en floración, aunque en general se compensa en invierno, lo que mostraría que este elemento no es especialmente limitante en el suelo de ensayo.



Por otro lado, respecto a los micronutrientes, parece observarse, algunos de los años, la contribución de SPCH y GPD frente a otros tratamientos. Este sería el caso para **hierro** (Fig. 5), **manganeso** (Fig. 6) y **cobre** en floración o el **boro** en enero (Fig. 7) en alguno de los años estudiados. Para estos elementos, dado el tipo de suelo que se trata, la disponibilidad hídrica y las diferencias en producción de biomasa pueden acrecentar o diluir las diferencias debidas a los tratamientos en floración, así como compensarlas a medida que se llega al enero, al reducirse los requerimientos. Un ejemplo de esto lo veríamos en el hierro (Fig. 5), donde la mayor producción de biomasa de SPCH en floración muestra diferencias frente a Paja e Intercepas, pero en enero quedan compensadas por la recuperación de niveles en dichos tratamientos.

En cuanto al **zinc** (Fig. 6) y el **sodio** (datos no mostrados), apenas se observaron diferencias entre tratamientos en los tejidos vegetales, por lo que el primero no parece ser un elemento limitante y el aporte de sodio con el SPCH apenas se hizo notar en este tipo de suelo.

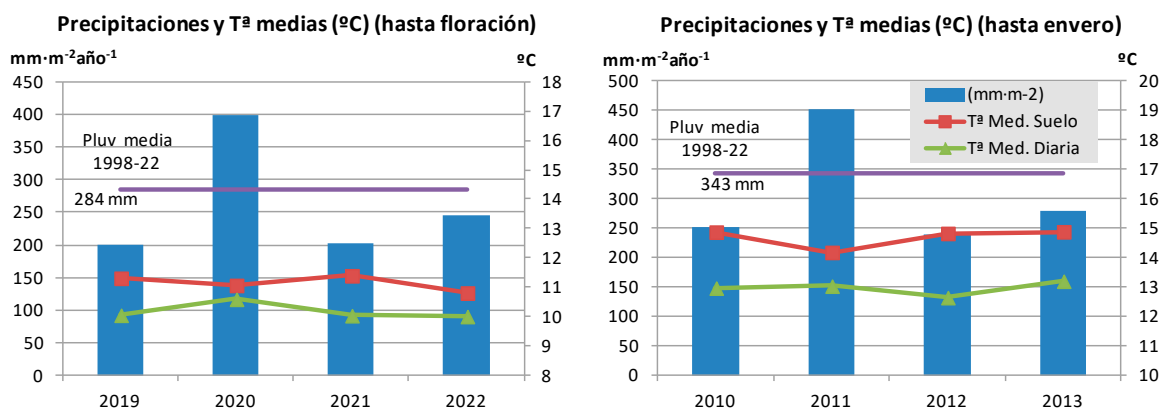


Fig. 1. Precipitaciones acumuladas, para los períodos desde noviembre a floración y a enero, y Temperaturas medias en los años de ensayo.

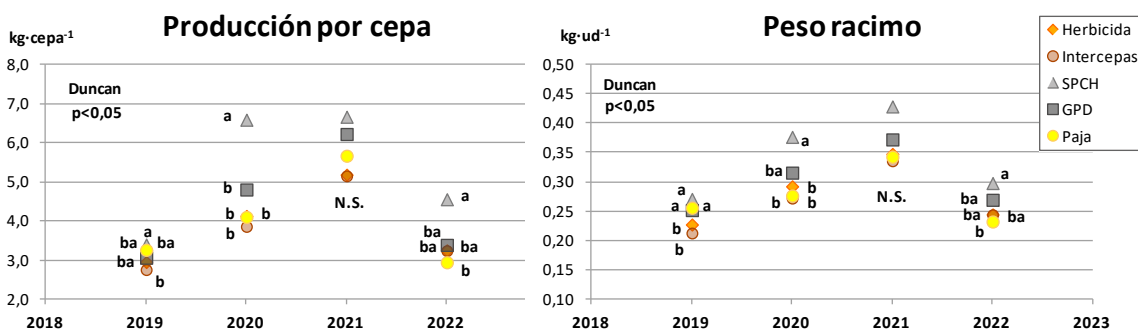


Fig. 2. Componentes del rendimiento. Letras diferentes en cada año indican diferencias significativas a $p < 0,05$ en el test de Duncan de separación de medias.

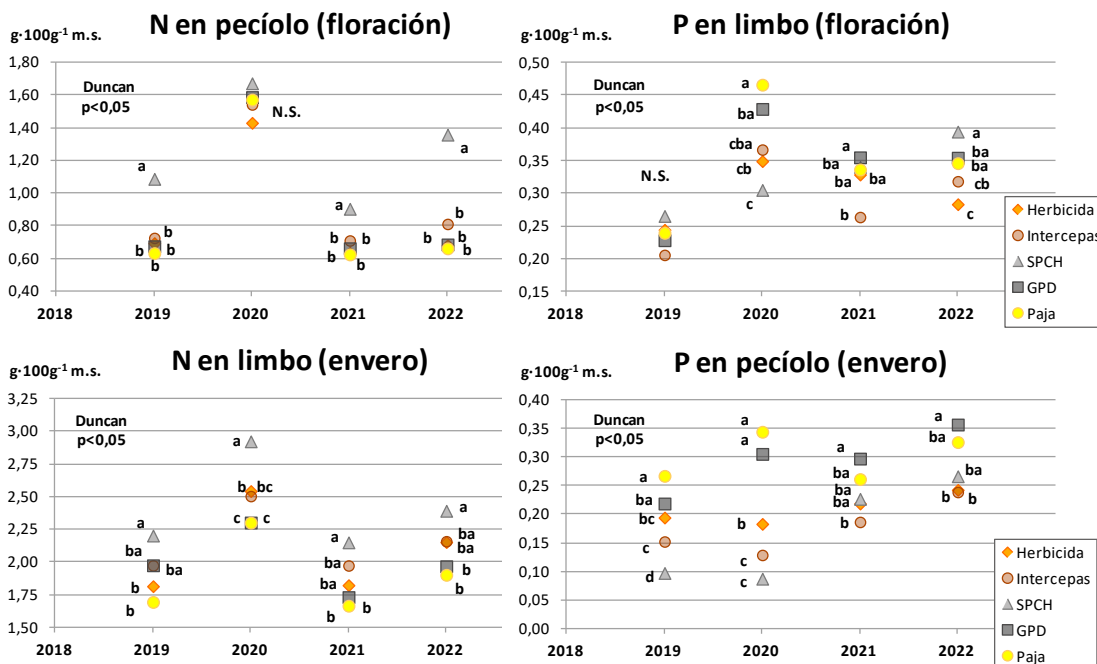


Fig. 3. Concentración de nitrógeno y fósforo en limbos y peciolo en los momentos fenológicos de floración y envero (g·100g⁻¹ en materia seca)

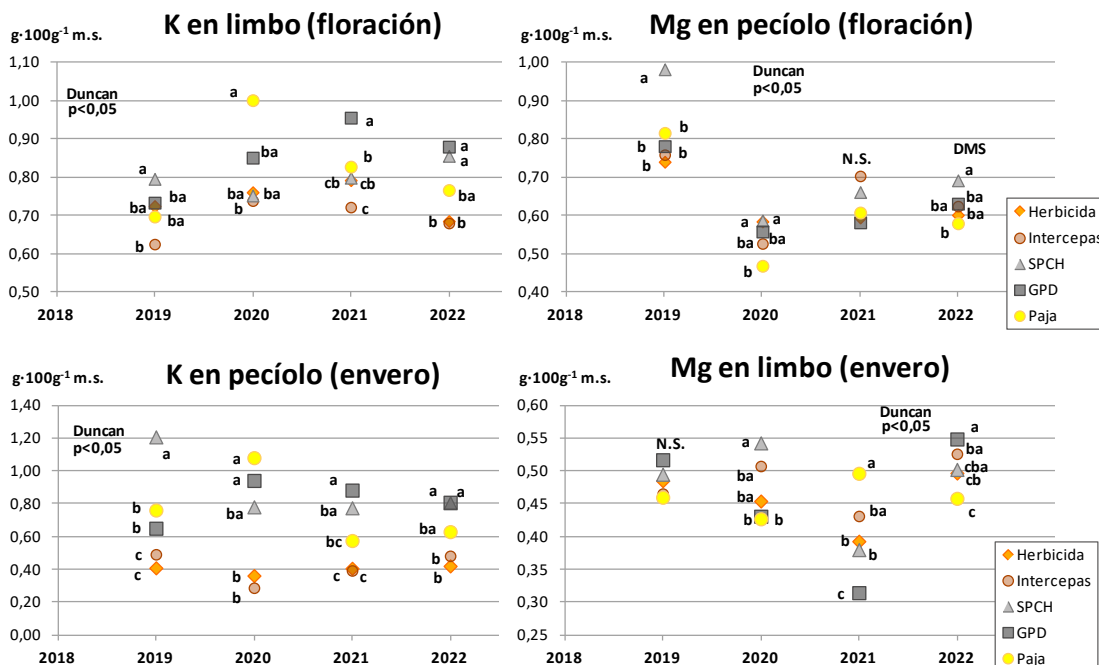


Fig.4. Concentración de potasio y magnesio en limbos y peciolo en los momentos fenológicos de floración y envero (g·100g⁻¹ en materia seca)

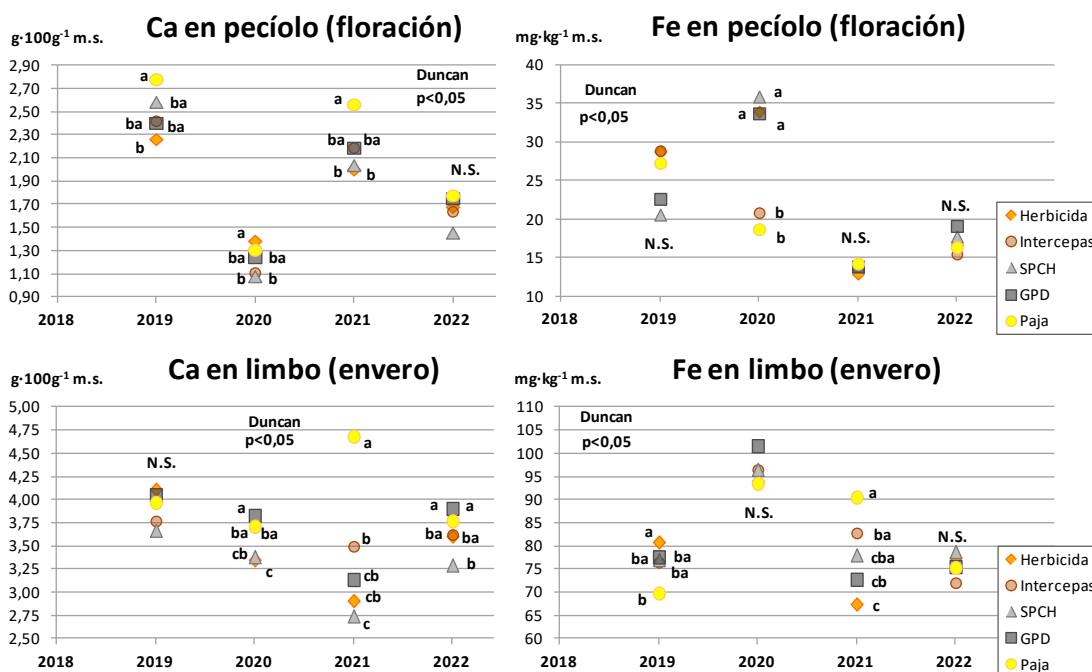


Fig.5. Concentración de calcio (g·100g⁻¹ materia seca) y hierro (mg·kg⁻¹ en m.s.) en limbos y peciolo en los momentos fenológicos de floración y envero.

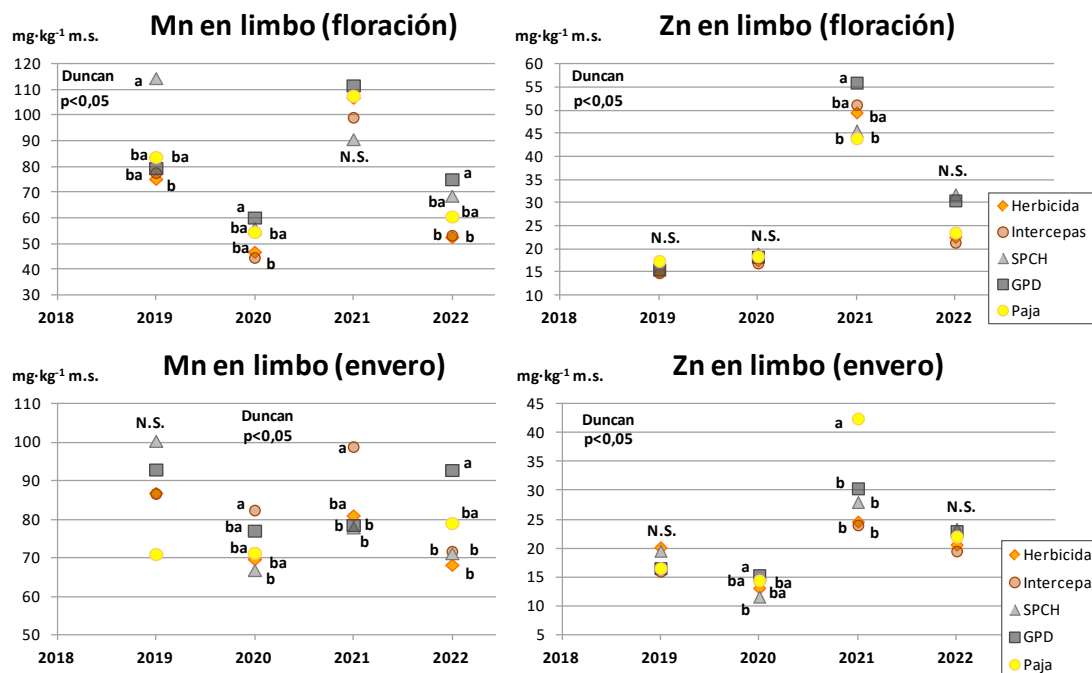


Fig.6. Concentración de manganeso y zinc (mg·kg⁻¹ en materia seca) en limbos en los momentos fenológicos de floración y envero.

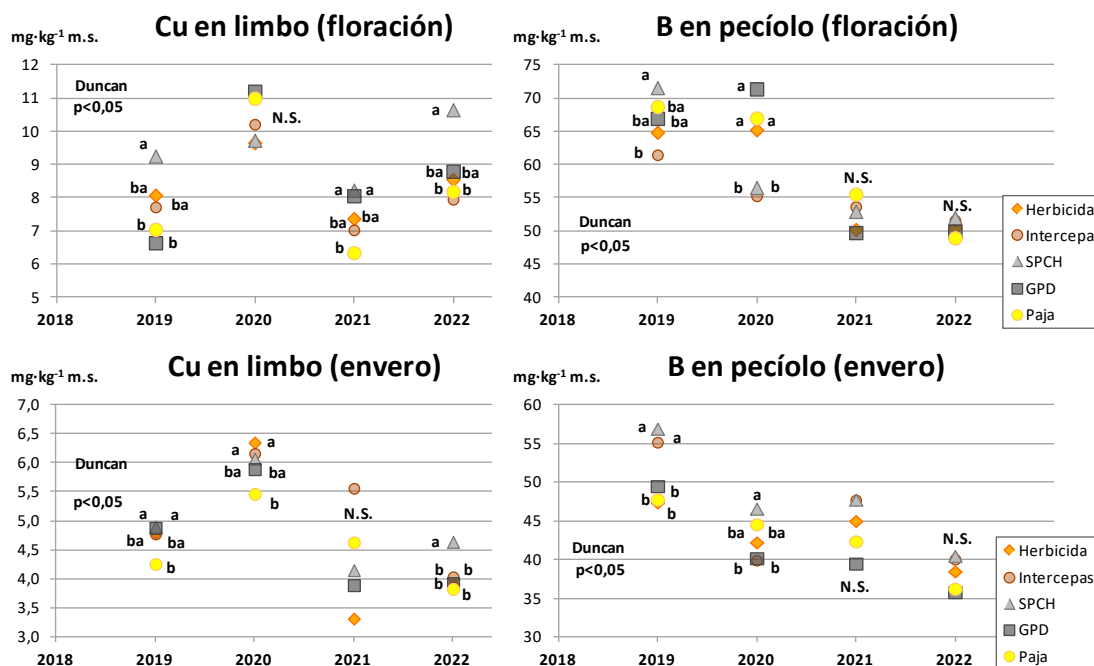


Fig.7. Concentración de cobre en limbo y boro en peciolo ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en materia seca) en los momentos fenológicos de floración y enero.

4. Conclusiones

En las condiciones del ensayo, el recubrimiento de la línea con SPCH parece aportar nitrógeno al viñedo en buena cantidad, mientras que GPD se muestra como una fuente de fósforo. Asimismo, ambos materiales aportan potasio y, en menor medida, magnesio y micronutrientes en general.

El recubrimiento con Paja limitaría la disponibilidad de nitrógeno, aunque su capacidad para mantener la humedad del suelo le permite aumentar la disponibilidad de absorción para la planta durante más tiempo, lo que le ayuda a compensar situaciones más limitantes, respecto a SPCH y/o GPD, para algunos nutrientes, como sería el caso de fósforo, calcio y potasio.

5. Bibliografía

1. ROMERO, I.; GARCÍA-ESCUADERO, E.; MARTÍN, I. 2010. **Effects of leaf position on blade and petiole mineral nutrient concentration of Tempranillo grapevine (*Vitis vinifera* L.).** Am. J. Enol. Vit., 61: 544-550.
2. ROMERO, I.; GARCÍA-ESCUADERO, E.; MARTÍN, I. 2013. **Leaf blade versus petiole analysis for nutritional diagnosis of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo.** Am. J. Enol. Vit., 64: 50-64.



6. Agradecimientos

Trabajo financiado por el Proyecto RTI-2018-095748-R-I00 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, con apoyo de Fondos FEDER. Agradecimiento al personal del Laboratorio Regional de La Grajera y del Servicio de Investigación Agraria y Sanidad Vegetal del Gobierno de La Rioja.

El análisis de la variación genómica intra-varietal de Tempranillo Tinto identifica sus principales rutas de diseminación en la Península Ibérica

Javier Tello^{1*}, Rafael Torres-Pérez², Yolanda Ferradás¹, Carolina Royo¹, Juan Carlos Oliveros², Javier Ibáñez¹, José Miguel Martínez-Zapater¹, Pablo Carbonell-Bejerano¹

¹ Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Finca La Grajera, Ctra. de Burgos Km. 6, 26007 Logroño.

² Centro Nacional de Biotecnología, C/Darwin 3, 28049 Madrid.

* 941 05 30 98, javier.tello@icvv.es

‘Tempranillo Tinto’ es la variedad más cultivada a nivel nacional, ocupando más de 200.000 hectáreas de viñedo y estando autorizada en gran parte de las Denominaciones de Origen del país. Esta variedad está altamente distribuida en la Península Ibérica, donde se la conoce bajo numerosas sinonimias, incluyendo ‘Cencibel’, ‘Tinta de Toro’, ‘Ull de Llebre’, y ‘Aragonez’. Igualmente, existen un gran número de clones registrados para su explotación comercial. El objetivo principal de este trabajo es cuantificar la variación genómica intra-varietal existente en esta variedad, mediante el estudio de 35 cepas procedentes de distintas regiones vitícolas ibéricas. La secuenciación completa de sus genomas y el análisis comparativo de las secuencias obtenidas permitió detectar 1.120 variaciones nucleotídicas puntuales (SNV). De ellas, un 87.9% fueron cepa-específicas, potencialmente útiles para la caracterización y seguimiento de selecciones clonales. Por otro lado, las SNVs detectadas en más de una cepa se usaron para inferir una red filogenética que reflejó el origen geográfico de las cepas estudiadas. En su conjunto, los resultados obtenidos ayudan a profundizar en el origen de ‘Tempranillo Tinto’, así como a analizar sus principales rutas de diseminación en la Península Ibérica, y abren la posibilidad de su uso para el seguimiento y diferenciación de clones.

1. Introducción

‘Tempranillo Tinto’ es la variedad de uva tinta más representativa de la viticultura española, estando autorizada en un gran número de Denominaciones de Origen del país. Su gran importancia a nivel nacional la convierte en una de las variedades de vid más cultivadas globalmente, con más de 200.000 hectáreas de viñedo dedicadas a su cultivo (www.oiv.int). Aparte de en España, el cultivo de ‘Tempranillo Tinto’ está autorizado en numerosas regiones vitícolas europeas (como en Portugal, Francia, e Italia), así como en Australia, Argentina, Estados Unidos, Nueva Zelanda, y Sudáfrica (entre otros) (Anderson y Nelgen, 2020). Además de como ‘Tempranillo Tinto’, a esta variedad se la conoce bajo otros nombres. Así, el Catálogo Internacional de Variedades de Vid (*Vitis* International Variety Catalogue - VIVC, www.vivc.de) recoge hasta 94 sinónimos para esta variedad, algunos tan conocidos a nivel nacional como ‘Cencibel’, ‘Tinta de Toro’, ‘Tinta de Madrid’, ‘Tinta del País’, y Ull de Llebre’. Además, en Portugal se la conoce bajo los nombres ‘Aragonez’ y ‘Tinta Roriz’, y en Estados Unidos como ‘Valdepeñas’.

‘Tempranillo Tinto’ surgió tras un cruce espontáneo entre las variedades ‘Benedicto’ y ‘Albillo Mayor’ (Ibáñez et al., 2012). Este evento dio lugar a una semilla con una combinación genética única, que germinó y dio lugar a la planta fundadora de esta variedad. Esta primera planta se propagó por esquejes para producir nuevas plantas que mantuvieran las características varietales de la planta original. No obstante, este proceso de multiplicación vegetativa es susceptible de ocasionar mutaciones espontáneas en el genoma de la planta original, que pueden tener (o no) efecto en el fenotipo. Independientemente de su efecto fenotípico, si estas variaciones



son estables se acumularán en el genoma de cada nueva generación (Carbonell-Bejerano et al., 2019), perpetuándose como marcadores que pueden servir hoy en día para investigar su proceso evolutivo. Así, el estudio de esta variación genómica intra-varietal permitirá revelar información sobre el origen de la variedad, así como de las posibles vías de diversificación vividas a lo largo de su historia.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la caracterización de la variación genómica intra-varietal global presente en la variedad 'Tempranillo Tinto'. Para ello, se ha analizado la secuencia completa del genoma de cepas de distinto origen. Este estudio ha permitido cuantificar y caracterizar dicha variación, así como analizar las principales rutas de diseminación de 'Tempranillo Tinto' en la Península Ibérica.

2. Material y Métodos

En este trabajo se han analizado 35 cepas de 'Tempranillo Tinto' procedentes de colecciones y viñedos antiguos de distintas regiones vitícolas de la Península Ibérica (Tabla 1). De cada cepa seleccionada se recogieron de 5 a 10 hojas jóvenes, de donde se extrajo el ADN genómico total según lo descrito en Tello et al. (2015). La identificación genética varietal de estas cepas se llevó a cabo mediante el análisis de siete marcadores microsatélites (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VVMD32, VVS2, VrZAG62, y VrZAG79), siguiendo el método descrito en Nebish et al. (2021). Tras confirmar su identidad, se procedió a la secuenciación de sus genomas completos en un equipo HiSeq 2500 de Illumina, empleando lecturas emparejadas de 125 nucleótidos de longitud. Las lecturas resultantes se alinearon usando un genoma de 'Tempranillo Tinto' de alta resolución como referencia, previamente desarrollado en nuestro grupo de investigación (Carbonell-Bejerano et al., en preparación). Una vez alineadas estas lecturas, las 35 secuencias genómicas resultantes se compararon entre sí para la detección masiva de variaciones nucleotídicas puntuales (SNV). Las SNVs inicialmente detectadas se filtraron siguiendo criterios basados en parámetros como la calidad de las lecturas, y la profundidad de secuenciación. Las SNVs resultantes de este proceso de cribado sirvieron para explorar las relaciones filogenéticas entre las 35 cepas analizadas, mediante el software POPART (Leigh y Bryant, 2015).

3. Resultados

En este trabajo se ha llevado a cabo la secuenciación y comparación del genoma completo de 35 cepas de 'Tempranillo Tinto' de distintas regiones vitícolas ibéricas. Tras el filtrado de las variaciones inicialmente detectadas en estos genomas, se obtuvieron 1.120 SNVs de alta calidad para profundizar en los procesos de evolución y diseminación de esta variedad en la Península Ibérica. Como se esperaba, estas variaciones se encontraron de manera aleatoria en los 19 cromosomas de 'Tempranillo Tinto', con una media de $58,9 \pm 13,7$ SNVs por cromosoma. De ellas, 985 (87.9%) se detectaron en una única cepa (Fig. 1), con una media de $28,1 \pm 11,9$ SNVs por cepa. Debido a su alta especificidad, estas variaciones resultan potencialmente útiles para el seguimiento de las selecciones clonales incluidas en este trabajo (Tabla 1).

Las 135 SNVs restantes (12,1%) se detectaron en más de una cepa (Fig. 1). El estudio detallado de estas 135 SNVs en las 35 cepas estudiadas permitió diferenciar hasta 16 genotipos distintos (Tabla 2). El genotipo más común (GTT-6) se encontró siete veces, en cepas procedentes



de cinco regiones vitícolas: Navarra (dos cepas), La Mancha, Ribera del Duero, Rioja (2 cepas), y Portugal. Igualmente, el genotipo GTT-12 se encontró cuatro veces (exclusivamente en cepas de Ribera del Duero), mientras que el genotipo GTT-11 se encontró tres veces (exclusivamente en cepas de la región vitícola de Toro). Además, cinco genotipos (GTT-4, GTT-5, GTT-9, GTT-13, y GTT-14) se encontraron una única vez.

La red filogenética inferida para estos 16 genotipos indicó un papel clave para cuatro SNVs: SNV-1, SNV-2, SNV-3, y SNV-4, detectadas en los cromosomas 4, 6, 7, y 8, respectivamente (Fig. 2). Estas cuatro SNVs clave dividieron los genotipos de 'Tempranillo Tinto' en tres grupos principales, o linajes: Linaje A, Linaje B, y Linaje C (Fig. 2). El Linaje A está formado por ocho genotipos (detectados en 19 cepas), todos homocigotos para las cuatro SNVs clave (Tabla 3). Entre las cepas que integran este linaje encontramos una procedente de la región vitícola de La Mancha, cuatro de Navarra, una de Portugal, dos de Ribera del Duero, y 11 de Rioja. El hecho de que este grupo aglutine todas las cepas estudiadas procedentes de Navarra y la gran mayoría de las de Rioja sugiere que el Linaje A es característico de zonas vitícolas del Valle del Ebro. Por otro lado, el Linaje B está formado por únicamente dos genotipos (Fig. 2), todos heterocigotos para SNV-1 y SNV-2, y homocigotos para SNV-3 y SNV-4 (Tabla 3). Estos dos genotipos se encontraron en tres cepas de viñedos viejos de Rioja Alta y Rioja Alavesa (en los municipios de Ábalos, Leza, y Oyón). Por último, el Linaje C agrupa seis genotipos (detectados en 13 cepas) (Fig. 2), todos heterocigotos para las cuatro variaciones clave (Tabla 3). Entre las cepas de este linaje encontramos tres de la zona vitícola de Toro, cuatro de Ribera del Duero, y seis de Portugal. Este hecho sugiere que el Linaje C es propio de las zonas vitícolas del Valle del Duero.

La disponibilidad de la secuencia completa de los genomas de los dos progenitores de 'Tempranillo Tinto' (Carbonell-Bejerano et al., en preparación) nos permitió extraer el genotipo de 'Benedicto' y de 'Albillo Mayor' en las cuatro SNVs clave indicadas anteriormente. Así, tanto 'Benedicto' como 'Albillo Mayor' son dos variedades homocigotas para esas cuatro posiciones (Tabla 3). Esta particularidad nos ha permitido deducir que la planta original de 'Tempranillo Tinto' fue homocigota para esas cuatro posiciones, por lo que presentaría un genotipo muy similar al de los genotipos de 'Tempranillo Tinto' asociados al Linaje A, propio del Valle del Ebro. Estos resultados sugieren que 'Tempranillo Tinto' se habría originado en el Valle del Ebro. Este hallazgo concuerda con referencias históricas que indican esta zona como la zona de origen de esta variedad (García de los Salmenes, 1914), así como con la presencia de cepas centenarias de ambos progenitores en esta región (Ibáñez et al., 2012).

Nuestros resultados filogenéticos indican que sólo una pequeña parte de la diversidad genética de las cepas de 'Tempranillo Tinto' existente dentro del Linaje A habría servido de base para generar la diversidad encontrada en el resto de linajes (Fig. 2). Así, los seis genotipos del Linaje C se habrían originado a partir de un único genotipo (GTT-6), que habría sido el origen del material vegetal transferido del Valle del Ebro al Valle del Duero. Concretamente, nuestros resultados indican que esta transferencia inicial habría tenido lugar hacia regiones de la zona vitícola actual de Ribera del Duero. Posteriormente, la diversidad desarrollada en esta zona habría sido determinante a la hora de extender el cultivo de 'Tempranillo Tinto' a otras zonas del Valle del Duero, derivando en la generación de genotipos específicos de las zonas vitícolas actuales de Toro y Portugal. A lo largo de esta ruta principal de diseminación Valle del Ebro – Valle del Duero, se habrían originado los dos genotipos de 'Tempranillo Tinto' que forman el Linaje B. Esta diversidad habría tenido menor impacto en otras regiones, quedando confinada en viñedos antiguos de las zonas vitícolas actuales de Rioja (Rioja Alta y Rioja Alavesa).



Por último, cabe destacar que se han detectado algunas cepas de zonas vitícolas de La Mancha, Portugal, y Ribera del Duero con genotipos característicos del Linaje A (Fig. 2). Este hecho indica que estas cepas no habrían seguido la ruta de diseminación principal Valle del Ebro – Valle del Duero comentada anteriormente, sino que serían fruto de la transferencia directa (y probablemente, más reciente) de material vegetal desde el Valle del Ebro.

Tabla 1. Origen de las cepas de ‘Tempranillo Tinto’ utilizadas en este trabajo.

Nombre	Origen Geográfico	Región vitícola	Procedencia
-	Ábalos (La Rioja)	Rioja	Viñedo antiguo
-	Ábalos (La Rioja)	Rioja	Viñedo antiguo
523-SA-04	Ablitas (Navarra)	Navarra	Colección (UPNA)
Clon 41	Aguilar del Río Alhama (La Rioja)	Rioja	Colección (ICVV)
Clon 115	Alcanadre (La Rioja)	Rioja	Colección (ICVV)
T82	Aras (Navarra)	Navarra	Colección (EVENA)
TT-280	Argujillo (Zamora)	Toro	Colección (ITACYL)
T136	Artazul (Navarra)	Navarra	Colección (EVENA)
TP-261	Atauta (Soria)	Ribera del Duero	Colección (ITACYL)
1-15	Caleruega (Burgos)	Ribera del Duero	Colección (Vitis Navarra)
65-11	Canalejas de Peñafiel (Valladolid)	Ribera del Duero	Colección (Vitis Navarra)
Cencibel	Castilla La Mancha	La Mancha	Colección (UCLM)
-	Leza (Álava)	Rioja	Viñedo antiguo
-	Leza (Álava)	Rioja	Viñedo antiguo
-	Leza (Álava)	Rioja	Viñedo antiguo
-	Leza (Álava)	Rioja	Viñedo antiguo
TT326	Morales de Toro (Zamora)	Toro	Colección (ITACYL)
-	Oyón (Álava)	Rioja	Viñedo antiguo
-	Oyón (Álava)	Rioja	Viñedo antiguo
-	Oyón (Álava)	Rioja	Viñedo antiguo
RZ 0168	Portugal	Portugal	Colección (ULisboa)
RZ 0452	Portugal	Portugal	Colección (ULisboa)
RZ 0616	Portugal	Portugal	Colección (ULisboa)
RZ 1103	Portugal	Portugal	Colección (ULisboa)
RZ 1218	Portugal	Portugal	Colección (ULisboa)
RZ 1512	Portugal	Portugal	Colección (ULisboa)
RZ 6204	Portugal	Portugal	Colección (ULisboa)
T3	Sada (Navarra)	Navarra	Colección (EVENA)
-	S. Vicente de la Sonsierra (La Rioja)	Rioja	Viñedo antiguo
-	S. Vicente de la Sonsierra (La Rioja)	Rioja	Viñedo antiguo
-	S. Vicente de la Sonsierra (La Rioja)	Rioja	Viñedo antiguo
TP-98	Valbuena de Duero (Valladolid)	Ribera del Duero	Colección (ITACYL)
50-1	Valcavado de Roa (Burgos)	Ribera del Duero	Colección (Vitis Navarra)
TT-271	Valdefinjas (Zamora)	Toro	Colección (ITACYL)
32-4	Villaverde de Montejo (Segovia)	Ribera del Duero	Colección (Vitis Navarra)



Tabla 2. Frecuencia de los 16 genotipos de ‘Tempranillo Tinto’ (GTT) detectados en base a 135 variaciones nucleotídicas puntuales (SNV), y regiones vitícolas donde se han encontrado.

Nombre	Linaje	Frecuencia (n)	Región vitícola
GTT-1	A	2	Rioja
GTT-2	A	2	Ribera del Duero, Rioja
GTT-3	A	2	Rioja
GTT-4	A	1	Navarra
GTT-5	A	1	Rioja
GTT-6	A	7	Navarra, La Mancha, Ribera del Duero, Rioja, Portugal
GTT-7	A	2	Navarra, Rioja
GTT-8	A	2	Rioja
GTT-9	B	1	Rioja
GTT-10	B	2	Rioja
GTT-11	C	3	Toro
GTT-12	C	4	Ribera del Duero
GTT-13	C	1	Portugal
GTT-14	C	1	Portugal
GTT-15	C	2	Portugal
GTT-16	C	2	Portugal

Tabla 3. Genotipo detectado en las cuatro variaciones nucleotídicas puntuales (SNVs) más comunes en los genotipos de ‘Tempranillo Tinto’ (GTT) de los tres linajes detectados en este trabajo (A, B, y C), ‘Benedicto’ y ‘Albillo Mayor’.

Genotipo	SNV-1	SNV-2	SNV-3	SNV-4
GTT – Linaje A	G:G	C:C	A:A	C:C
GTT – Linaje B	C:G	A:C	A:A	C:C
GTT – Linaje C	C:G	A:C	A:G	C:T
‘Benedicto’	G:G	C:C	A:A	C:C
‘Albillo Mayor’	G:G	C:C	A:A	C:C

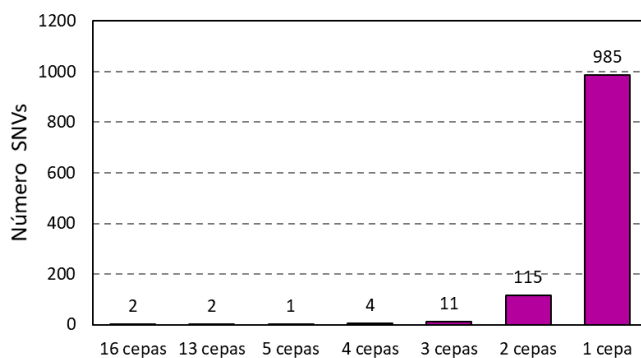


Fig. 1. Número y frecuencia de las variaciones nucleotídicas puntuales (SNVs) detectadas tras el análisis del genoma completo de 35 cepas de ‘Tempranillo Tinto’.

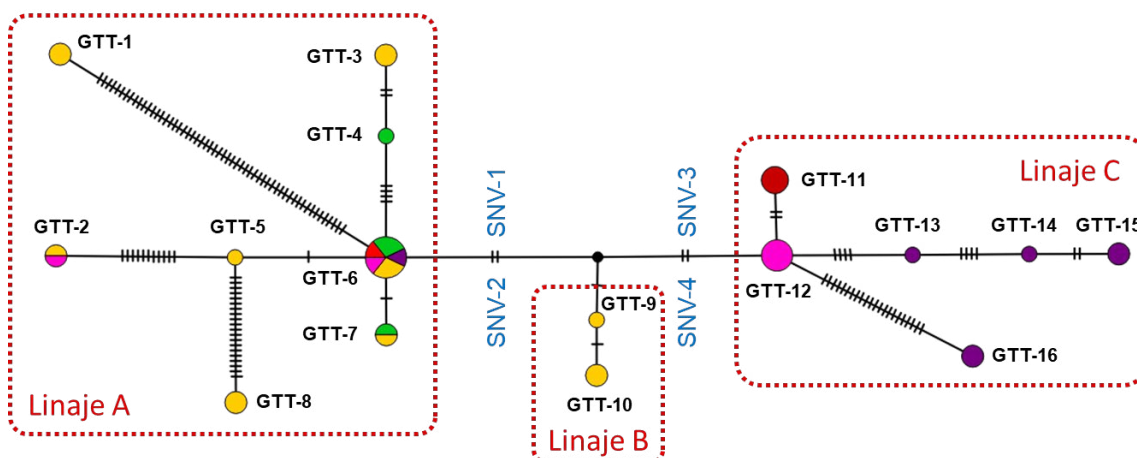


Fig. 2. Relación filogenética obtenida a partir de la variación genómica intra-varietal observada en 135 variaciones nucleotídicas puntuales (SNV) en 35 cepas de 'Tempranillo Tinto'. Cada genotipo (GTT) está representado por un círculo, cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Su color indica la zona vitícola de procedencia de las cepas analizadas (Rojo: La Mancha; Verde: Navarra; Morado: Portugal; Amarillo: Rioja; Rosa: Ribera del Duero; Marrón: Toro).

4. Conclusiones

El análisis de la variación genómica intra-varietal de 'Tempranillo Tinto' ha permitido detectar variaciones puntuales clave en el proceso de diversificación y diseminación de esta variedad a lo largo de la Península Ibérica. Nuestros resultados indican que esta variedad pudo haberse originado en la zona del Valle del Ebro, desde donde se habría dispersado a otras zonas vitícolas de la Península. La ruta principal de diseminación detectada en este trabajo habría contado con un punto clave de diversificación en zonas de la actual Ribera del Duero, de donde habría surgido el material vegetal presente en otras zonas vitícolas más occidentales del Valle del Duero. Por otro lado, se han detectado un gran número de variaciones específicas de cepa, potencialmente útiles para el seguimiento y diferenciación de selecciones clonales. El presente trabajo indica que el estudio comparativo de los genomas de variantes clonales de vid es una aproximación capaz de suministrar información útil para desentrañar el origen y evolución de variedades de vid de interés comercial y patrimonial.

5. Bibliografía

1. ANDERSON, K.; NELGEN, S. 2020. **Which winegrape varieties are grown where? A global empirical picture**. University of Adelaide Press. ISBN: 978-1-925261-86-8
2. IBÁÑEZ, J.; MUÑOZ-ORGANERO, G.; ZINELABIDINE, L.H.; DE ANDRÉS, M.T.; CABELLO, F.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2012. **Genetic origin of the grapevine cultivar Tempranillo**. American Journal of Enology and Viticulture 63:4 549-553
3. CARBONELL-BEJERANO, P.; ROYO, C.; MAURI, N.; IBÁÑEZ, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2019. **Somatic variation and cultivar innovation in grapevine**. In: **Advances in grape and wine biotechnology**. IntechOpen. ISBN: 978-1-78984-613-3



4. TELLO, J.; TORRES-PÉREZ, R.; GRIMPLET, J.; CARBONELL-BEJERANO, P.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; IBÁÑEZ, J. 2015. **Polymorphisms and minihaplotypes in the VvNAC26 gene associate with berry size variation in grapevine.** BMC Plant Biology 15:253
5. NEBISH, A.; TELLO, J.; FERRADÁS, Y.; AROUTIOUNIAN, R.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; IBÁÑEZ, J. 2021. **SSR and SNP genetic profiling of Armenian grape cultivars gives insights into their identity and pedigree relationships.** OENO One 55:4 101-114
6. LEIGH, J.W.; BRYANT, D. 2015. **POPART: full-feature software for haplotype network construction.** Methods in Ecology and Evolution 6 1110-1116
7. GARCÍA DE LOS SALMONES, N. 1914. **Memoria general de las sesiones del congreso y ponencias presentadas.** Imprenta Provincial, Pamplona

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos “Análisis y aplicación de la variación somática para la innovación varietal de la vid” (BIO2017-86375-R) y “Diversidad genética en la vid y adaptación al cambio climático” (PID2020-117681RB-I00), financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad a través de la Convocatoria de Proyectos I+D+i del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los Retos de la Sociedad. Javier Tello agradece su ayuda posdoctoral Juan de la Cierva - Incorporación (IJC2018-035036-I) financiada por MCIN/AEI /10.13039/501100011033. Agradecemos a J.F. Cibrián (EVENA), E. Baroja, E. García-Escudero (ICVV), J. Yuste (ITACYL), L.G. Santesteban (UPNA), R. García, J. Eraso (Vitis Navarra), M. Mena (UCLM), y A. Martins (ULisboa) por la cesión de parte del material vegetal incluido en este estudio. Igualmente, agradecemos a los viticultores de La Rioja por la localización de las cepas de viñedos antiguos incluidas en este trabajo.

Enfermedades víricas en viticultura: prevalencia de virus de testaje obligatorio y otros virus en viñedos

Sara Crespo-Martínez¹, Oihane Oneka¹, Nahiara Juanena-Ayestarán¹, Daniel Fernández-Beré, Jorge Urrestarazu¹, Luis Gonzaga Santesteban¹

Dpto. Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadía, 31006 Pamplona, Navarra, España. 948 16 912. sara.crespo@unavarra.es

Resumen

Las enfermedades víricas están presentes de forma histórica en los viñedos, generando problemas en el desarrollo de la planta y la calidad de la uva. La gran difusión de ArMV, GFLV, GFkV, GLRaV-1 y GLRaV -3 incentivó la generación de legislación para su control en los años 60. Sin embargo, otros muchos agentes víricos no se inspeccionan. En este trabajo se recogieron los datos de presencia de nueve virus por RT-PCR en i) viñas viejas del norte de España, así como en ii) material vegetal certificado, generando una visión del estado vírico sanitario. Por un lado, la incidencia de cuatro virosis de testaje obligatorio (GFLV, GFkV, GLRaV-1 y GLRaV -3) difirió mucho entre los dos tipos de material vegetal (i>ii), lo que prueba la efectividad de aplicar medidas de control. Por el contrario, para la incidencia de otros virus, solo hubo diferencias entre los dos tipos de material para el virus GLRaV-2 PN, que fue mayor en viñas viejas. En cuanto a los virus relacionados con la enfermedad de la madera rizada (RSPaV, GVA, GVB y GVD), la presencia del virus RSPaV es generalizada ($\approx 80\%$) mientras que GVA y GVB tuvieron una presencia anecdótica y GVD no apareció. La alta incidencia de algunas de estas virosis (i \approx ii) refleja la falta de medidas de control.

1. Introducción

Las enfermedades víricas tienen una gran importancia en el sector vitivinícola debido a su impacto en la maduración de la uva, en los rendimientos en vendimia, así como en la salud fisiológica de la planta (Meng et al., 2017). Hasta el momento, se han descrito más de 80 especies de virus cuyo huésped es la vid cultivada (*Vitis vinifera* L.) (Fuchs, 2020). Algunos de esos agentes víricos son de especial importancia por su virulencia, además de su amplia presencia a nivel mundial por lo que su control está contemplado en la directiva europea (The European Commission, 2019). Estos virus son el virus del entrenudo corto (*Grapevine Fanleaf Virus*, GFLV) y el virus del mosaico de Arabis (*Arabis Mosaic Virus*, ArMV) del género *Nepovirus*, los virus del entrenudo corto 1 y 3 (GLRaV-1 y -3) del género *Ampelovirus*, para todos los vegetales de plantación (distintos de las semillas) pertenecientes al género *Vitis* L., y, además de los anteriores, el virus del jaspeado (*Grapevine Fleck Virus*, GFkV) del género *Maculavirus* en portainjertos de *Vitis* spp. y sus híbridos, excepto *Vitis vinifera* L..

A pesar de no estar contemplados en la legislación, la presencia de otros agentes víricos es frecuente en los viñedos europeos produciendo algunos de ellos virulentas enfermedades. Tal es el caso del complejo de la madera rizada (RWC) causada por la presencia combinada de varios virus: el virus de Rupestris (*Rupestris Stem-associated*



Virus, RSPaV), el virus A de la vid (*Grapevine Virus A*, GVA), el virus B de la vid (*Grapevine Virus B*, GVB) y, además, el virus D de la vid (*Grapevine virus D*, GVD) también podría estar implicado (Martelli, 2014). De forma aislada, esos virus producen también otros desórdenes relacionados con enfermedades de la madera: RSPaV se relaciona con picaduras del tallo de Rupestris (*Rupestris stem pitting*) (Meng et al., 1999), GVA se asocia con Kober tallo ranurado (Kober stem grooving) (Garau et al., 1994), GVB se asocia con LN33 Tallos Surcados (*LN 33 stem grooving*) y GVD con la corteza de corcho (*corky bark*) (Bonavia et al., 1996). Los síntomas principales incluyen surcos y picaduras en el tejido leñoso bajo la corteza de la planta y la muerte del tejido del floema. Otro de los virus con una presencia importante es la variante 2 del virus del enrollado (GLRaV-2). Este virus tiene una gran variabilidad genética, por lo que existen diferentes cepas del virus que producen diferentes desórdenes. La cepa GLRaV-2 Pinot noir (GLRaV-2 PN) es el más frecuente en todo el mundo (Angelini et al., 2017). Todas estas enfermedades se transmiten típicamente a través del material vegetal y la eliminación de su presencia no suele ser fácil, de ahí la importancia de la prevención.

En este trabajo se han recopilado los resultados de todos los testajes de virosis (GFLV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-2 PN, RSPaV, GVA, GVB y GVD) realizados en nuestro laboratorio durante los años 2020, 2021 y 2022 con el fin de tener una visión general de la incidencia de virosis principales, recogidas en la legislación, así como otras virosis. Estos resultados se han clasificado teniendo en cuenta el tipo de material vegetal (bien sea viña vieja o material certificado) para comparar su incidencia y evaluar la eficacia de los métodos actuales de testaje.

2. Material y Métodos

Material vegetal

Los testajes se llevaron a cabo a lo largo de los años 2020, 2021 y 2022. Se testaron dos tipos de material vegetal: plantas de viñas viejas (498 plantas) en puntos de Navarra, Álava y Burgos, así como material certificado (294 plantas) (Fig. 1). El material vegetal proveniente de viñas viejas fue obtenido de viñas de más de 50 años, cuando no existía obligatoriedad del control de las enfermedades víricas mientras que, el material vegetal certificado, bien fuesen injertos o plantas de campos madre, ha sido sometido a los controles víricos actuales. Para determinar su estado sanitario mediante PCR se utilizaron hojas o sarmiento, dependiendo de la época del año en que se muestreó, y el material vegetal se conservó en frío hasta su análisis.

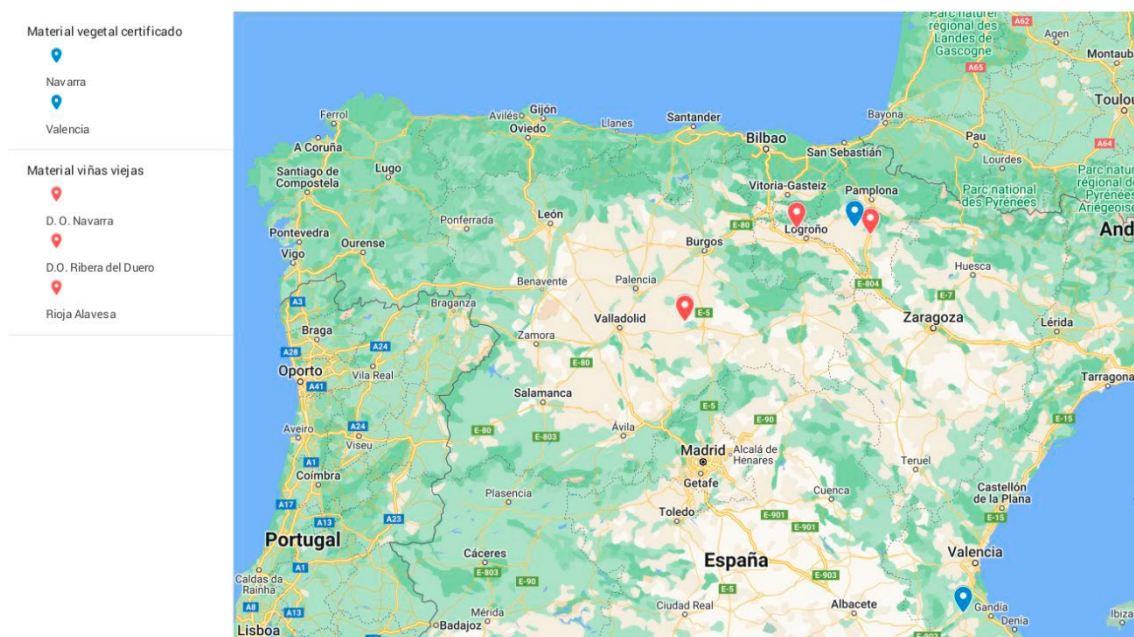


Fig. 1. Mapa de las zonas de donde se obtuvieron las muestras de viñas viejas (marcadores rojos) y de material certificado (marcadores azules) incluidas en este trabajo. (Fuente: Google maps)

Detección de virus

Para la detección de virus por PCR a tiempo real (RT-PCR), en primer lugar, se realizó el aislamiento de ARN total de hojas con el kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich, USA). Después se retro-transcribieron 500 ng (PrimeScript RT Reagent Kit, Takara Bio Inc., Japón) para la síntesis de cDNA. Para la amplificación se usaron 10 ng de cDNA, 1x TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., Japón), 0,4 μ M de cebadores directos e inversos específicos para cada virus (Tabla 1) y 1x ROX en un volumen final de 10 μ l. La amplificación en tiempo real se llevó a cabo en un termociclador ABI StepOne (Applied Biosystems, USA). Los cebadores para GFLV y GFKV fueron diseñados en este trabajo y las condiciones de amplificación fueron: 95 °C durante 5 s; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min. Los cebadores para GLRaV-1, GLRaV-2 PN, GLRaV-3, GVA, GVB y RSPaV fueron tomados de otras publicaciones y las PCRs se corrieron según las condiciones publicadas en los trabajos originales (Tabla 1).

En cuanto al análisis estadístico, la diferente incidencia de virosis en los diferentes tipos de material vegetal se evaluó mediante el test t de Student ($p < 0.05$) a través del programa estadístico SPSS (George and Mallery, 2021).



Tabla 1. Cebadores de ADN utilizados para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para los diferentes virus de la vid testados (GFLV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-2 PN, GVA, GVB, y RSPaV).

Agente vírico	Secuencia	Referencia
Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)	F: TGGAACGGGACCACTATGGA R: CAGGCGTTCGGTGATATGGA	Este trabajo
Grapevine Fleck Virus (GFkV)	F: CTGCTGTCTCTAGCTCTCGC R: GAGGTGTAGGAGGACTCGGT	Este trabajo
Grapevine Leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)	F: ACCTGGTTGAACGAGATCGCTT R: GTAAACGGGTGTTCTTCAATTCTCT	(Osman et al., 2007)
Grapevine Leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)	F: AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGAGTGA R: GTATTGGACTACCTTTCGGGAAAAT	(Osman et al., 2007)
Grapevine Leafroll-associated virus strain PN (GLRaV-2 PN)	F: CATTATATTCTTCATGCCTCTCAGGAT R: GATGACAACCTCTGTCCGCTATAGC	(Osman et al., 2007)
Grapevine Virus A (GVA)	F: GACAAATGGCACACTACG R: AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG	(Poojari et al., 2016)
Grapevine Virus B (GVB)	F: CTAGGAGTGCGGCTAAACGAA R: CCATATCACAGGACGAGGTTAAGG	(Osman et al., 2013)
Rupestris Stem Pitting-associated Virus (RSPaV)	F: GATGAGGTCCAGTTGTTTCC R: ATCCAAAGGACCTTTTGACC	(Meng et al., 1999)

3. Resultados

Respecto a los virus de testaje obligatorio los de mayor incidencia en viñas viejas fueron GFLV y GFkV con una tasa alrededor del 25%. En cuanto a los virus del enrollado (GLRaV-1 y GLRaV-3) la tasa fue de \approx 13%. La diferencia fue sustancial con respecto al material certificado y mostraron todas ellas tasas significativamente mayores en el material antiguo (Fig. 2). El material vegetal certificado tuvo una incidencia de alrededor del 1% para GFLV, GFkV, y GLRaV-3 y de 3% para GLRaV1. Estas diferencias se cuantificaron en 24% para GFLV, 23% para GFkV, 9% para GLRaV-1 y 12% para GLRaV-3. La diferente incidencia entre el material de viñas viejas y el material certificado demuestra la eficacia de la aplicación de medidas de control, a pesar de que también parte de esa incidencia se pueda deber a la infección de las vides en campo a través de sus conocidos vectores.

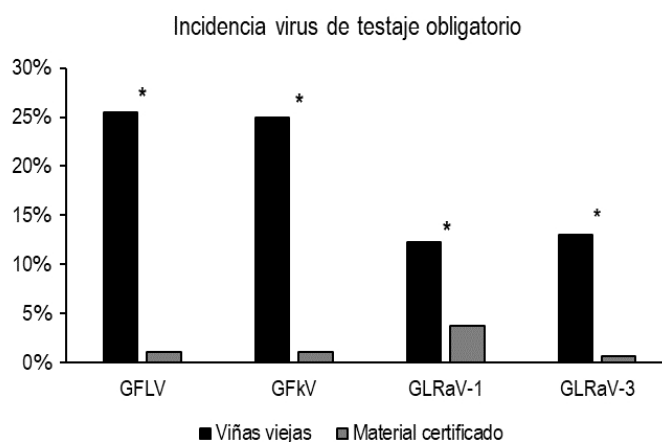


Fig. 2: Incidencia de cuatro virosis oficiales testadas tanto en material vegetal de viñas viejas como en material certificado. * representa diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de material vegetal en el test t de Student ($p < 0.05$).



Es posible que la mayor parte de las virosis oficiales detectadas en el material certificado se debieron a la mayor sensibilidad que ofrece la técnica de detección utilizada en este trabajo, la PCR, respecto a las técnicas utilizadas de forma rutinaria en el certificado de material vegetal (Elisa). Esto permitió detectar muestras infectadas con cargas víricas bajas e indetectables con aquellas técnicas. Como ya se ha planteado previamente (Golino et al., 2017), la actualización del uso de tecnologías mejoradas (como las genéticas RT-PCR o la secuenciación) en la legislación actual mejoraría la identificación de virosis. No sólo por su mayor sensibilidad, sino que además la posibilidad de muestrear a lo largo de todo el año, sin tener en cuenta las cargas víricas estacionales, facilitaría su control.

En cuanto a las otras virosis, su incidencia en los dos tipos de material vegetal no varió tanto como en el caso de los virus de testaje oficial, lo que se puede atribuir a la falta de control sanitario oficial (Fig. 3). A pesar de ello, se obtuvieron diferencias significativas en la presencia de GLRaV-2 PN, que fue mayor en el material de viñas viejas (31%) que en el material vegetal (5%). Esta diferencia puede estar relacionada con su similitud tanto genéticamente como en sintomatología con los virus de testaje obligatorio GLRaV-1 y GLRaV-3 que puede facilitar su diagnóstico. La incidencia de los virus GVA, GVB, GVD y RSPaV no mostró diferencias entre el material certificado y el de viñas viejas. La presencia de GVA y GVB fue anecdótica ($\approx 1\%$) en viñas viejas y su ausencia fue total en el material certificado, mientras que GVD no se detectó en ninguna muestra. Finalmente, el virus RSPaV está altamente diseminado y su presencia no difirió entre el material de viñas viejas (73%) y el certificado (79%).

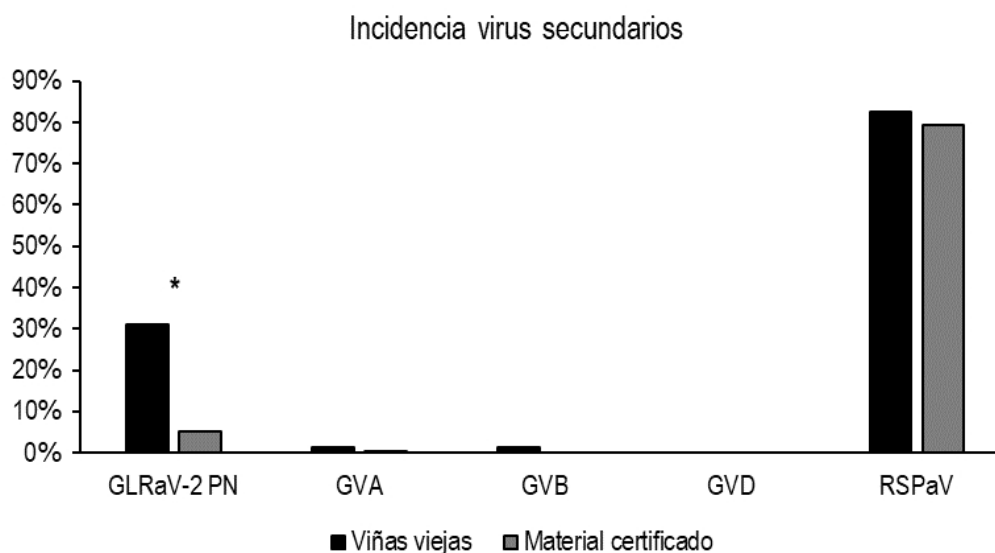


Fig. 3: Incidencia GLRaV-2 PN, GVA, GVB, GVD y RSPaV, virosis no incluidas en los testajes oficiales, que han sido testadas tanto en material vegetal de viñas viejas como en material certificado. * representa diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de material vegetal en el test t de Student ($p < 0.05$).



A pesar de la controlada aparición del virus GLRaV-2 PN (5% en material certificado), este virus produce síntomas graves, por lo que su control ha de ser estricto. Las plantas infectadas con la variante PN del virus muestran tanto síntomas de enrollado como de incompatibilidad del injerto (Bertazzon et al., 2010). La incompatibilidad depende de las combinaciones utilizadas, por ejemplo, se ha demostrado la mortalidad en injertos de 1103 Paulsen.

Así como se ha comprobado en este trabajo, también la diseminación del virus RSPaV es amplia en otros lugares y abarca todos los continentes. En Europa, por ejemplo, su incidencia se ha cifrado en Francia en el 66% y en Alemania en el 53%: El virus está ampliamente distribuido tanto en clones comerciales como en portainjertos. El virus RSPaV está asociado con diferentes trastornos de la madera como picaduras del tallo de Rupestris (*Vitis rupestris* cv. St. George) (Martelli et al., 1993) o necrosis de tejidos en Richter 110 (Bouyahia et al., 2005). Sin embargo, el estudio de su impacto es aún desconocido por su complejidad, ya que depende de muchos factores como la combinación de variedad y portainjerto, su presencia conjunta con otros virus, o la cepa vírica de RSPaV de la que se trate (Meng and Rowhani, 2017). Por ejemplo, la incompatibilidad del injerto viene provocada por la variante GRSPaV-SY, mientras que plantas infectadas con variantes como SG1 o 1 parecen ser asintomáticas (Meng and Gonsalves, 2007). Conocer las variantes más frecuentes en el viñedo ayudarían a comprender el impacto de su elevada presencia. Por otro lado, se sabe que el virus es capaz de invadir tejidos meristemáticos, habitualmente utilizados para regenerar material libre de virus, y su eliminación por métodos convencionales del virus es muy complicada (Gambino et al., 2006). Por todo ello, indagar en el conocimiento de RSPaV y establecer medidas de control acordes parece necesario.

4. Conclusiones

A pesar de la evidente eficacia de la aplicación del reglamento para el control de las enfermedades víricas, demostrada por la diferenciada incidencia entre el material vegetal certificado del material procedentes de viñas antiguas, integrar nuevas técnicas de detección de mayor sensibilidad en el reglamento podría aumentar la eficacia en la detección de infecciones víricas y acelerar los procesos de diagnóstico. Además, estas técnicas proporcionan información sobre las cepas del virus a partir del conocimiento de su secuencia genética, lo que es importante para conocer la patología que provocan. En cuanto a la presencia de virus y viroides no regulados, los resultados mostraron que tanto las viñas viejas como el material vegetal certificado de vid están altamente infectados con algunos de ellos. De especial importancia es la presencia de los virus GLRaV-2 PN, debido a la sintomatología virulenta que provoca, y del virus RSPaV, debido a su gran incidencia. Cabe destacar la necesidad de evaluar la importancia de la presencia de estos virus en los viñedos con el fin de determinar las medidas de control necesarias para proteger la sanidad del material vegetal de vid.



5. Bibliografía

1. ANGELINI, E., ABOUGHANEM-SABANADZOVIC, N., DOLJA, V. V., MENG, B., 2017. **Grapevine leafroll-associated virus 2**. *Grapevine Viruses Mol. Biol. Diagnostics Manag.* 141–165.
2. BERTAZZON, N., BORGIO, M., VANIN, S., ANGELINI, E., 2010. **Genetic variability and pathological properties of Grapevine Leafroll-associated Virus 2 isolates**. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 185–197. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9583-3>
3. BONAVIA, M., DIGIARO, M., BOSCIA, D., BOARI, A., BOTTALICO, G., SAVINO, V., MARTELLI, G.P., 1996. **Studies on “corky rugose wood” of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B**. *Vitis - J. Grapevine Res.* 35, 53–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.5073/vitis.1996.35.53-58>
4. BOUYAHIA, H., BOSCIA, D., SAVINO, V., NOTTE, P. LA, PIROLO, C., CASTELLANO, M.A., MINAFRA, A., MARTELLI, G.P., 2005. **Grapevine rupestris stem pitting-associated virus is linked with grapevine vein necrosis**. *Vitis - J. Grapevine Res.* 44, 133–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.5073/vitis.2005.44.133-137>
5. FUCHS, M., 2020. **Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard**. *J. Plant Pathol.* 102, 643–653.
6. GAMBINO, G., BONDAZ, J., GRIBAUDO, I., 2006. **Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine**. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 397–404. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-0004-6>
7. GARAU, R., PROTA, V.A., PIREDDA, R., BOSCIA, D., PROTA, U., 1994. **On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A**. *Vitis - J. Grapevine Res.* 33, 161–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.5073/vitis.1994.33.161-163>
8. GEORGE, D., MALLERY, P., 2021. **IBM SPSS statistics 27 step by step: A simple guide and reference**. Routledge.
9. GOLINO, D.A., FUCHS, M., AL RWAHNIH, M., FARRAR, K., SCHMIDT, A., MARTELLI, G.P., 2017. **Regulatory aspects of grape viruses and virus diseases: certification, quarantine, and harmonization, in: Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management**. Springer, pp. 581–598.
10. MARTELLI, G.P., 2014. **Rugose wood complex**. *J. Plant Pathol.* 96, 73–88.
11. MARTELLI, G.P., Savino, V., Walter, B., 1993. **Indexing on Vitis indicators**. *Graft Transm. Dis. Grapevines. Food Agric. Organ. United Nations, Rome* 137–162.
12. MENG, B., GONSALVES, D., 2007. **Grapevine rupestris stem pitting-associated virus: a decade of research and future perspectives**. *Plant Viruses* 1, 52–62.
13. MENG, B., JOHNSON, R., PERESSINI, S., FORSLINE, P.L., GONSALVES, D., 1999. **Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting**. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 191–199.
14. MENG, B., MARTELLI, G.P., GOLINO, D.A., FUCHS, M., 2017. **Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management**. Springer.
15. MENG, B., ROWHANI, A., 2017. **Grapevine rupestris stem pitting-associated virus**. *Grapevine viruses Mol. Biol. diagnostics Manag.* 257–287.
16. OSMAN, F., HODZIC, E., OMANSKA-KLUSEK, A., OLINEKA, T., ROWHANI, A., 2013. **Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D**. *J. Virol. Methods* 194, 138–145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.046>



17. OSMAN, F., LEUTENEGGER, C., GOLINO, D., ROWHANI, A., 2007. **Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1-5 and 9.** J. Virol. Methods 141, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.035>
18. POOJARI, S., ALABI, O.J., OKUBARA, P.A., NAIDU, R.A., 2016. **SYBR® Green-based real-time quantitative reverse-transcription PCR for detection and discrimination of grapevine viruses.** J. Virol. Methods 235, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.05.013>
19. THE EUROPEAN COMMISSION, 2019. **COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2019/2072 establishing uniform conditions for the implementation of Regulation (EU) 2016/2031 of the European Parliament and the Council, as regards protective measures against pests of plants, and repealing Commiss. Off. J. Eur. Union.**

6. Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el ámbito del proyecto BEST-FEET (Ref.: 0011-1365-2021-000068), con el apoyo económico de cofinanciado con fondos FEDER y fondos regionales del Departamento de Desarrollo Económico del Gobierno de Navarra. Queremos mostrar nuestra gratitud a Carlos Ventura Padilla (IMIDA) por su ayuda prestada para establecer los protocolos de identificación vírica por RT-PCR en nuestro laboratorio. También queremos agradecer a Diana Marín Ederra (Sanidad Vegetal, Gobierno de Navarra) por su asesoramiento acerca de la legislación de material vegetal de vid vigente.

Estudio sobre los efectos del cambio climático en la calidad y la composición fenólica de diferentes variedades de vid

María Carmen Antolín¹, Andrea Legarra¹, Nieves Goicoechea¹, Juan José Irigoyen¹, Yolanda Gogorcena², Inmaculada Pascual¹

¹Universidad de Navarra-Instituto BIOMA, Grupo de Fisiología del Estrés en las Plantas (Unidad Asociada al CSIC; EEAD, Zaragoza), Irunlarrea 1, E-31008, Pamplona, Navarra. Email: ipascual@unav.es

²Grupo de Genómica de Frutales y Vid. Estación Experimental de Aula Dei (EEAD), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda. Montañana 1005, 50059, Zaragoza.

Resumen

La emisión de gases de efecto invernadero está produciendo un cambio climático que planteará desafíos para el sector vitivinícola, ya que se prevé tenga un impacto negativo en el desarrollo de las variedades de vid más cultivadas y en la composición fenólica de sus frutos. El grupo de Fisiología del Estrés en Plantas (Universidad de Navarra) lleva más de 25 años analizando la adaptación de los cultivos, incluida la vid, a distintos factores ambientales. Cuenta con instalaciones especializadas para cultivar plantas a diferentes niveles de CO₂, temperatura y disponibilidad hídrica. En esta investigación se ha estudiado el comportamiento de 4 variedades de vid comerciales y 4 antiguas en un escenario de cambio climático. Se cultivaron esquejes fructíferos en invernaderos de gradiente térmico donde se aplicaron dos tratamientos entre el cuajado y la madurez de los frutos: (1) CO₂ ambiente (400 μmol mol⁻¹) y temperatura ambiente, y (2) CO₂ elevado (700 μmol mol⁻¹) y temperatura elevada (ambiente+4°C). Los resultados muestran que Cabernet Sauvignon fue la variedad comercial más sensible al aumento de CO₂ y temperatura al disminuir la acidez titulable y las antocianinas en la uva. Algunos genotipos antiguos, como Tinto Velasco, parecen funcionar adecuadamente en un futuro escenario climático y podrían utilizarse para mejorar algunos atributos de las variedades comerciales, tales como la acidez.

1. Introducción

El cambio climático se define como una variación en las condiciones ambientales que persiste durante un período prolongado de tiempo. Hoy en día constituye una de las grandes preocupaciones a las que se enfrenta la humanidad en el siglo XXI (1). El principal efecto del cambio climático que se espera a nivel mundial es un aumento constante de la temperatura, lo que conllevará cambios importantes en los ciclos hidrológicos y energéticos globales, así como un incremento de la radiación y de la frecuencia y severidad de fenómenos meteorológicos extremos. En el caso de la viticultura, los principales impactos del cambio climático son la aceleración de las etapas fenológicas, la reducción del rendimiento, las alteraciones en la composición de la uva y del vino, la expansión de la vid a áreas que antes no eran aptas para su cultivo y los desplazamientos geográficos de las áreas tradicionales de cultivo (2, 3). Dadas estas predicciones, la selección de genotipos con mejor adaptabilidad a los cambios ambientales puede ser una herramienta de gran interés para cultivos perennes, como la vid (4). El grupo de investigación de Fisiología del Estrés en Plantas de la Universidad de Navarra lleva más de 25 años analizando la adaptación de los cultivos, incluida la vid, al cambio climático. Para ello, cuenta con instalaciones específicas, entre ellas, invernaderos de gradiente térmico, donde algunos factores tales como la



concentración de CO₂ en el aire, la temperatura y la disponibilidad de agua, pueden actuar de forma independiente o en interacción, simulando diferentes escenarios climáticos, lo que permitirá dilucidar las limitaciones responsables de una determinada respuesta de las plantas (5). En este trabajo se presenta un estudio comparativo de la respuesta de 8 variedades de vid (cuatro comerciales y cuatro antiguas) al incremento simultáneo de CO₂ atmosférico y temperatura.

2. Material y Métodos

Se obtuvieron esquejes fructíferos de 4 variedades de vid comerciales y 4 variedades recuperadas en Navarra por la Estación de Viticultura y Enología (EVENA) por medio de una técnica que asegura la formación de raíces adventicias antes de la formación del brote (6). Tras el cuajado del fruto, las plantas se cultivaron en invernaderos de gradiente térmico donde se aplicaron dos tratamientos entre el cuajado y la madurez: (1) CO₂ ambiente (400 µmol mol⁻¹) y temperatura ambiente, y (2) CO₂ elevado (700 µmol mol⁻¹) (CATA) y temperatura elevada (ambiente+4°C) (CETE) (Fig. 1).

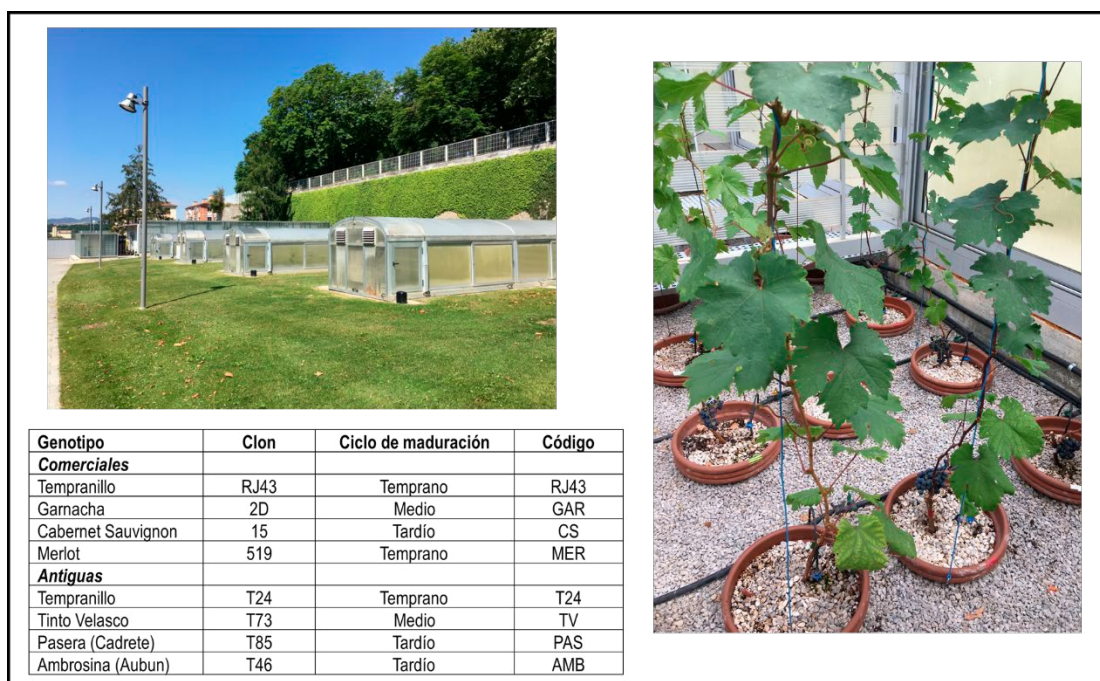


Fig. 1. Invernaderos de gradiente térmico (Universidad de Navarra) y variedades de vid utilizadas en el estudio.

Las bayas se recolectaron cuando alcanzaron la madurez fisiológica (relación sólidos solubles totales/acidez titulable entre 4 y 6) y se analizaron la calidad y el contenido fenólico siguiendo los protocolos de la OIV (7). La capacidad antioxidante total del mosto se evaluó empleando el ensayo de la actividad de captación de radicales libres (α , α -difeníl- β -picril-hidrazilo, DPPH) (8).



3. Resultados

Las variedades de vid analizadas mostraron gran diversidad en su respuesta al aumento simultáneo de CO₂ y temperatura (Fig.2). Entre los genotipos antiguos, PAS y AMB se revelaron como los más sensibles con descensos en la concentración de sólidos solubles totales, la acidez titulable, el contenido fenólico (expresado como IPT) y la acumulación de antocianinas. En el caso de T24 se mantuvieron estables los sólidos solubles totales, el pH y el IPT. TV no vio afectada su concentración de antocianinas ni IPT, mostrando además una acidez superior en condiciones de cambio climático. En esta última variedad, el fuerte descenso en la concentración de sólidos solubles totales junto con la elevada acidez titulable sugiere, además, un retraso en su maduración bajo las condiciones del tratamiento CETE.

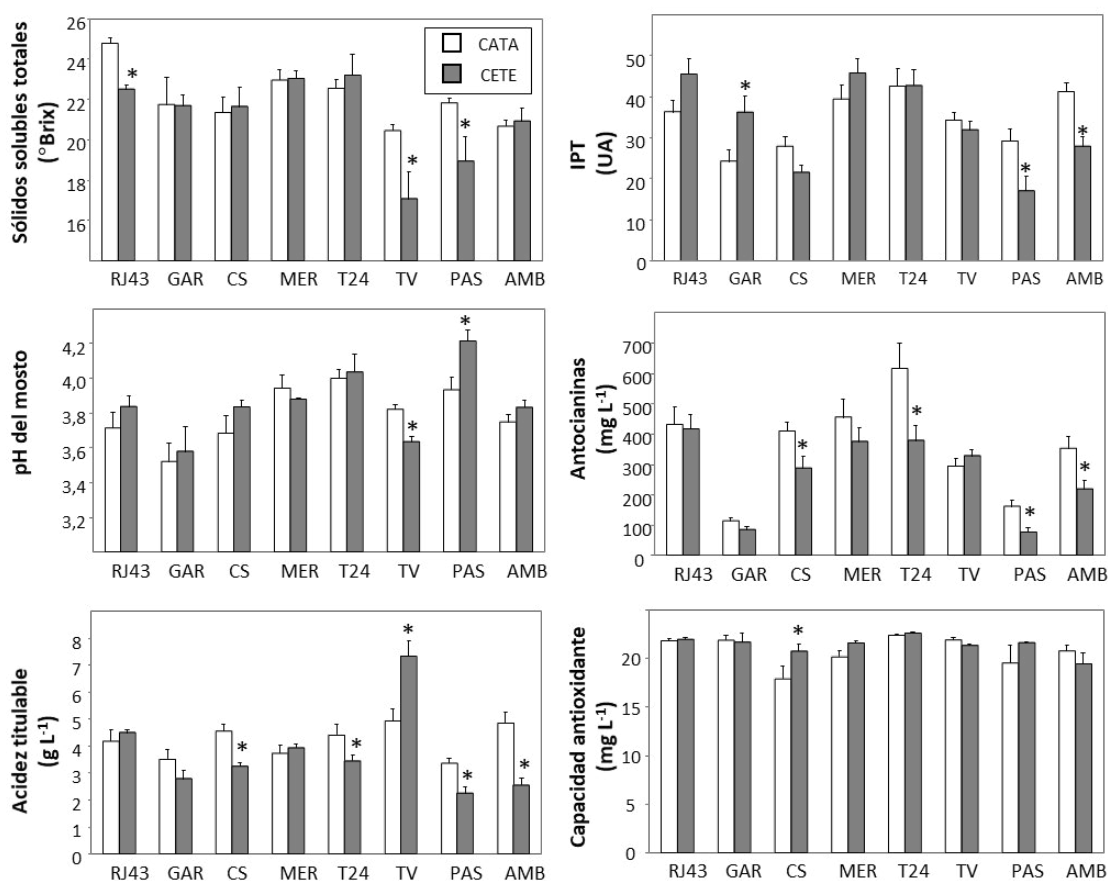


Fig. 2. Composición de las bayas de las diferentes variedades cultivadas con temperatura y CO₂ ambiente (CATA) o con temperatura y CO₂ elevados (CETE) durante la maduración. Los datos son medias (n=5). Dentro de cada variedad, los asteriscos indican diferencias significativas (P < 0,05) entre los tratamientos según el test t de Student. IPT, índice de polifenoles totales; UA, unidades de absorbancia.

En cuanto a las variedades comerciales, en general, los cambios fueron de menor magnitud que en las variedades antiguas. Los resultados muestran que Cabernet Sauvignon fue la variedad comercial más sensible al aumento del CO₂ y la temperatura, ya que disminuyeron la acidez titulable del mosto y las antocianinas. No obstante, también fue la única variedad en la que mejoró la capacidad antioxidante del mosto.



4. Conclusiones

Los estudios sobre el cambio climático en condiciones controladas permiten comparar la respuesta simultánea de diferentes variedades de vid ante un mismo escenario, evitando las variaciones propias de la localización, la meteorología o el manejo del cultivo. El presente estudio ha puesto en evidencia que existe una gran diversidad de respuestas ante el cambio climático entre las variedades antiguas que podría aprovecharse para mejorar algunos atributos en los vinos elaborados a partir de variedades comerciales, cuya tipicidad resultará previsiblemente alterada en el futuro.

5. Bibliografía

1. IPCC (2021). Summary for Policymakers. En V. Masson-Delmotte et al. (Eds.), *Climate change 2021: The physical science basis*. Contribution of working group I to the sixth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (pp. 3–32). Cambridge University Press.
2. DROULIA, F., CHARALAMPOPOULOS, I. (2021). **Future climate change impacts on European viticulture: a review on recent scientific advances**. *Atmosphere*, 12, 495.
3. SGUBIN, G.; SWINGEDOUW, D.; MIGNOT, J.; GAMBETTA, G. A.; BOIS, B.; LOUKOS, H.; NOËL, T.; PIERI, P.; GARCÍA DE CORTÁZAR-ATAURI, I.; OLLAT, N.; VAN LEEUWEN, C. (2023). **Non-linear loss of suitable wine regions over Europe in response to increasing global warming**. *Glob Chang Biol.*, 29, 808–826.
4. FRIONI, T.; BERTOLONI, G.; SQUERI, C.; GARAVANI, A.; RONNEY, L.; PONI, S.; GATTI, M. (2020). **Biodiversity of local *Vitis vinifera* L. germplasm: A powerful tool toward adaptation to global warming and desired grape composition**. *Front. Plant Sci.*, 11, 608.
5. MORALES, F.; PASCUAL, I.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; AGUIRREOLEA, J.; IRIGOYEN, J.J.; GOICOECHEA, N.; ANTOLÍN, M.C.; OYARZUN, M.; URDIAIN, A. (2014). **Methodological advances: using greenhouses to simulate climate change scenarios**. *Plant Sci.*, 226, 30–40.
6. MULLINS, M.G. (1966). **Test-plants for investigations of the physiology of fruiting in *Vitis vinifera* L.** *Nature*, 209, 419-420.
7. OIV. **Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts**; International Organization of Vine and Wine: Paris, France, 2018; Volume I, ISBN 979-10-91799-80-5.
8. BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. (1995). **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity**. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28, 25-30.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA) (Olite, España) por su asesoramiento y el suministro del material vegetal. El trabajo ha sido financiado por la Fundación Universitaria de Navarra (2018-21) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Ref. PID2020-118337RB-I00) (2021-2024).

Evaluación de las características de la madera del portainjerto 110 Richter

A. Villa-Llop^{1,4}, S. Crespo-Martínez¹, M. Ancín¹, D. Marín¹, S.J. Cookson², G. Loupit², P.O. Bonhomme², D. Prodhomme², D. Gramaje³, R. Bujanda³ y J. Eraso⁴, L.G. Santesteban¹

¹ Dpto. de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra (UPNA), Campus Arrosadía, 31006 Pamplona, España

² EGFV, Univ. Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, INRAE, ISVV, F-33882, Villenave d'Ornon, Bordeaux France

³ Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universidad de la Rioja - Gobierno de La Rioja, Ctra. LO-20 Salida 13, Finca La Grajera, 26071 Logroño, España

⁴ Vivero Vitis Navarra, Larraga, Navarra, España

Resumen

La tasa de éxito del injerto en los viveros de vid varía considerablemente de un año a otro y entre distintos lotes de madera, pero se desconocen las causas de esta variación. Con el fin de identificar los factores que podrían explicar esta variabilidad se caracterizaron, en años consecutivos, 10 lotes de madera de portainjerto (cv. 110 Richter) obtenidos en distintos campos de plantas madre, de España y Francia. Se testó la presencia de virus y patógenos asociados a enfermedades fúngicas de la madera, detectándose únicamente *Cadophora luteo-olivacea*. Además, la madera se caracterizó histológicamente midiendo el área de los tejidos vasculares, el diámetro y número de los vasos del xilema y su conductividad. Las principales diferencias entre lotes aparecieron en relación a la presencia de vasos grandes (240 - 320 μm), lo que resultó en una conductividad específica del xilema significativamente mayor. También se determinó el contenido de carbohidratos totales e isótopos ($\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$). Por último, se injertaron 100 plantas por lote y se determinó la tasa de éxito, que se relacionó con todos los parámetros analizados. Se observó una correlación positiva entre el éxito del injerto y los parámetros de sección del xilema, conductividad y porcentaje de vasos grandes.

1. Introducción

Desde la aparición de la Phylloxera (*Daktulosphairavitifoliae Fitch*) en Europa en la segunda mitad siglo XIX, el injerto de variedades *Vitis vinifera* sobre variedades de vid Americana se alza como la única estrategia de control frente a la plaga.

Sin embargo, a pesar de la mejora continua del proceso en los viveros, la tasa de éxito del injerto es muy variable, situándose en torno al 70 – 80% (Pisciotta et al., 2017). Teniendo en cuenta la alta variabilidad y su repercusión económica en el sector, establecer relaciones entre las características (anatómica, histológica, metabólica y microbiológica) del material de propagación y la tasa de éxito, sería de gran interés.



2. Material y Métodos

Material vegetal

Se caracterizaron 10 lotes comerciales de madera (15 muestras/lote) de portainjerto cv. 110 Richter obtenidos en distintos campos de producción de plantas madre, seis en España (Montesa, Sansuañe, Albaida, Sansuañe abajo, Chaborra y Villena) y cuatro en Francia (Carcassonne, Aubignan, Vendée, Camiran), y condiciones de cultivo diferentes.

Análisis histológicos

Las estacas de portainjerto fueron procesadas hasta la obtención de cortes finos de aproximadamente 1mm de grosor. Para la observación de los tejidos conductivos, se siguió el protocolo descrito por Feder & O'Brien, 1968. Se cuantificó el tamaño de los vasos del xilema y su conductividad hidráulica específica siguiendo el método descrito por Scholz et al., 2013.

Análisis metabólicos

Se determinó el contenido de almidón, sacarosa, glucosa, fructosa y proteínas siguiendo los protocolos descritos por Prodhomme et al., 2019. El análisis de los macro y micronutrientes en la madera se realizó según Gautier et al., 2020. Por último, las relaciones isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, se determinaron siguiendo los métodos descritos por Farquhara & Richardsb, 1984 y Billy et al., 2010, respectivamente.

Análisis microbiológicos

La presencia de virusoficiales se testó mediante RT-PCR, se realizaron los todos pasos siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Los patógenos asociados a enfermedades fúngicas de la madera (enfermedades de Petri, Pie negro y Decaimiento por *Botryosphaeria*) fueron analizados siguiendo el método descrito por Ramsing et al., 2021.

Injerto y evaluación de la tasa de éxito

Se obtuvieron 100 plantas Tempranillo/110 Richter por lote. Las plantas se obtuvieron siguiendo el proceso de producción del vivero Vitis Navarra. El material vegetal (variedad y portainjerto) fue recogido en invierno de los campos de producción, se almacenó, húmedo y desinfectado, en cámaras frigoríficas a 4°C de temperatura hasta el momento del injerto. Tras el desyemado, el portainjerto y la variedad se ensamblaron en un injerto de tipo omega y quedaron conectados mediante la formación de un callo en la zona del injerto, durante un proceso denominado callogénesis. Una vez realizado el callo con éxito, las plantas se plantaron directamente en campo, para permitir el crecimiento radicular y vegetativo. Al final de la temporada, las plantas se arrancaron y se guardaron en cámaras frigoríficas.

Para evaluar la tasa de éxito por lote de madera, se descartaron las plantas que no cumplían las características técnicas de calidad (ausencia de desarrollo vegetativo, escaso desarrollo de las raíces, falta de resistencia al "test del palanqueo", prueba manual empleada para evaluar la resistencia mecánica de la unión variedad-portainjerto).



Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado con R Studio versión 3.6.1 y consistió en un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de separación de medias Tukey HSD ($p=0.05$). La matriz de correlación de Pearson se realizó con el mismo software utilizando el paquete "corrplot" (Wei et al., 2021).

3. Resultados

Los datos evidenciaron la importancia que el origen de la madera del portainjerto tiene sobre la tasa de éxito, a pesar de que los resultados obtenidos en este estudio (aprox. 80%), podrían considerarse en un rango más alto de lo que se suele obtener en vivero para el injerto en omega (Pisciotta et al., 2017).

En cuanto al tamaño y frecuencia de los vasos del xilema, destacan los lotes de Albaida y Vendée por su comportamiento inverso. La madera procedente de las zonas climáticas "más secas" (Albaida) tuvo mayor porcentaje de vasos pequeños, a diferencia de los lotes procedentes de zonas "más húmedas" (Vendée) donde el porcentaje de vasos grandes fue mayor (Fig. 1). La distinta distribución del tamaño de los vasos del xilema, podría ser explicada por factores de estrés hídrico. Varios estudios, mostraron que el estrés hídrico induce una disminución del diámetro medio de los vasos del xilema (Lovisolo et al., 2010; Pire et al., 2007). El ratio isotópico del ^{13}C mostró diferencias significativas entre lotes, siendo los de menor contenido los lotes provenientes de Sansuaine abajo y Vix, lo que puede indicar una mayor disponibilidad de agua durante el ciclo vegetativo. En cambio, el lote procedente de Camiran presentó valores relacionados con un estrés hídrico moderado. Además, se comprobó la correlación positiva entre la tasa de éxito del injerto, el porcentaje de vasos de gran tamaño y los isótopos $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 2).

El almidón y la sacarosa fueron los compuestos predominantes en la madera del portainjerto cv. 110 Richter. Únicamente los contenidos en proteínas, almidón y glucosa mostraron diferencias significativas entre los lotes de madera. La composición mineral del material puso de manifiesto las diferencias y la alta variabilidad existente entre los lotes de madera analizados. Posiblemente afectados por la procedencia, condiciones de cultivo y ambientales de cada campo de producción.

Los resultados del estado sanitario confirmaron la presencia del patógeno *Cadophora luteo-olivacea* en una muestra de los lotes procedentes de Montesa y Vendée. Es un patógeno asociado a la enfermedad de Petri y su incidencia está aumentando en todas las zonas vitícolas del mundo (OIV, 2016).



4. Conclusiones

En resumen, estos resultados, por el momento preliminares, confirman el interés de estudiar parámetros anatómicos, histológicos, metabólicos y sanitarios en el material vegetal, ya que podrían tener implicaciones en la variabilidad de la tasa de éxito del injerto.

5. Bibliografía

1. BILLY, C., BILLEN, G., SEBILO, M., BIRGAND, F., & TOURNEBIZE, J. (2010). **Nitrogen isotopic composition of leached nitrate and soil organic matter as an indicator of denitrification in a sloping drained agricultural plot and adjacent uncultivated riparian buffer strips.** *Soil Biology and Biochemistry*, 42(1), 108–117.
2. FARQUHARA, G. D., & RICHARDS, R. A. (1984). **Isotopic Composition of Plant Carbon Correlates with Water-use Efficiency of Wheat Genotypes.** *Aust. J. Plant Physiol*, 11, 539–552.
3. FEDER, N., & O'BRIEN, T. P. (1968). **Plant Microtechnique: Some principles and new methods.** *American Journal of Botany*, 55(1), 123–142.
4. GAUTIER, A., COOKSON, S. J., LAGALLE, L., OLLAT, N., & MARGUERIT, E. (2020). **Influence of the three main genetic backgrounds of grapevine rootstocks on petiolar nutrient concentrations of the scion, with a focus on phosphorus.** *OENO One*, 54(1), 1–13.
5. LOVISOLO, C., PERRONE, I., CARRA, A., FERRANDINO, A., FLEXAS, J., MEDRANO, H., & SCHUBERT, A. (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(2), 98.
6. OIV. (2016). **Grapevine Trunk Diseases. A review.** In OIV publications: Vol. may.
7. PIRE, R., SANABRIA, M. E., PEREIRA, A., & DÍEZ, J. (2007). **Conductividad hidráulica y grosor de los vasos del xilema en cinco materiales de vid sometidos a déficit hídrico.** *Interciencia*, 32, 35–40.
8. PISCIOTTA, A., ORLANDO, S., DI ROSARIO, L., & D'ACQUISTO, L. (2017). **Evaluation of graft success of grapevine after incubation room by means of thermographic, electrical and mechanical techniques.** *Chemical Engineering Transactions*, 58, 199–204.
9. PRODHOMME, D., VALLS FONAYET, J., FRANC, C., HILBERT, G., DE REVEL, G., RICHARD, T., OLLAT, N., COOKSON, S. J., HÉVIN, C., & JANE COOKSON, S. (2019). **Metabolite profiling during graft union formation reveals the reprogramming of primary metabolism and the induction of stilbene synthesis at the graft interface in grapevine.** *BMC Plant Biology*.
10. RAMSING, C. K., GRAMAJE, D., MOCHOLÍ, S., AGUSTÍ, J., CABELLO SÁENZ DE SANTA MARÍA, F., ARMENGOL, J., & BERBEGAL, M. (2021). **Relationship Between the Xylem Anatomy of Grapevine Rootstocks and Their Susceptibility to *Phaeoacremonium minimum* and *Phaeomoniella chlamydospora*.** *Frontiers in Plant Science*, 12.



11. SCHOLZ, A., KLEPSCH, M., KARIMI, Z., & JANSEN, S. (2013). **How to quantify conduits in wood?** *Frontiers in Plant Science*, 4.
12. WEI, T., SIMKO, V., LEVY, M., & XIE, Y. (2021). **Visualization of a Correlation Matrix.** Version 0.90. <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/corrplot.pdf>

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido desarrollado en el marco del proyecto EFA 324/19 - VITES QUALITAS cofinanciado al 65% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020).

Evaluación de suelos de viñedos bajo distinto tipo de manejo en la DOP Ribeiro

Pilar Blanco¹, Isaac Rodríguez², Victoria Fernández-Fernández², María Ramil², Noemi Calvo-Portela^{3,4}, Andrea Parente-Sendín^{3,4}, Melissa Méndez-López^{3,4}, Flora Alonso-Vega^{3,4}

¹Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-AGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32428, Leiro-Ourense.
E-mail: pilar.blanco.camba@xunta.gal

²Universidade de Santiago de Compostela (USC)-Instituto de Investigación en Análisis Químicos y Biológicos (IAQBUS), Constantino Candeira s/n, Campus Sur/Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela

³Área de Edafología y Química Agrícola, Departamento de Biología Vegetal y Ciencia del Suelo, Facultad de Ciencias. Universidade de Vigo. 32004. España

⁴Laboratorio de Evaluación y Tecnología Ambiental. Campus da Auga-Campus de Ourense. Universidade de Vigo. 32004. Ourense

Resumen

Las prácticas agrícolas aplicadas en el manejo del viñedo condicionan las características del suelo incluyendo la disponibilidad de nutrientes, la presencia de residuos y su microbioma. Todos estos factores influyen en el desarrollo de la vid, la resistencia a enfermedades y, finalmente, en el rendimiento y la calidad de la uva. En este trabajo se tomaron muestras de suelo en viñedos de la DOP Ribeiro, representativas de tres tipos de manejo: ecológico, en conversión y convencional. En las muestras se analizaron las propiedades físico-químicas del suelo, la presencia de residuos y la composición de la comunidad de hongos y bacterias.

1. Introducción

El sistema de manejo del viñedo repercute en la fertilidad del suelo, la presencia de residuos y el microbioma asociado. La tendencia hacia el uso prácticas agrícolas cada vez más sostenibles y respetuosas con el medio está especialmente patente en España, el país con mayor superficie de viñedo ecológico del mundo. En este sentido, el Reglamento (UE) 2018/848 del Consejo de la Unión Europea recuerda que una producción ecológica verdaderamente sostenible no sólo consiste en sustituir pesticidas y fertilizantes sintéticos por otros ecológicos. Además, debe considerarse al suelo como un organismo vivo, apuntando a la necesidad de conservar su biodiversidad. De hecho, los microorganismos asociados al viñedo determinan la productividad y resistencia de la planta a enfermedades y otros factores de estrés del medio (Bokulich et al., 2016).

La Denominación de Origen Ribeiro (DOP Ribeiro) es la más antigua de las cinco DOP gallegas. Abarca una superficie de 2500 ha de viñedo en la zona de confluencia de los ríos Miño, Avia y Arnoia, al oeste de la provincia de Ourense (Fig. 1), de las cuales 1293 ha están inscritas en el Consello Regulador (CR Ribeiro, 2021). A nivel climático, los valores medios anuales de precipitaciones y temperatura son de 950 mm y 14,5 °C, respectivamente. La mayoría de los suelos proceden de materiales graníticos con texturas franco-arenosas; pero también los hay derivados de materiales metamórficos como esquistos, o formados a partir de material sedimentario, con texturas francas. Estos factores, asociados a la riqueza de variedades de vid y la microbiota del suelo, constituyen un terroir único que condiciona el carácter de los vinos de la DOP Ribeiro.



El objetivo de este estudio es realizar una caracterización de los suelos de viñedo de la DOP Ribeiro, en base a parámetros físico-químicos, residuos de pesticidas y microbioma considerando tres modalidades de explotación: ecológica, convencional y en conversión.

2. Material y Métodos

2.1. Localización de las parcelas y toma de muestra de suelos de viñedo

En este estudio se evaluaron suelos de viñedos de la DOP Ribeiro en los que se empleaba distintas prácticas agrícolas: 5 de manejo ecológico (S1, S2, S3, S4 y S5), 4 en período de transición (S6, S7, S8 y S9) y 6 de manejo convencional (S10, S11, S12, S13, S14 y S15) (**Fig. 1**).

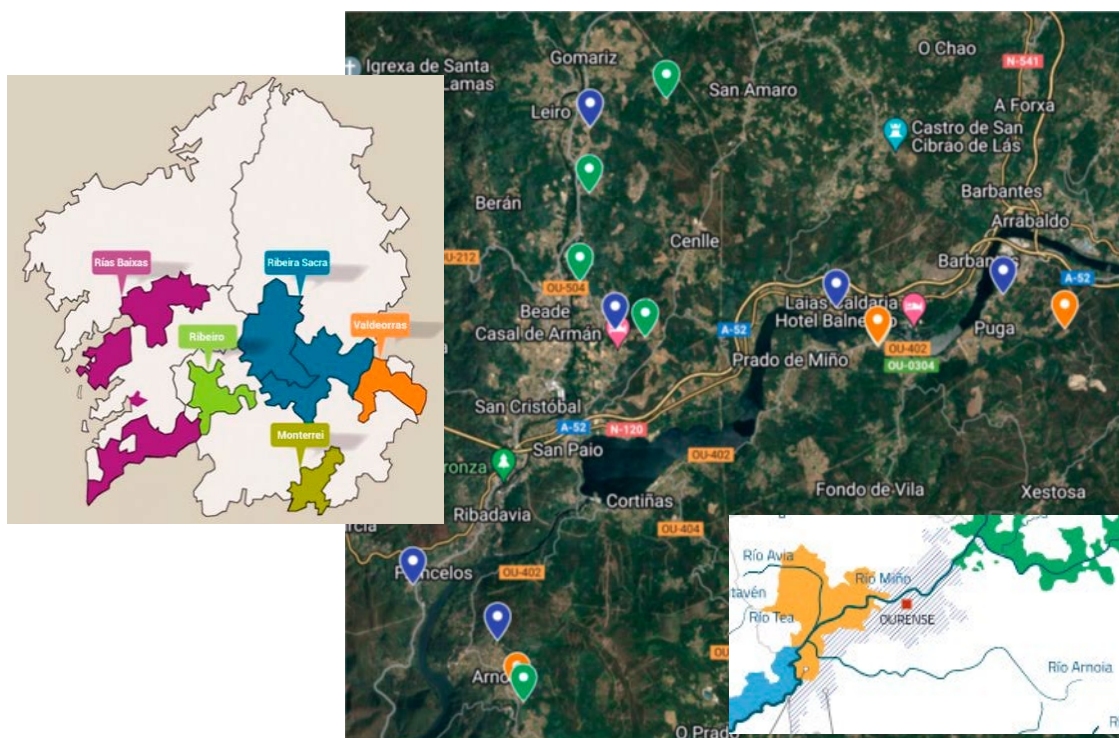


Fig. 1. Ubicación de las parcelas muestreadas en la DOP Ribeiro. Tipo de manejo: azul-convencional; verde- ecológico; naranja- transición.

El muestreo se realizó la última semana de julio de 2022. En cada viñedo se recogieron 10 submuestras de suelo de la capa superficial (0-5 cm), a lo largo de la línea de cepas, y con ellas se conformó una muestra compuesta representativa de cada finca. Una vez homogeneizada, una parte de la muestra se conservó en frío para posterior caracterización del microbioma del suelo. El resto de la muestra se tamizó, seleccionando la fracción con un tamaño de partícula inferior a 2 mm para determinar las propiedades físico-químicas del suelo y la presencia de residuos de fungicidas e insecticidas.

2.2. Caracterización físico química de los suelos

En primer lugar, se caracterizó la textura del suelo, mediante la estimación de las proporciones de arena, limo y arcilla. Además, se determinó el pH en agua (pHw) y en KCl (pHK),



los contenidos de materia orgánica y N y la concentración de los cationes básicos del complejo de cambio (Ca_{ex} , Mg_{ex} , K_{ex} , y Na_{ex}) (Sumner y Miller, 1996).

2.3. Análisis de residuos de fungicidas e insecticidas en el suelo

La determinación de los residuos de pesticidas en extractos de suelos se realizó mediante cromatografía líquida (LC), en combinación con espectrometría de masas (MS), usando un equipo de tipo triple cuadrupolo (QqQ) con una fuente de Electrospray (ESI). Los compuestos se ionizaron en modo positivo (ESI+), a excepción del Fludioxonil que se analizó en modo ESI-, empleando un mínimo de dos transiciones para cada analito y su correspondiente subrogado interno. El método de LC-ESI-MS/MS cubrió la determinación de 50 pesticidas, y 15 análogos marcados con isótopos estables. La extracción de los residuos de pesticidas de las muestras de suelo se llevó a cabo mediante extracción con fluidos presurizados, siguiendo un procedimiento interno desarrollado y validado por los miembros del equipo de trabajo (Pérez-Mayán et al., 2020).

2.4. Caracterización del microbioma del suelo

La identificación de las comunidades bacterianas y fúngicas del suelo se ha realizado utilizando genes marcadores 16S rRNA e ITS, respectivamente, secuenciados con la tecnología Illumina MiSeq y analizados por Biome Makers Inc. (BECROP Smart Agriculture, Biome Makers, Europa. 47006 Valladolid, España) (<https://biomemakers.com>), mediante el uso de la Tecnología patentada BeCrop®(BeCrop®US Patent Application No.62263488).de los vinos en base a su composición volátil se realizó un análisis de componentes principales.

2.5. Tratamiento estadístico de los datos

La influencia del sistema de manejo en las características físico-químicas de los suelos se evaluó mediante el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis (H) con el programa IBM SPSS Statistics (versión 25). Para el análisis de la diversidad de bacterias y hongos en los suelos se empleó el software Past 4.10.

3. Resultados

3.1. Caracterización físico química de los suelos

La proporción de arena, limo y arcilla de los suelos fue, de media y respectivamente, 64, 20 y 16%, dando lugar a texturas franco-arenosas que favorecen el drenaje y son propias de suelos desarrollados sobre materiales graníticos, hecho que también influye en el pH_w, con un valor medio de $5,8 \pm 0,4$, que oscila entre 5,2 (en un suelo bajo manejo convencional) y 6,6 (en dos suelos, uno en ecológico y otro en transición). Los valores de pH_k fueron, como cabría esperar sensiblemente inferiores ($5,1 \pm 0,4$). El sistema de manejo no resultó ser un factor diferenciador de la acidez de los suelos y de acuerdo con Fernández-Calviño y Nóvoa-Muñoz (2019) las condiciones son adecuadas para el desarrollo del viñedo.

El contenido de materia orgánica en los suelos manejados en convencional fue del 4.0 ± 1.2 %, ligeramente inferior al encontrado en los suelos bajo sistema ecológico (4.7 ± 1.1 %) aunque debido a la mayor variabilidad en el sistema en transición (5.2 ± 3.4 %), tampoco se ha encontrado



influencia significativa del sistema de manejo en los contenidos de materia orgánica. La relación C/N, indicativa del balance entre los dos elementos esenciales para el crecimiento bacteriano fue $12,5 \pm 1,1$ y los valores medios, aunque sin diferencias significativas entre ellos, descienden en sentido convencional>transición>ecológico (13, 12,3 y 12, respectivamente). Esta tendencia hacia unas mejores condiciones para el desarrollo vegetal desde un sistema de manejo convencional hacia un ecológico se observa también al evaluar el nivel de fertilidad mediante la concentración de los cationes básicos del complejo de cambio (Na_{ex} , K_{ex} , Ca_{ex} y Mg_{ex}) y su suma (**Fig. 2**). Los valores de Mg_{ex} variaron de forma significativa ($H=9.396$, $sig.=0.009$) entre $4,3 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ en parcelas manejadas de forma ecológica hasta $2,6 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ en convencional. El sistema de manejo, sin embargo, no es un factor diferenciador para los contenidos de los cationes Ca_{ex} , K_{ex} y Na_{ex} . No obstante, el hecho de que los valores mínimos ocurriesen en las fincas bajo manejo convencional ($7,2$, $1,1$ y $0,7 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$, respectivamente) influyó en que la suma de bases, y por tanto la fertilidad de los suelos manejados bajo sistema ecológico y en transición, fuese sensiblemente superior (**Fig. 2**). Todos los valores son, en general, comparables a los de más alta concentración encontrados por Fernández-Calviño et al. (2009) en la DOP Ribeiro.

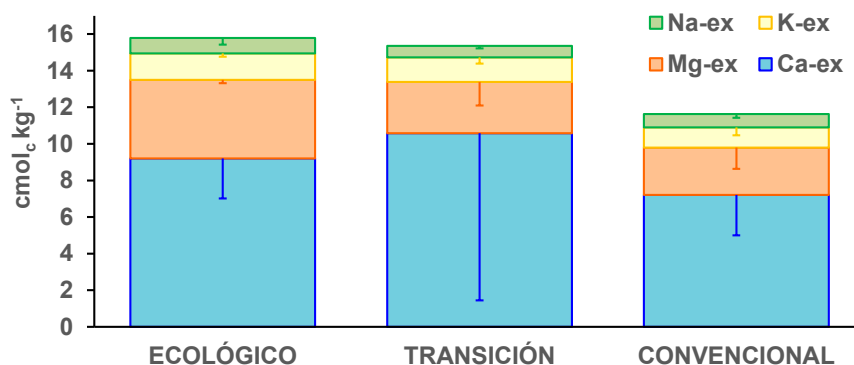


Fig. 2. Valores medios y desviación estándar de los diferentes cationes básicos del complejo de cambio de los suelos para cada sistema de manejo de viñedo.

3.2. Presencia de residuos en los suelos

Todos los viñedos muestreados presentaron residuos de al menos un fungicida y/o insecticida a concentraciones superiores a los límites de cuantificación (LOQs) del procedimiento analítico (1 ng/g a 5 ng/g). No obstante, la suma de concentraciones para los compuestos medidos, y el número de compuestos a niveles relevantes de concentración (superiores a 10 ng/g) aumentan claramente entre las parcelas explotadas en modo ecológico, a los viñedos bajo manejo convencional (**Fig. 3**). En el primer caso (parcelas explotadas en ecológico) la existencia de niveles bajos de residuos podría deberse a aplicaciones anteriores (caso de parcelas reconvertidas) y/o problemas de contaminación cruzada, debidas a derivas durante la fumigación de viñedos próximos y/o deposición atmosférica. Estas últimas variables pueden afectar tanto a viñedos históricos como a nuevas plantaciones, dado su limitada extensión y el confinamiento geográfico que imparten las laderas de las colinas que rodean las cuencas de los ríos (Miño, Avia y Arnoia) donde se sitúa la DOP Ribeiro.

Tal y como se observa en la **Fig. 3** el número de pesticidas encontrados en las parcelas estudiadas a niveles superiores a 10 ng/g crece de forma significativa en función del sistema de manejo. De este modo, en las explotaciones en ecológico prácticamente no se ha detectado



ningún compuesto por encima de este valor, mientras que en los viñedos de manejo convencional se han llegado a identificar hasta 17 compuestos por encima del umbral anterior. Aunque este valor puede parecer elevado, es conveniente aclarar que se refiere a residuos existentes a finales de la campaña de aplicación (finales de Julio). Por tanto, para comprender sus efectos sobre el suelo del viñedo es preciso determinar su evolución temporal durante el período no vegetativo de la viña.

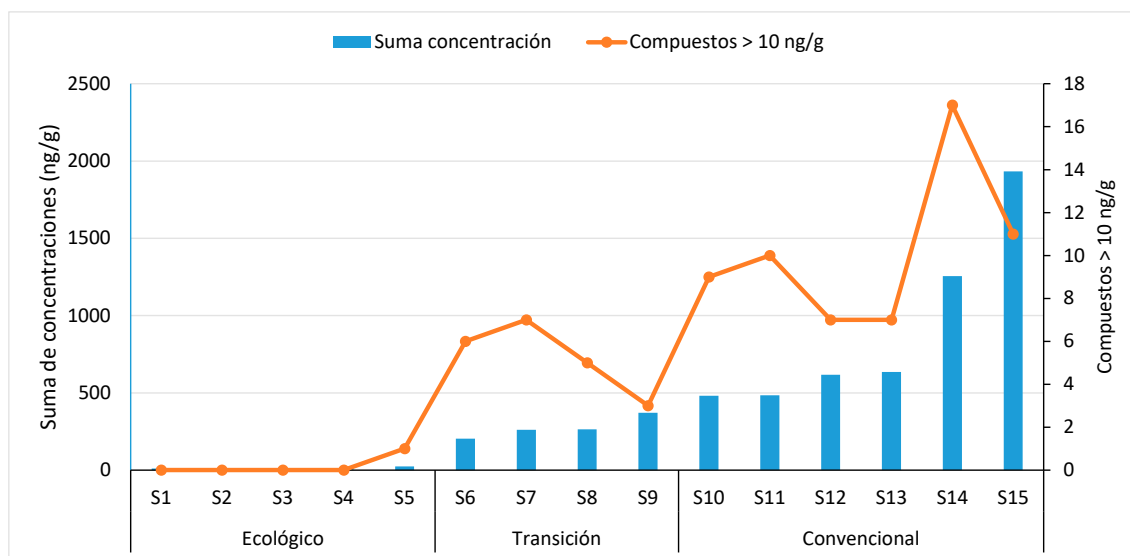


Fig. 3. Suma de concentraciones y número de fungicidas a niveles superiores a 10 ng/g en los suelos de viñedo en función del modo de explotación.

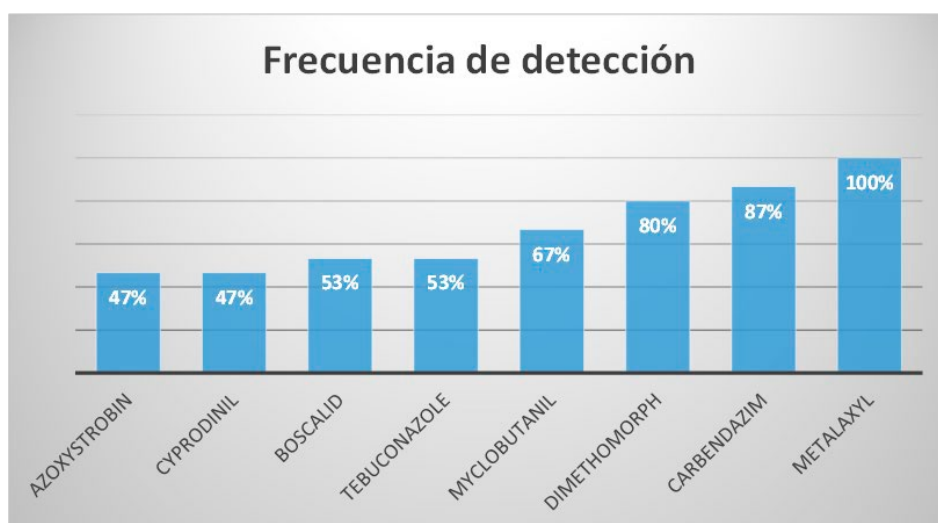


Fig. 4. Frecuencia de detección de los fungicidas más abundantes

La Fig. 4 muestra la frecuencia de detección de varios fungicidas en los viñedos estudiados. En porcentajes superiores al 50% y en orden creciente de detección, los compuestos detectados han sido boscalid, tebuconazole, myclobutanil, dimethomorph, carbendazim y metalaxyl. Todos ellos se utilizan en el control de infecciones fúngicas, o son productos de



degradación de fungicidas autorizados (caso del carbendazim). Por otro lado, es relevante destacar que algunos de estos compuestos han perdido la autorización de comercialización recientemente (caso de methyl thiophanate, precursor del carbendazim; y myclobutanil), o son candidatos a sustitución (tebuconazole, metalaxyl como racémico). Este hecho brinda la oportunidad de seguir la disipación de sus residuos en suelos de viñedos de explotación convencional, generando información de utilidad para establecer períodos de transición hacia el modo ecológico. Asumiendo que una parte de las explotaciones seguirán trabajando en modo convencional, plantea la necesidad de realizar estudios de screening en los que se investigue la persistencia en suelos, y la potencial transferencia al vino, de fungicidas de nueva generación que reemplacen a los productos activos eliminados del mercado al perder su autorización.

3.3. Caracterización del microbioma de los suelos

El análisis de la población de bacterias y hongos en los suelos no mostró diferencias significativas entre fincas bajo distintos manejos. Sin embargo, se observó una tendencia en las fincas convencionales a presentar un menor número de especies a nivel global, debido a un menor número de especies bacterianas (Fig. 5A).



Fig. 5. A) Riqueza de especies en total (S-total) y de bacterias y hongos en viñedos de manejo ecológico (Eco ■), convencional (Con ■) o en conversión (Tra ■). B) Índice de diversidad de Shannon (H) de la población de bacterias y hongos.



Teniendo en cuenta la abundancia (H) de las distintas especies, la diversidad de bacterias era mayor en las fincas de manejo ecológico o en conversión mientras que la diversidad de hongos era similar en todos los casos, independientemente del manejo (Fig. 5B). Las bacterias del suelo juegan un papel importante en el ciclo biogeoquímico de los elementos; por lo tanto, están relacionadas con la disponibilidad de nutrientes. En este sentido, los resultados de mayor diversidad bacteriana en fincas de manejo ecológico y de transición coinciden con la mayor fertilidad observada en el análisis de las propiedades fisicoquímicas de estos suelos. La comunidad fúngica estaba dominada por hongos de los géneros *Penicillium*, *Mortierella*, *Solicoccozyma* y *Alternaria* que estaban presentes en todas las muestras y con frecuencias mayores del 5% en al menos cinco de ellas. A pesar de que este estudio muestra concentraciones de residuos de fungicidas diferentes en las fincas de distinto manejo (Fig. 3 y 4), esas diferencias no se correlacionaron con la diversidad de hongos identificados en los suelos (Fig. 5 A y B).

Las propiedades de cada una de las muestras, basadas en la ecología del microbioma del suelo, se muestran en la Fig. 6. La calidad del suelo era media o alta en la mayoría de los viñedos, lo que está relacionado con prácticas de manejo sostenible y fue fundamentalmente en las fincas bajo sistema de manejo ecológico donde se encontró una mayor fertilidad según los valores del complejo de cambio de los suelos (Fig. 2). En cuanto a la biodiversidad microbiana en los viñedos, que incluye tanto el número de especies como su abundancia, los resultados fueron variables entre las fincas de cada manejo. Todos los viñedos ecológicos y en transición presentaron una biodiversidad alta excepto un caso, mientras que en los viñedos convencionales la diversidad era variable (desde baja en S10, S13 y S15 hasta muy alta en S11). La funcionalidad está relacionada con las diferentes actividades que desempeñan los microorganismos en el suelo. En este estudio la funcionalidad de los suelos era en general media, mientras que la resistencia o capacidad de la población microbiana a recuperarse frente a diversos factores de estrés era en general muy baja. En consecuencia, la resiliencia de estos suelos era también baja.

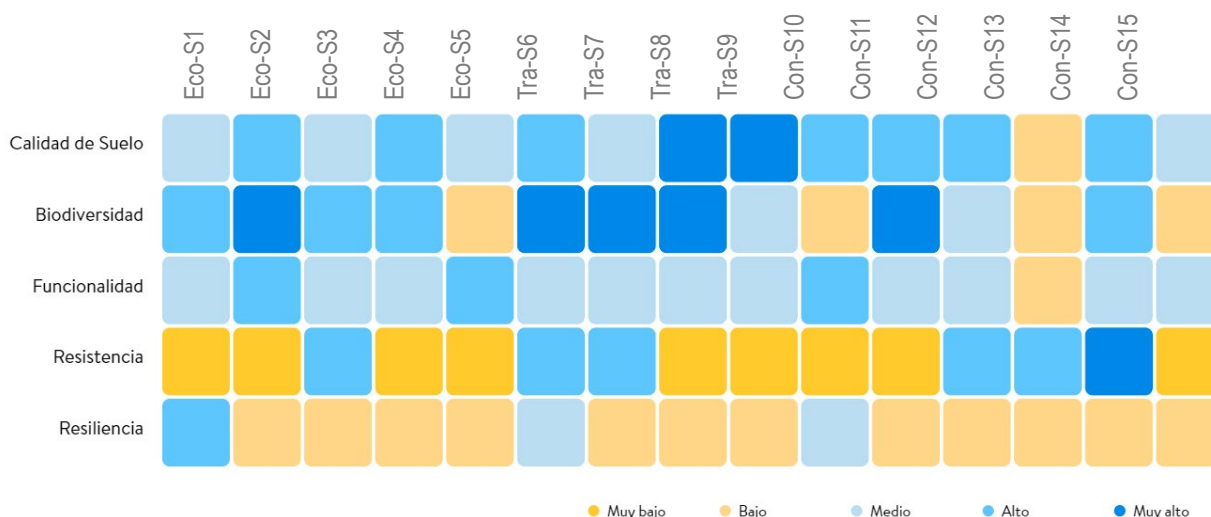


Fig. 6. mapa de calor de distintas propiedades de los suelos en base al microbioma.

En cuanto a la incidencia de patógenos relevantes para el desarrollo de la vid se detectó un riesgo bajo o muy bajo de *Botrytis*, enfermedad de Petri y podredumbre por *Cladosporium* en



todos los viñedos. Además, en la mitad de ellos se detectó riesgo de la enfermedad de pie negro de la vid, y podredumbre por *Armillaria* y/o *Aspergillus*, independientemente del tipo de manejo del viñedo.

4. Conclusiones

Los resultados de este estudio mostraron valores más altos de diversidad y fertilidad en las muestras de suelo con menor número y concentración de residuos de pesticidas y fungicidas, es decir, en los suelos de manejo ecológico y/o transición frente a los de manejo convencional. Sin embargo, para confirmar esta tendencia del sistema de manejo (convencional o ecológico) en la calidad de los suelos se necesita ampliar el estudio con un mayor número de fincas, así como incrementar el tiempo de implementación de los manejos sostenibles y respetuosos con el medio.

5. Bibliografía

1. BOKULICH, NA., COLLINS, TS., MASARWEH, C. et al. 2016. **Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics**. *Mbio* 7, <https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16> (2016).
2. FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D., NÓVOA-MUÑOZ, JC. 2019. **Os solos dos viñedos da Ribeira Sacra**. En: **Ribeira Sacra. Conservación do solo e construción da paisaxe** (eds. Arias-Estévez, M., Álvarez-Rodríguez, E.). Deputación de Ourense.
3. FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D., NÓVOA-MUÑOZ, JC., ARIAS-ESTÉVEZ, M. 2018. **El cobre en suelos de viñedo del noroeste de la Península Ibérica**. Monografías da Universidade de Vigo. *Tecnoloxía e Ciencias Experimentais*, 26. Universidade de Vigo.
4. FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D., NÓVOA-MUÑOZ, JC., DÍAZ-RAVIÑA, M., ARIAS-ESTÉVEZ, M. 2009. **Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula)**. *Geoderma*. 15. 119-129.
5. KABATA-PENDIAS, A., PENDIAS, H. 2001. **Trace Elements in Soils and Plants**. 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, 403 p.
6. PÉREZ-MAYÁN, L., RAMIL, M., CELA, R., RODRÍGUEZ, I. 2020. **Multiresidue procedure to assess the occurrence and dissipation of fungicides and insecticides in vineyard soils from Northwest Spain**, *Chemosphere*. 261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127696>.
7. SUMNER, ME, MILLER, WP. 1996. **Cation exchange capacity and exchange coefficients**. En: **Methods of Soil Analysis Part 3, Chemical Methods** (ed. Sparks, D.L.). Soil Science Society of America, Madison. pp. 1201-1229.

6. Agradecimientos

Este estudio fue financiado con fondos propios de la Consellería do Medio Rural - Xunta de Galicia procedentes del FEADER (75%), del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2,5%) y de la Comunidad Autónoma de Galicia (22,5%) proyecto AC2021E-02.

Evaluación de estrategias combinadas de fungicidas químicos y agua ozonizada en el control de mildiu: efecto sobre el microbioma de la hoja y la baya

Emilia Díaz-Losada¹, Juan Carlos Vázquez-Abal¹, Ester Abarquero¹, David Gramaje²

¹ Estación de Viticultura y Enología de Galicia. Ponte San Clodio s.n. 32428, Leiro, Ourense

²Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV). Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad de La Rioja – Gobierno de La Rioja. Ctra. LO-20 Salida 13, Finca La Grajera. 26007 Logroño.

Resumen

El elevado coste medioambiental de los fungicidas utilizados en la agricultura ha determinado políticas que restringen su utilización. Por eso en los últimos años se están llevando a cabo numerosos estudios para valorar estrategias alternativas. El agua ozonizada es conocida por su poder antioxidante, y está siendo utilizada con acción fungicida en distintos cultivos. En este trabajo se han planteado distintas estrategias de aplicación de fungicidas químicos en combinación con agua ozonizada para valorar su eficacia frente a mildiu además de evaluar el efecto de las mismas sobre el microbioma de la planta. El ensayo se realizó en un viñedo de Albariño localizado en la Denominación de Origen Rías Baixas (Galicia). Se constató una baja eficacia del agua ozonizada sobre el mildiu. La variación de la abundancia y diversidad de la microbiota de la hoja y de la baya no varió entre las estrategias establecidas, sin embargo se observó un incremento en la abundancia de la misma en los últimos muestreos del mes de septiembre.

1. Introducción

El ozono está considerado como un agente desinfectante, y su uso en distintos puntos de la cadena agroalimentaria está ampliamente demostrado (Bellincontro y col.2017). El desarrollo de sistemas de ozonización del agua y su acoplamiento a pulverizadores agrícolas está permitiendo que pueda ser utilizado en diversos cultivos (Fujiwara y col., 2009).

En los últimos años, consecuencia de un aumento de la sensibilización hacia un cultivo más sostenible del viñedo, se buscan alternativas a la utilización de productos químicos de síntesis. Por ello, se está contemplando la utilización de agua ozonizada en sustitución de productos químicos anti-mildiu. Sin embargo, existen pocos referentes de su eficacia en viñedo, ni del efecto que este produce en la microbiota de la planta.

Las técnicas de secuenciación masiva (NGS) facilitan un mapeo de microbiomas complejos en muestras ambientales, siendo una herramienta valiosa para los estudios comparativos de las comunidades microbianas. La dinámica y la distribución del microbioma están condicionada por el genotipo, la especie, la edad y el estado de salud de la planta, así como por factores medioambientales incluyendo las prácticas de gestión de los cultivos (Lindow y Brandl 2003; Whipps y col. 2008; Berendsen y col. 2012).

En este estudio con la finalidad de valorar la eficacia del agua ozonizada frente a mildiu se establecieron distintas estrategias de aplicación. Además, se evaluó la dinámica de



comunidades bacterianas y fúngicas en las estrategias que ha permitido mejor control de la enfermedad.

2. Material y Métodos

2.1. Localización del ensayo

El ensayo se ha llevado a cabo en un viñedo comercial de la variedad Albariño propiedad de la Cooperativa Martín Codax, en el ámbito geográfico de la Denominación de Origen Rías Baixas (Pontevedra, España), durante la campaña 2021. Las condiciones climáticas de la zona determinan la existencia de una elevada presión del patógeno que requiere de la aplicación, como media de 10 tratamientos con fungicidas químicos de síntesis para el control de enfermedades endémicas, mildiu, oídio y botrytis.

2.1. Diseño experimental

Con un diseño experimental de bloques aleatorizados con tres repeticiones, se han establecido las siguientes estrategias de aplicación: (T1) aplicación de agua ozonizada (OW) y fungicidas químicos (CHF) para el control de *Erysiphe necator*, (T2) OW y CHF para control de *Plasmopara viticola*, (T3) aplicación OW durante toda la campaña de producción, (T4) OW en alternancia con CHF para control de los tres patógenos, (T5) aplicación de OW durante toda la campaña a excepción de etapas fenológicas de alta sensibilidad a los patógenos mencionados en las que se aplican CHF, (T6) aplicación de CHF durante toda la campaña. En la aplicación de los distintos tratamientos se tuvo en cuenta la previsión de infección en base a la plataforma de Monet Viticultura.

2.2. Evaluación de la incidencia de mildiu

La incidencia de mildiu se determinó siguiendo la metodología propuesta por la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPPO, 2009). Se calculó el grado de ataque para cada estrategia (Towsend-Heuberger, 1943). Para el establecimiento de diferencias estadísticas entre las estrategias se llevó a cabo un ANOVA utilizando el test de Fisher. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico XLSTAT-2020.

2.3. Estudio de la microbiota

En las estrategias que dieron mejores resultados para el control de mildiu se recogieron muestras de hojas y bayas en 3 plantas por repetición y estrategia. Se realizaron muestreos mensuales de hojas, de desde abril a septiembre. Las bayas se muestrearon a finales de julio, finales de agosto y en fecha de vendimia. Los muestreos se realizaron aproximadamente 9 días tras la aplicación de tratamientos, a excepción de la recogida de abril que se realiza 3 días después y la del 9 de septiembre que se realizó después de un periodo de 21 días sin tratamiento.

Para la extracción del ADN de las muestras se utilizó el kit Isolate II Plant DNA (Bioline). La diversidad de la comunidad fúngica en cada muestra se analizó mediante amplificación del espaciador eucariota ITS2 (White y col. 1990), y para la identificación de la diversidad bacteriana se analizó la región 16S rRNA (Parada, y col. 2016, Apprill y col. 2015). Las reacciones de



secuenciación se desarrollaron con la tecnología Illumina MiSeq. El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de la plataforma MicrobiomeAnalyst.

3. Resultados

3.1. Efecto del agua ozonizada en el control de *P. viticola*

El grado de ataque *P. viticola* en las primeras etapas de infección en hoja, mes de abril, (fig.1a) fue similar en los distintos tratamientos, mientras que a medida que aumentaba el grado de infección, muestreos de mayo y junio, se observan diferencias significativas entre los tratamientos siendo, en el mes de junio, los tratamientos T2 T5 y T6 los que presentan menor porcentaje de grado de ataque. Los tratamientos T1, T3 y T4 muestran un grado de ataque superior al 40%.

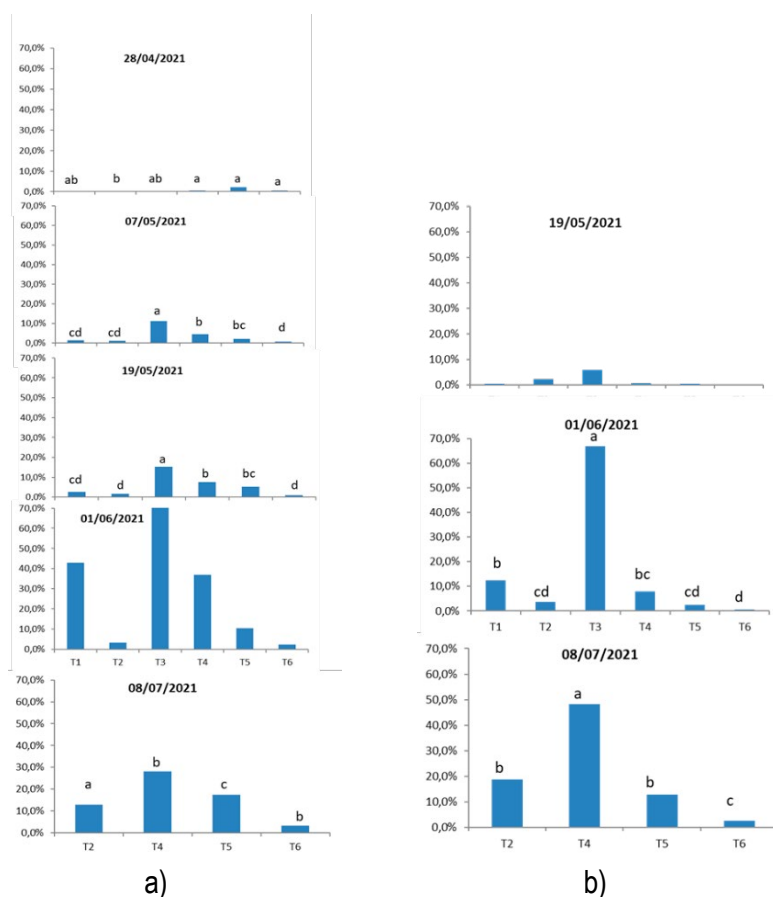


Fig. 1. Grado de ataque de *P. viticola* en hoja (a) y racimo (b), en las distintas fechas de muestreo y los distintos tratamientos.

(T1) aplicación de agua ozonizada y fungicidas químicos (CHF) para el control de *E. necator*, (T2) OW y CHF para control de *P. viticola*, (T3) aplicación OW durante toda la campaña de producción, (T4) OW en alternancia con CHF, (T5) aplicación de OW durante toda la campaña a excepción de etapas fenológicas de alta sensibilidad a los patógenos mencionados en las que se aplican CHF, (T6) aplicación de CHF durante toda la campaña. Las estrategias T1 y T3 en la última fecha de muestreo no se evaluaron por la alta destrucción de la planta. Letras distintas indican diferencias significativas para $p < 0,05$.



Resultados similares se obtuvieron en la evaluación de la incidencia de *P. viticola* en racimos (fig.1.b).

En la campaña de estudio no se ha observado incidencia de *E. necator* ni de *Phyllosticta ampellicida*, que junto con *P. viticola* causan las principales enfermedades que afectan al viñedo gallego. Esta baja incidencia podría explicar los resultados similares obtenidos para las estrategias T2 y T6.

Este estudio demuestra que en etapas iniciales con baja presión de *P. viticola*, la utilización de ozono podría considerarse como complementaria para el control de la enfermedad, sin embargo, deja de ser efectivo con presiones altas de infección.

3.2. Dinámica de las comunidades de hongos y bacterias en función de las estrategias de aplicación y la fecha de muestreo.

En este estudio se evaluó la dinámica de las comunidades bacteriana y de hongos en hojas y bayas de la vid a lo largo del ciclo de la vid y en función de las 3 estrategias de aplicación que presentaron mejores resultados en el control de mildiu: T2, T5, y T6.

La riqueza de microorganismos (diversidad α) medida a través del Índice de Chao1 (fig1), así como la abundancia de la diversidad observada (Índice de Shannon, datos no mostrados) no ha variado entre estrategias de aplicación de tratamientos ($p>0,05$), si bien se observa una tendencia a un menor número de hongos y bacterias en la estrategia T6, condicionado por un mayor número de tratamientos con productos químicos de síntesis. Resultados similares han sido obtenidos por Gobbi y col. (2020), evaluando el efecto de la aplicación de cobre en los viñedos.

La riqueza de microorganismos ha variado significativamente en función de la fecha de muestreo observándose mayor riqueza (fig.2) en agosto y septiembre tanto en los muestreos de hoja (fig 2 a y b) como de bayas (fig. 2 c y d). Esta variación entre muestreos también ha sido significativa en relación a la abundancia de la diversidad observada (Índice Shannon -datos no mostrados). La variación en escalas temporales de las comunidades filosféricas ha sido puesta de manifiesto incluso en plantas perennes de las que cabría esperar una menor influencia de la edad de las hojas (Jackson y Denney, 2011). En nuestro caso, además de la edad de la hoja, hay que tener en cuenta que los tratamientos antifúngicos se finalizaron el 26 de julio por lo que se puede producir un periodo de recuperación de microorganismos hasta fecha de vendimia en la que se realizó el último muestreo (19 de septiembre).

Teniendo en cuenta que no se observaron diferencias significativas en relación a la abundancia de microorganismos entre tratamientos, se evalúan la diversidad teniendo en cuenta las fechas de muestreo (fig3).

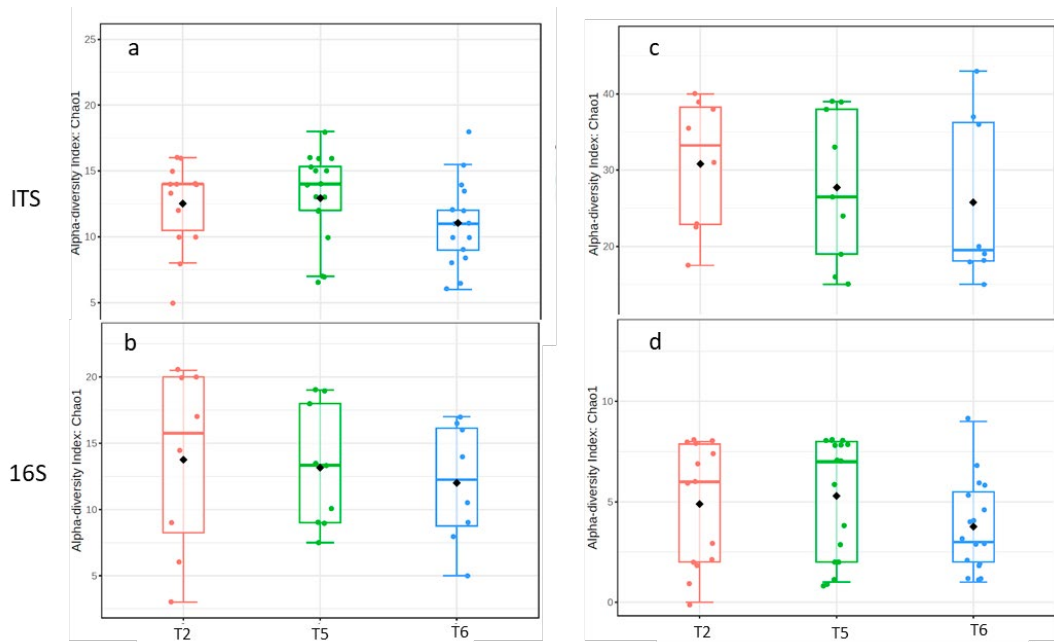


Fig. 1. Boxplot que muestra las diferencias en las medidas de diversidad α (Índice de Chao1) para hongos (ITS) y bacterias (16S) en muestras de hojas (a y b) y de bayas (c y d), para las distintas estrategias de aplicación (T2, T5, T6).

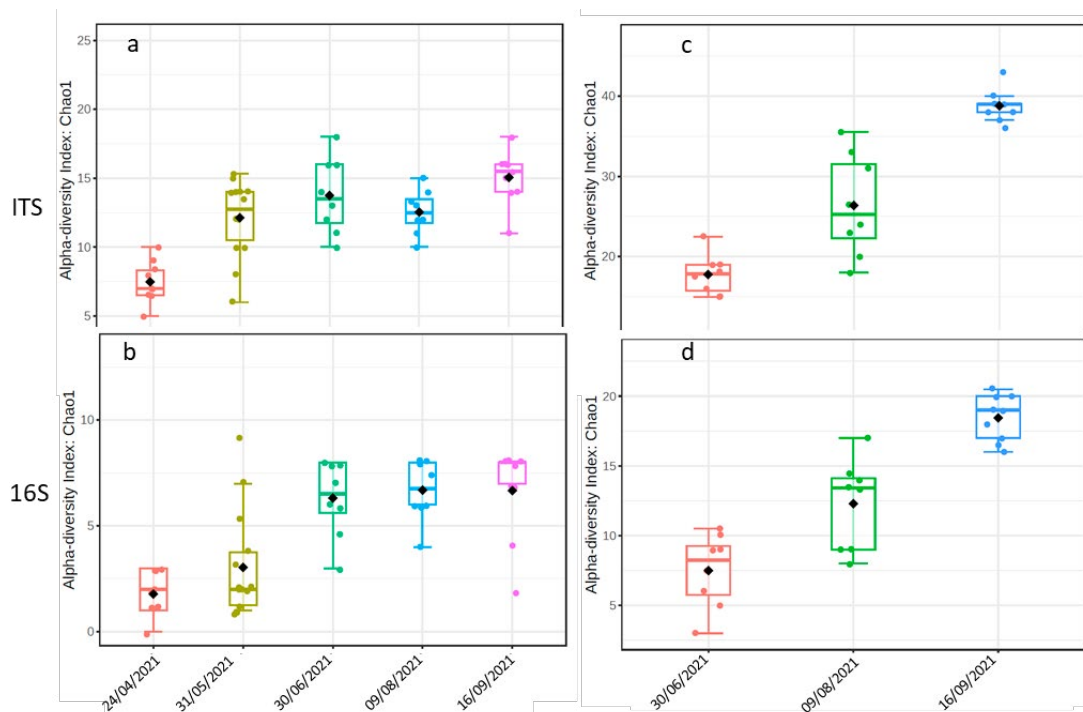


Fig. 2. Boxplot que muestra las diferencias en las medidas de diversidad Chao1 para hongos (ITS) y bacterias (16S) en muestras de hojas (a y b) y de bayas (c y d), en las fechas de muestreo.



Considerando la dinámica temporal, la biodiversidad decrece a lo largo del ciclo vegetativo como consecuencia de la aplicación de tratamientos fungicidas que modulan fuertemente la dinámica de los hongos (Pinto y col, 2014). Así, teniendo en cuenta las distintas fechas de muestreo se observa muy baja presencia de microorganismos en el muestreo de abril, 3 días después de la aplicación en campo de CHF en las estrategias T2 y T6 y de OW en la estrategia T5, ello indica el efecto supresor tanto de CHF como de OW sobre los microorganismos tanto hongos como bacterias. En el muestreo de 31 de mayo habían transcurrido 10 días desde la aplicación de CHF y en el del 30 de junio habían transcurrido 8 días después de la aplicación de CHF en las estrategias T2 y T6, mientras que en la estrategia T5 transcurrieron 19 días de la aplicación de CHF y 9 de la aplicación con OW, lo que podría explicar la mayor abundancia de microorganismos observada en el 30 de junio, y el bajo efecto supresor del ozono transcurridos 9 días después de su tratamiento. En los muestreos de agosto y septiembre se recupera la abundancia de la diversidad fúngica consecuencia de un periodo más largo sin tratamiento fitosanitarios ni con CHF ni con OW.

Aureobasidium, *Alternaria*, *Cladosporium* fueron los géneros de hongos que presentaron una mayor abundancia relativa en las muestras de hojas. Estos táxones junto con *Botrytis*, *Epicocum* y *Cutaneotrichosporum* mostraron diferencias significativas entre las distintas fechas de muestreo (fig3 a y c).

Aureobasidium es el hongo más abundante en las muestras de hoja, observándose una mayor abundancia en las muestras de mayo y junio. Este género se cita como más abundante en las hojas de plantas cultivadas en ecológico (Schmid y col. 2011), que utilizan sobre todo compuestos cobre para el control de mildiu, frente a plantas en las que se aplican tratamientos convencionales. En nuestro estudio se observan abundancias similares en la mayoría de los muestreos, a excepción del muestreo de junio en el que se había realizado un tratamiento previo con OW, que se podría explicar por el bajo efecto supresor del OW para este hongo consecuencia de la tolerancia del *Aureobasidium* a OW. Esta hipótesis podría explicar así mismo la baja presencia de *Alternaria* en el muestreo de junio.

A diferencia de los estudios de Grube y col (2011), que indica la relevancia del género *Epicocum* en la filosfera de planta de vid, en nuestros estudios no ha sido relevante observándose solamente en el muestreo de agosto y septiembre.

El género *Botrytis*, patógeno causante de la podredumbre gris en hojas y bayas, se constata su presencia en todos los muestreos, pero solo se manifiesta con una abundancia relativa importante en el mes de abril, coincidente con las etapas de más lluvias del periodo de estudio.

La diversidad fúngica ha sido más elevada en las muestras de baya, contabilizándose 35 géneros como más abundantes (fig3 d). Son también los géneros *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis* y *Epicocum* los que mostraron diferencias significativas entre los distintos muestreos. Es de destacar la abundancia de *Botrytis* en el muestreo de septiembre, frente a su presencia en agosto, explicable por las lluvias previas a los muestreos. *Epicocum* al igual que lo que sucedía en la filosfera su abundancia relativa es mayor en el mes de agosto, si bien ya es detectable en el mes de junio.

Zarraonandia y col. (2015) en muestras del cultivar Merlot indica que en las muestras de hoja, racimos y flores domina el filo *Proteobacteria*, siendo *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y el



género *Methylobacterium* los más abundantes en hoja y racimos. *Sphingomonas* y el género *Methylobacterium* han sido también relevantes en las hojas de Albariño, siendo más abundantes en agosto y septiembre (fig. 3b). Sin embargo, *Sphingomonas* fue relevante en hojas, pero no en las bayas (fig.3d)

En nuestros estudios se han identificado *Psychrobacter* y *Rhizobium* como los táxones con abundancia relativa más elevada (fig.3d). *Psychrobacter*, bacteria con relacionada con la degradación de alimentos, presentando una abundancia relativa más elevada en las muestras de junio y agosto. *Rhizobium* bacteria fijadora de nitrógeno presente mayoritariamente en el suelo, y relacionada con procesos de fijación de nitrógeno, se presentó como más abundante en el mes de junio. Zarraonaindia y col (2015) indica que la presencia de este taxón en las bayas y en las hojas, no detectadas en estudios previos puede explicarse porque estas bacterias migraron a través de las raíces a las partes aéreas, donde proliferan debido posiblemente a un mejor suministro de nutrientes y a una menor competencia con otras bacterias.

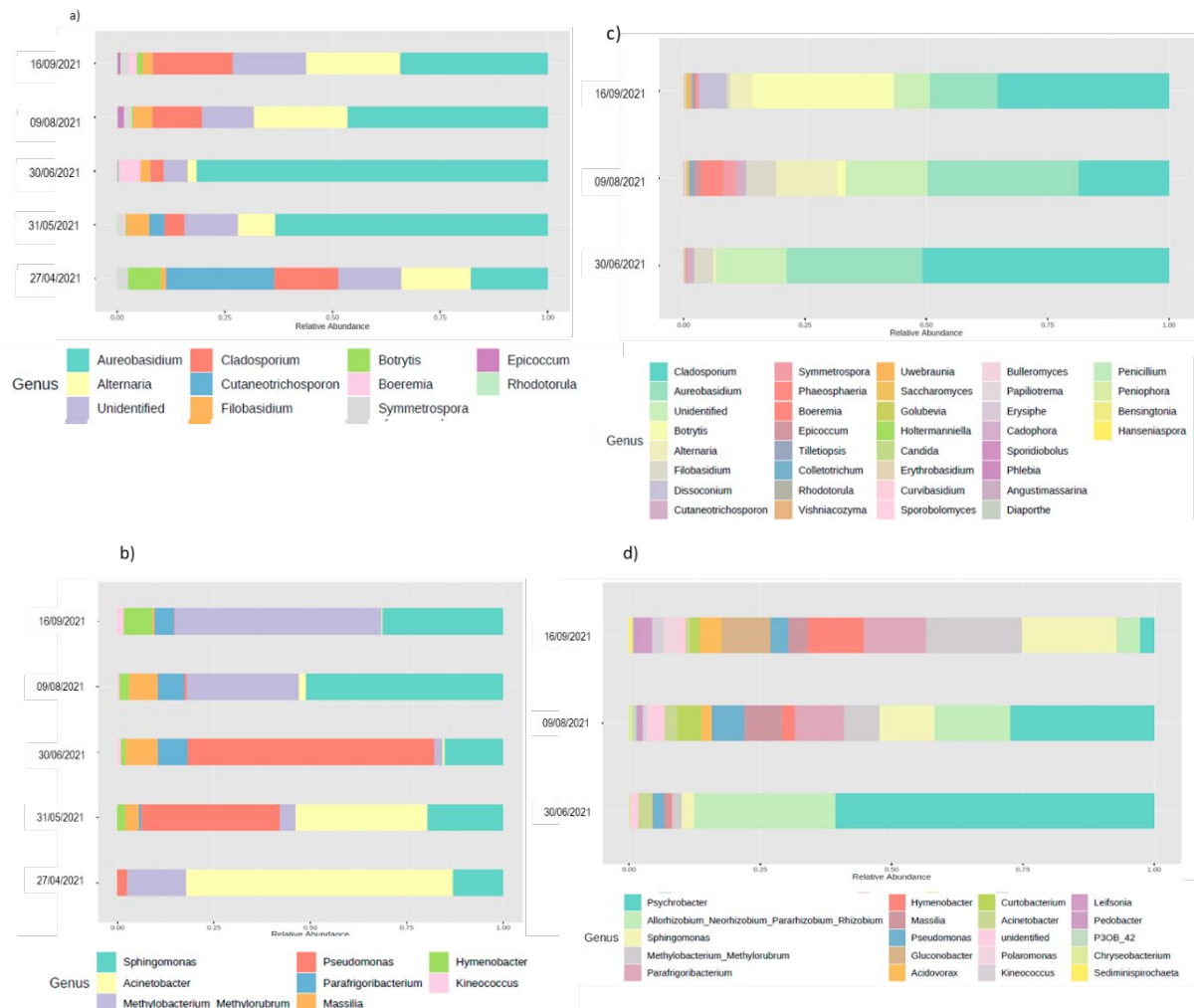


Fig.3. Diagramas de barras en las que las muestras de hongos y bacterias que se agrupan por fecha de muestreo: Fig 3 a y c representan las muestras ITS de hoja y baya respectivamente. Fig. 3 b y d representan las muestras 16S de hoja y baya respectivamente.



4. Conclusiones

La aplicación de agua ozonizada para el control de *P. viticola* en campo, tiene una baja eficacia en situaciones de elevada presión de la enfermedad, pudiendo ser utilizada como complementaria a los tratamientos químicos convencionales en las etapas iniciales de infección.

La evaluación de las comunidades microbianas en estrategias de tratamientos de aplicación en las que se combinaron productos de síntesis con agua ozonizada no ha modificado significativamente su riqueza ni su diversidad.

5. Bibliografía

1. APPRILL, A.; MCNALLY, S.; PARSONS, R.; WEBER, L. 2015. "Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton." *Aquatic Microbial Ecology* 75 (2): 129–37.
2. BELLINCONTRO, A.; CATELLI, C.; COTARELLA, R.; MENCARELLI, F. 2017. Postharvest ozone fumigation of Petit Verdot grapes to prevent the use of sulfites and to increase anthocyanin in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 23: 200-206.
3. BERENDSEN, R.; PIETERSE, C.; BAKKER, P. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci* 17:478–486
4. FUJIWARA, K.; FUJII, T.; PARK, J.-S. 2009. Comparison of foliar spray efficacy of electrolytically ozonated water and acidic electrolyzed oxidizing water for controlling powdery mildew infection on cucumber leaves. *Ozone Sci. Eng.* 31 (1): 10–14.
5. GOBBI, A.; KYRKOU, I.; FILIPPI, E; ELLEGAARD-JENSEN, L.; HESTBJERG, L. 2020. Seasonal epiphytic microbial dynamics on grapevine leaves under biocontrol and copper fungicide treatments. *Sci Rep* 10, 681 (2020).
6. GRUBE, M.; SCHMID, F.; BERG, G. 2011. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biol* 115:978–986
7. JACKSON, C.R.; DENNEY, W.C. 2011. Annual and Seasonal Variation in the Phyllosphere Bacterial Community Associated with Leaves of the Southern Magnolia (*Magnolia grandiflora*). *Microb Ecol* 61, 113–122.
8. LINDOW, S.; BRANDL, M. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69:1875–1883
9. PARADA, AE.; NEEDHAM, DM.; FUHRMAN, JA. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ Microbiol.* 18(5):1403-14.
10. PINTO, C.; PINHO, D.; SOUSA, S.; PINHEIRO, M.; EGAS, C.; GOMES, A. 2014. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS ONE* 9: e85622
11. TOWNSEND, G.R. y HEUBERGER, J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.* 24: 340-343.
12. TURENNE, CY.; SANCHE, SE.; HOBAN, DJ.; KARLOWSKY, JA.; KABANI, AM.1999. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol.* 37(6):1846-51
13. WHIPPS, J.; HAND, P.; PINK, D.; BENDING, G. 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol* 105:1744–1755



14. WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics." PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications 18 (1): 315–22.
15. ZARRAONAINDIA, I.; OWENS, SM.; WEISENHORN, P.; WEST, K.; HAMPTON-MARCELL, J.; LAX, S.; BOKULICH, NA.; MILLS, DA.; MARTIN, G; TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; GILBERT, JA. 2015. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. mBio. 24;6(2): e02527-14.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado como parte del proyecto piloto "VITIOZÓN" Ref. FEADER 2020/059A, financiado con fondos Feader en un 75 %, con fondos propios de la Xunta de Galicia en un 22,5 % y con fondos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en un 2,5 %.

Gestión del riego en parcelas demostrativas de viña en la Vall del Corb (DO Costers del Segre)



Elisabet Perna¹, Lluís Giralt¹, 1Claustre Grau¹, Rosa Bisa², Jordi Carbonell¹, Maite Sisquella³, Mercé Solé³, David Tous⁴

¹ Institut Català de la vinya i el vi. (INCAVI), ²ADV Vall del Riu Corb, ³Oficina de Regant del Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya. ⁴SAF-Samplig Water Plaça Àgora, 2-3, 08720, Vilafranca del Penedès, Barcelona. 93.890.02.11. eperna@gencat.cat

Resumen

En el año 2017 INCAVI inicia la actividad demostrativa: Seguimiento de la introducción de riego en parcelas de viña en la DO Costers del Segre, sub-zona Valls del Corb. Se trabaja conjuntamente con la DO Costers del Segre, la ADV de la Vall del Corb y la Oficina del Regant. La actividad tiene por objetivo principal poner a disposición del viticultor información actualizada y contrastada que le permita optimizar la estrategia de riego en el viñedo, sobre criterios de ahorro de agua de riego y máxima calidad del vino final. Para ello se establecen dos viñedos de referencia en la que se determina por parte de los técnicos de INCAVI el momento, la dosis y la periodicidad del riego que se envía a los viticultores mediante un boletín informativo semanal. Como soporte técnico a la decisión, se instalan estaciones meteorológicas, sensores de humedad del suelo y se mide el potencial hídrico de la planta como índice de estrés. Se plantean diferentes periodicidades en la aportación de agua de riego (diaria o semanal i según necesidades), en contraste con la no aportación de agua de riego. En estas diferentes hipótesis se realiza un seguimiento del desarrollo vegetativo, del crecimiento y maduración del fruto, de la producción y de la calidad del mosto. En la bodega experimental del INCAVI de Reus, se elaboran vinos a partir de la uva de las diferentes hipótesis, de los que se realiza el análisis físico, químico y sensorial. También se observa la relación de los datos obtenidos por los sensores de la humedad del suelo con el potencial hídrico foliar, en diferentes condiciones, abriendo la posibilidad de utilizar los datos de humedad del suelo, obtenidos de forma continuada, como índice de estrés hídrico de la planta. Se presentan los resultados obtenidos desde el año 2018 al 2022.

1. Introducción

El riego del viñedo en zonas áridas asegura la homogeneidad de la producción tanto entre las diferentes parcelas de cultivo como en los distintos años, estabilizando los rendimientos de las empresas vitivinícolas. Es necesaria una buena gestión del riego para evitar efectos negativos



sobre la calidad de las cosechas y para optimizar el gasto de agua. El viñedo, y más concretamente el potencial cualitativo de los mostos, es muy sensible a condiciones agronómicas que incidan en el vigor o en el grado de producción. Una excesiva disponibilidad de agua puede provocar un incremento del vigor que vaya en contra del proceso de la maduración y/o que provoque una dilución de los elementos que definen el potencial enológico del vino. Por otra parte, una disponibilidad de agua insuficiente puede impedir la actividad fotosintética con efectos sobre el desarrollo de la planta en su conjunto y de las bayas en particular.

En la zona de la Vall de Riucorb, zona vitícola histórica de secano, con la entrada del canal Segarra–Garrigues, se consideró necesario hacer asesoramiento al sector vitícola en la introducción del riego como herramienta de gestión de los viñedos, con el fin de mantener la calidad y tipicidad del vino de DO. Desde el año 2018 se ha elaborado un boletín semanal para compartir permanentemente la información con los viticultores de esta área, se realizan visitas periódicas a las parcelas donde se hace el seguimiento comparativo para poder contrastar y valorar la evolución de la vegetación in situ, así como definir un protocolo de toma de decisiones para un riego de apoyo que asegure la producción anual y mantenga o mejore la calidad y el potencial enológico de la vendimia, bajo criterios de ahorro en el consumo de agua. Como base de comparación se han realizado vinificaciones comparativas entre diferentes estrategias aplicadas, y realizado la valoración sensorial de los vinos elaborados.

2. Material y Métodos

- Selección de parcelas:

Se seleccionan dos parcelas representativas de la zona de la Vall del riu Corb:

1. Viña del Camí de Sant Martí, de variedad Tempranillo. Viñedo de vigor alto en la que se busca un nivel de producción importante. El trabajo en variedades tintas abre la posibilidad de valorar la incidencia sobre la maduración fenólica y el color de la uva. En esta parcela se comparan tres tesis:
 - a. Secano
 - b. Riego INCAVI: riego según los criterios técnicos de INCAVI
 - c. Riego Flavià: riego según criterios del viticultor que cultiva el viñedo.

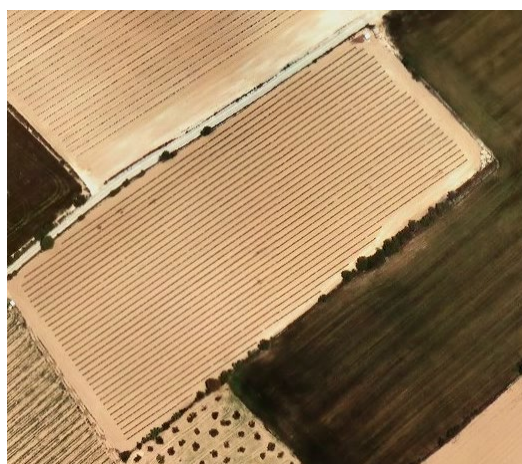


Fig. 1. Vista aérea de la parcela del Camí de Sant Martí.



2. Viña de Cercavins, de variedad Macabeo en la que se ha aplicado el riego de apoyo desde hace pocos años. Las tesis con las que se trabaja son:
 - a. Secano
 - b. Riego INCAVI



Fig. 2. Vista aérea de la parcela de Cercavins.

- Análisis de suelo:

Se realiza el análisis de suelo de las parcelas en aquellos factores estructurales que inciden en la dinámica del contenido de agua como reservorio de la planta.

- Seguimiento y recopilación de datos meteorológicos

En la parcela de Cercavins se instaló una estación meteorológica completa que aporta los valores de temperatura, humedad atmosférica, pluviometría, iluminación, intensidad y dirección del viento y a partir de estos datos calcula la evapotranspiración de referencia por la fórmula de Penman-Monteith. Datos necesarios para la gestión del riego planteada.

Para la parcela de Sant Martí se utilizan los datos de la estación automática de Ruralcat de Sant Martí de Riucorb, situada a unos 1000 m de la parcela.

- Seguimiento del agua disponible y recomendación de riego

En todas las parcelas se instalan sensores de humedad del suelo que permitirán seguir la dinámica de la disponibilidad hídrica por las plantas, en condiciones de riego y secano. La distribución concreta de sensores del suelo y los datos que se obtienen son los siguientes:

1. Parcela "Camí de San Martí"
 - a. Secano
 - Sensor MPS6 a 40 cm de profundidad: potencial hídrico del suelo (Kpa) y temperatura del suelo (°C)
 - b. Riego INCAVI
 - i. Sensor 10HS a 20 cm de profundidad: % humedad del suelo
 - ii. Sensor 10HS a 60 cm: % humedad del suelo



- iii. Sensor MPS6 a 40 cm: potencial hídrico del suelo (Kpa) y temperatura del suelo (°C)
- iv. Caudalímetro (mm)
- c. Riego Flavià
 - i. Sensor 10HS a 20 cm de profundidad: % humedad del suelo
 - ii. Sensor 10HS a 60 cm: % humedad del suelo
 - iii. Sensor MPS6 a 40 cm: potencial hídrico del suelo (Kpa) y temperatura del suelo (°C)
 - iv. Caudalímetro (mm)

2. Parcela Cercavins

- a. Secano
 - i. Sensor MPS6 a 40 cm de profundidad
- b. Riego (criterio INCAVI)
 - i. Sensor 10HS a 20 cm
 - ii. Sensor 10 HS a 75 cm
 - iii. Sensor MPS6 a 40 cm:
 - iv. Caudalímetro (l/m² de agua de riego aportada)

Durante el periodo de junio hasta vendimia semanalmente se realiza control de potencial hídrico con la cámara de Schollander para valorar el grado de estrés hídrico de las plantas y valorar la necesidad de riego.

- Estrategia de riego aplicada

La estrategia de riego INCAVI se basa en los criterios publicados en el artículo Determinación y control del estado hídrico de la vid efectos morfológicos y fisiológicos de la restricción hídrica en vides, (Ojeda et al. 2004) y en el libro: Fundamentos, Aplicación y Consecuencias del Riego en la Vid (Baeza et al. 2007). La necesidad de riego se basa en los valores del estado hídrico de la vid (mediciones con la cámara de Schollander), y el momento fenológico.

Para el cálculo de las necesidades hídricas del riego INCAVI calculamos la evapotranspiración del cultivo (Etc):

$$\text{Etc} = \text{ET}_0 * \text{Kc}$$

Etc: Evapotranspiración del cultivo

ET₀: Evapotranspiración de referencia: fórmula Penman-Monteith

Kc: constante de cultivo

El valor de la Kc aplicada es la publicada en la bibliografía de referencia, con un valor de 0,4 durante los meses de más estrés hídrico. A partir de la campaña 2018/2019 se aplica el 60% sobre este valor de la Kc, (resultando un valor final de 0,24), a partir de los resultados de los ensayos realizados en la zona por Agustí Villarroya (Villarroya et al. 2009). A continuación, calculamos las necesidades de riego (NR):



$$NR = (Etc - Pe)$$

Pe: precipitación efectiva

La precipitación efectiva se calcula según los criterios de la Oficina del regant del Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural de la Generalitat de Catalunya basados en las recomendaciones de la FAO, únicamente se tienen en cuenta las lluvias superiores a 4 l/m² y de estas el 75% de la precipitación total. Finalmente se calculan las necesidades netas de riego (NNR):

$$NNR = NR / e$$

e: eficiencia de riego (en riego por goteo se considera un valor de 0,9)

El **riego Flavià** es el riego aplicado por el viticultor propietario de la parcela. En general el viticultor ha empezado a regar antes (mayo-junio según condiciones de campaña) que la tesis del riego INCAVI y realiza un riego de aproximadamente 2,5 l/m² 6 días a la semana.

En la figura 3 se observan los riegos del año 2022, los realizados en la tesis de riego Flavià en color azul y en rojo la tesis riego INCAVI.

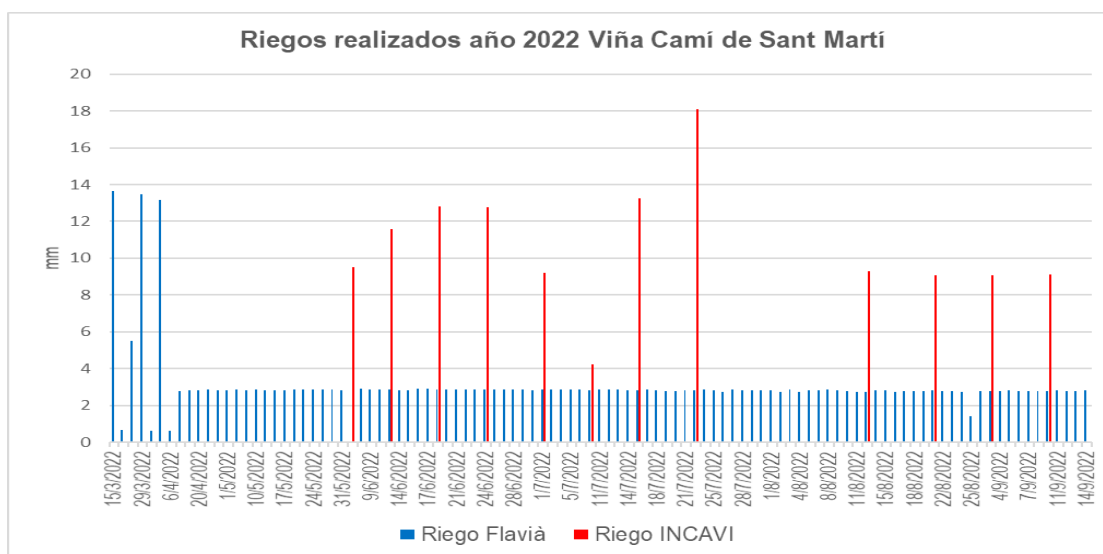


Fig. 3. Riegos realizados el año 2022 en la parcela del Camí de Sant Martí.

- Seguimiento de la vendimia y vinificación

Durante el período de maduración, previa a la vendimia, se hace un seguimiento del desarrollo de las bayas, tanto en su peso, volumen como en el análisis químico de los principales parámetros de calidad (grado alcohólico probable, acidez y pH), de las diferentes parcelas y tesis.

Durante la vendimia se realizan controles de producción, se controla la producción por cepa, el número de racimos por cepa y el peso medio del racimo.



Con las uvas cosechadas se realizan las vinificaciones para realizar el análisis físico químico de mosto y vino, y valorar la calidad organoléptica. Esta valoración se realiza por el panel de técnicos de INCAVI y también por parte de los asistentes en las jornadas de divulgación en las que se valoran los resultados de la actividad demostrativa.

3. Resultados

- Análisis de suelo:

Tabla 1. Resultados análisis de tierras de las parcelas

Parcela	Profundidad muestra	Arena (%)	Argila (%)	Limo (%)	Textura
Camí de Sant Martí (tempranillo)	0 -30 cm	36,28	21	42,72	Franca
	30 – 60 cm	47,64	21	31,36	Franca
Cercavins (macabeo)	0 -30 cm	9,64	29	61,36	Franca arcillo limosa
	30 – 60 cm	8,64	29	62,36	Franca arcillo limosa

Los datos reflejan la diferente composición en el suelo de las dos parcelas en las que se realiza el seguimiento.

La parcela del Camí de Sant Martí se observa una textura franca y la observación del perfil del suelo muestra un suelo poco profundo, entre 50 y 60 cm, con presencia de piedras. En conjunto se trata de un suelo con capacidad de reserva hídrica media/baja.

El suelo de la parcela de Cercavins, tiene una textura franca arcillo limosa, con una profundidad del suelo alta (> 1,5 metro). Suelo con capacidad media/alta de reserva hídrica.

La elección de estas dos parcelas tan diferenciadas se hizo a propósito para trabajar en dos suelos representativos de la zona, como base para realizar los boletines de información y asesoramiento al viticultor.

- Seguimiento y recopilación de datos meteorológicos

Se pueden observar los datos del histórico meteorológico de la estación meteorológica de Sant Martí de Riucorb des del año 2009 al 2022 en la tabla 2. Se exponen en períodos paralelos a las campañas vitícolas, desde el 1 de octubre al 30 de septiembre del año siguiente. La campaña 2021/2022 ha tenido la menor precipitación y la temperatura media más alta. De las 5 campañas encontramos 2018/2019 y 2019/2020 por encima de la media y las otras tres por debajo, siendo la campaña 2021/2022 la campaña con menor pluviometría de todo el periodo analizado.



Tabla 2. Precipitación acumulada, Temperatura media y evapotranspiración media de la estación meteorológica de Sant Martí de Riucorb de cada campaña del estudio y media de los datos desde la campaña 2009/2010 a la 2021/2022.

Campaña*	2017/2018	2018/2019	2019/2020	2020/2021	2021/2022	Media 2009/2022
Precipitación campaña vitícola (l/m ²)	331,4	409,3	629	331,4	262,7	375,8
Temperatura media °C	14,15	14,28	14,81	14,34	14,98	14,30
Evapotranspiración de referencia (l/m ²)	1042,44	1097,95	1053,72	1016,89	1028,34	1046,48

*La campaña se considera del 1 de octubre al 31 de setiembre.

La distribución anual de la precipitación, de la temperatura media mensual y de la evapotranspiración se puede observar las figuras 4, 5 y 6 respectivamente.

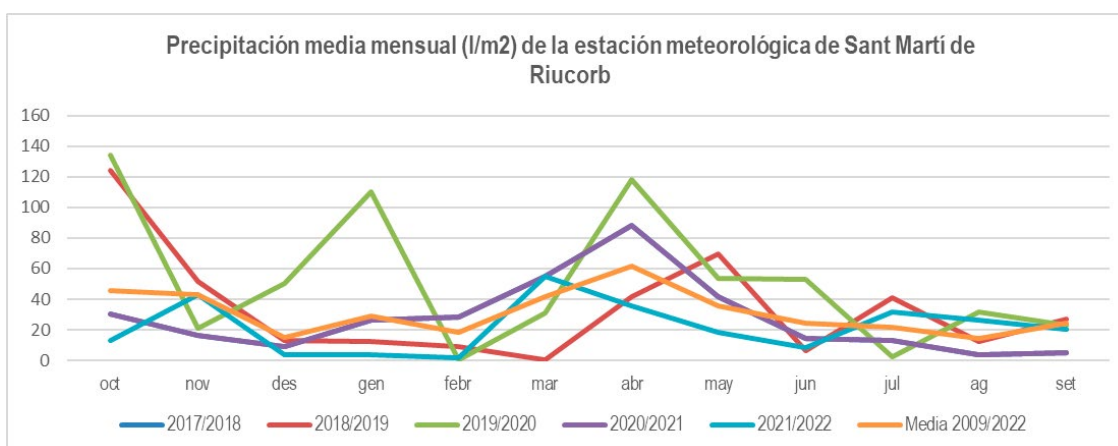


Fig. 4. Precipitación media mensual (l/m²) de la estación meteorológica de Sant Martí de Riucorb.

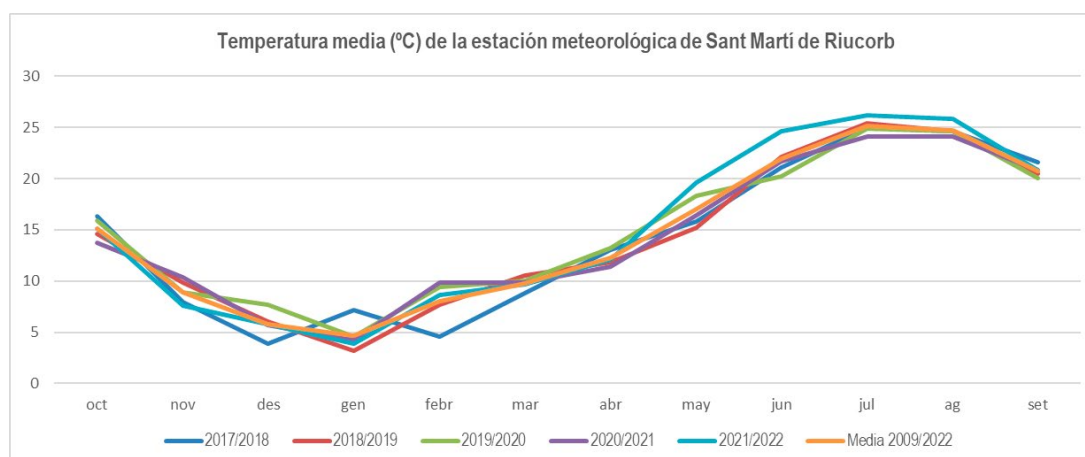


Fig. 5. Temperatura media mensual (°C) de la estación meteorológica de Sant Martí de Riucorb.

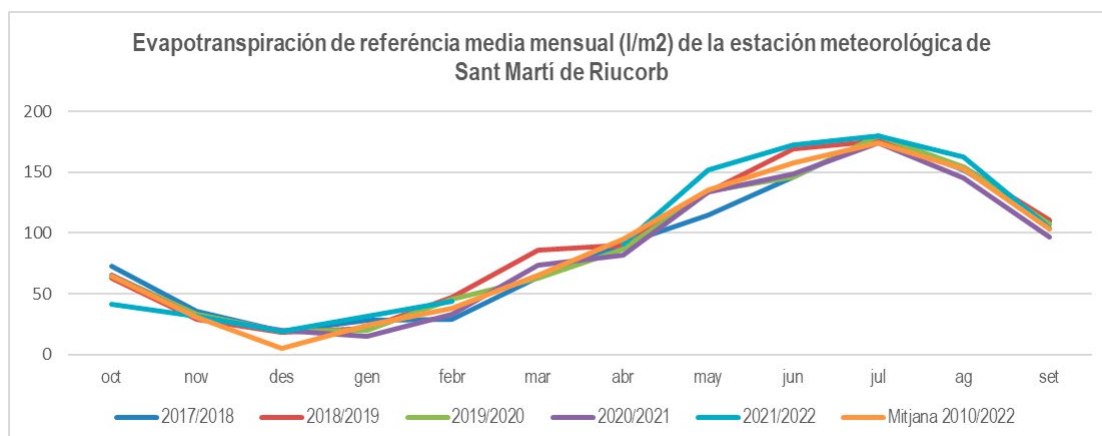


Fig. 6. Evapotranspiración de referencia media mensual (l/m²) de la estación meteorológica de Sant Martí de Riucorb.

- Seguimiento del agua disponible y recomendación de riego

Se presentan los resultados de la parcela del camí de Sant Martí, en la que las diferentes tesis estudiadas obtienen datos más diferenciados, debido a tener unas condiciones de mayor aridez y comparar tres tesis distintas.

La disponibilidad hídrica mensual se resume en la tabla 3, en las diferentes tesis comparadas. Se relaciona el volumen mensual de agua aportada en riego a la que se suma la lluvia mensual efectiva y la evapotranspiración potencial calculada por la estación meteorológica automática Sant Martí de Riucorb. En las últimas tres columnas se divide el agua efectiva por la evapotranspiración efectiva en %. El resultado obtenido permite valorar de forma aproximada, la constante de cultivo (Kc) aplicada realmente.

Tabla 3. Parcela Camí Sant Martí Agua disponible. Periodo abril-septiembre

Año	Precipitación efectiva (l/m²)	Riego (l/m²)		Riego + precipitación efectiva (agua total efectiva) (l/m²)		ET0 (l/m²)	% Agua efectiva / ET0		
		INCAVI	Flavià	INCAVI	Flavià		Secano	Riego INCAVI	Riego Flavià
2018	98,3	131,1	141,3	229,4	239,6	699,4	14	33	34
2019	120,9	93,43	129,83	214,3	250,7	719	17	30	35
2020	211,5	119,0	132,0	330,5	343,5	808,6	26	41	42
2021	129,6	92,9	(1)*	222,5	*	862,9	15	26	*
2022	91,2	137,0	260,92	228,3	352,1	862,5	11	26	41
Media	130,3	114,7	166,0	245,0	296,5	790,5	16,5	31,1	38,1

* Por una incidencia técnica del caudalímetro no se tienen datos en el año 2021.



La tesis de secano recibe, de media el 16% de la evapotranspiración de referencia, frente al 31% en el riego INCAVI y el 38% del Riego Flavià. El valor de la K_c propuesta en bibliografía durante los meses de máximo estrés potencial para el viñedo es de 0,4, en el caso de riego INCAVI se aplica una K_c de 0,24. En los dos últimos años de estudio, estos valores fueron los aplicados realmente, permitiendo analizar correctamente el efecto real sobre el desarrollo vegetativo y productivo de la vinya. Estas diferencias, así como la periodicidad del riego, han mostrado tener una gran incidencia sobre el desarrollo vegetativo de las plantas y su capacidad productiva.

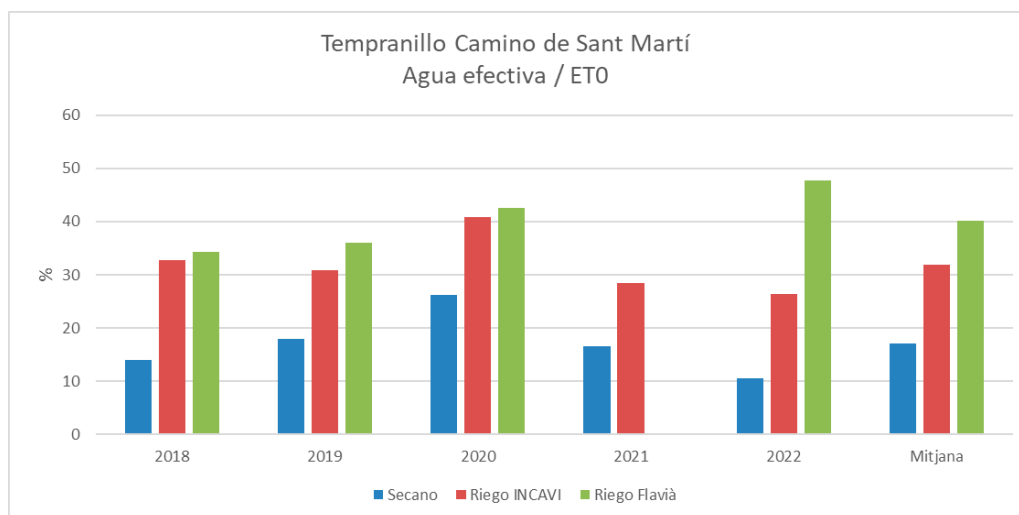


Fig. 7. Agua efectiva de la parcela del Camí de Sant Martí

- Análisis de relación entre potencial hídrico de hoja y de suelo

Se ha realizado la correlación de los datos correlación potencial hídrico de hoja obtenido con la cámara de Schollander y el potencial hídrico del suelo obtenido con el sensor MPS6, durante los diferentes años y tesis. Como ejemplo se pueden observar los resultados obtenidos en la tesis de secano en la parcela camí de Sant Martí. El grado de correlación resulta mayor cuando únicamente tenemos en cuenta un año, al añadir diferentes años disminuye, aunque todavía mantiene un grado de relación importante. Estos resultados muestran una incidencia importante del factor año.

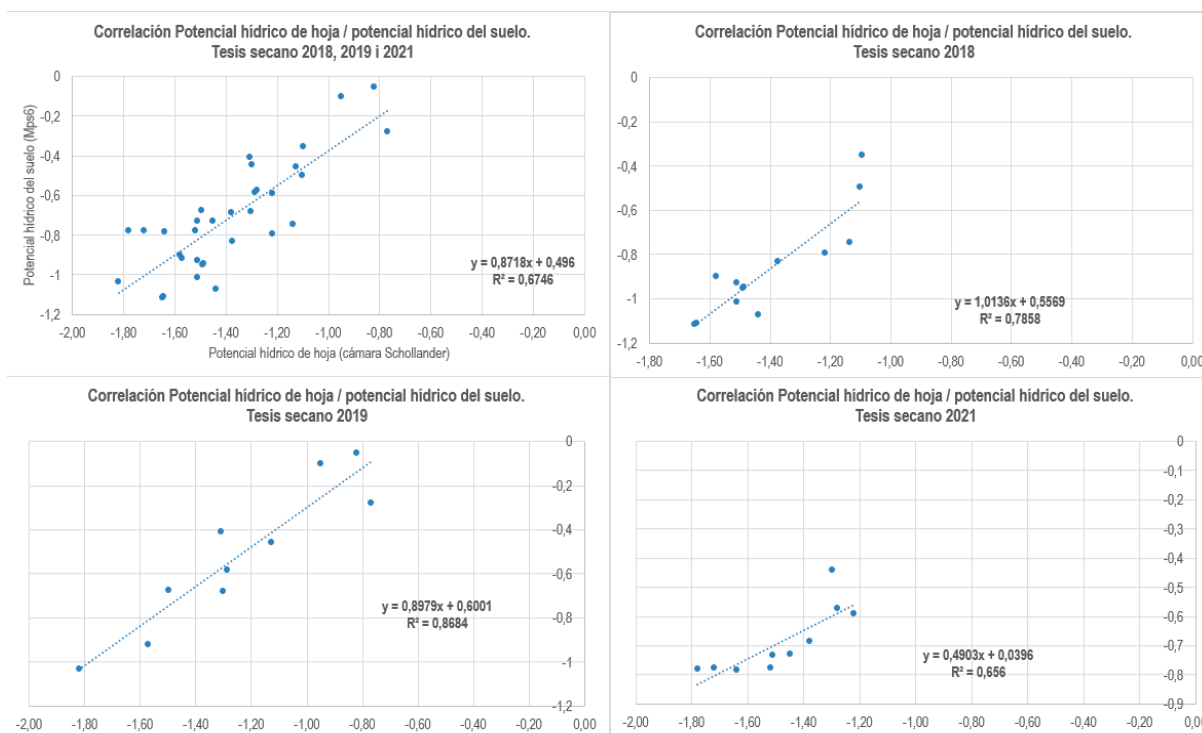


Fig. 8. Correlación Potencial hídrico de hoja / potencial hídrico del suelo, tesis secano 2018, 2019 i 2021

- Desarrollo vegetativo

En el mes de julio, en el momento en que el desarrollo vegetativo ha sido completo se calcula la superficie foliar expuesta (Smart, R 1991). En la figura 9 se puede observar que la superficie foliar expuesta es mayor todas las campañas estudiadas, en la tesis de riego Flavià (no hay datos del año 2022 debido a que el viticultor había recortado la tesis), seguida de riego INCAVI y secano.

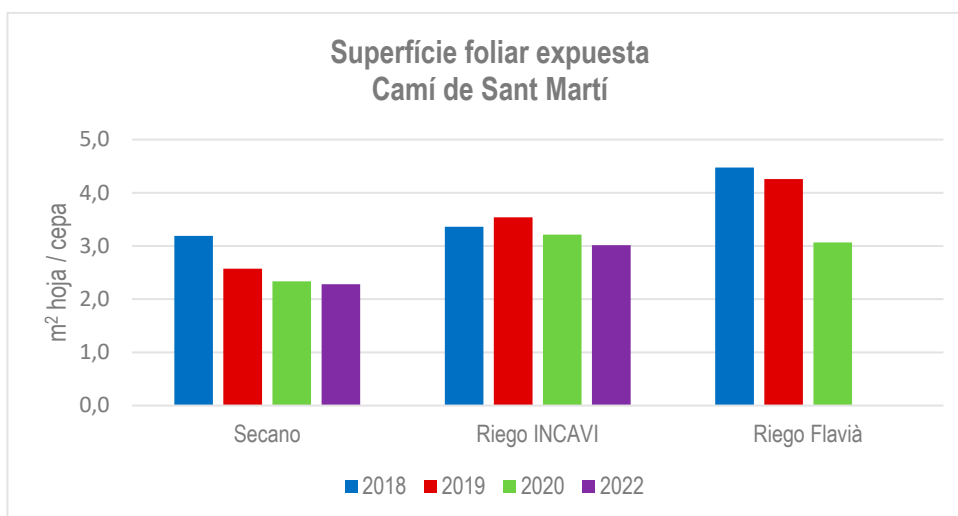


Fig. 9. Superficie foliar expuesta de la parcela del Camí de Sant Martí



- Vendimia

La producción por cepa es mucho mayor en el riego Flavià, duplicando la producción de la tesis en secano, seguida del riego INCAVI (figura 10). Igualmente el peso de los racimos es mayor en el caso de riego Flavià seguido del riego INCAVI y la tesis de secano (figura 11). No hay datos del año 2020 debido al gran ataque de mídiu en la parcela.

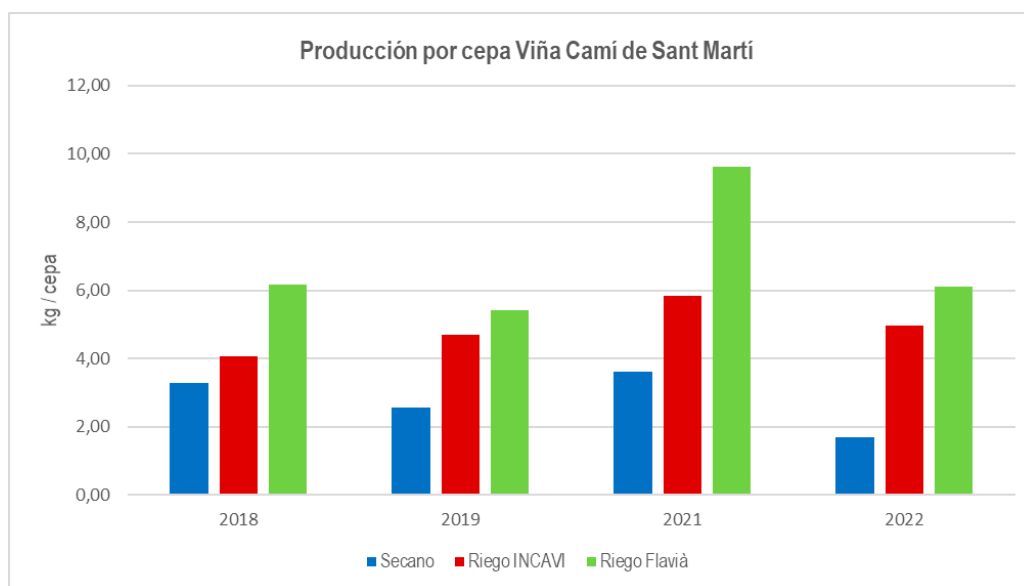


Fig. 10. Producción por cepa (kg) de la parcela del Camí de Sant Martí

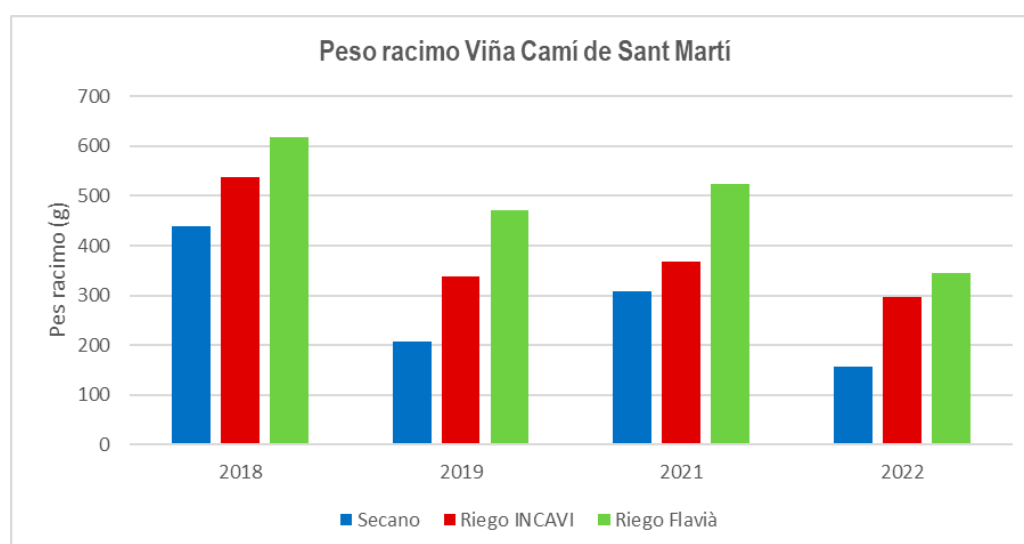


Fig. 11. Peso medio del racimo de la parcela del Camí de Sant Martí



Los parámetros de calidad del mosto, no presenta grandes diferencias entre las tesis estudiadas, tal como se observa en las figuras 12, 13 y 14. La tendencia es a un mayor grado de madurez en la tesis de secano, especialmente acusada en el año 2022 (con un efecto acumulado de 5 años sin riego). Este mayor grado de madurez se observa especialmente en la acidez y en el pH.

Cabe destacar que durante el año 2022 la tesis de secano tuvo un nivel de estrés hídrico muy alto, con una defoliación importante. Este efecto supuso una maduración en condiciones no óptimas, produciendo desequilibrios en la composición del mosto, como refleja el pH.

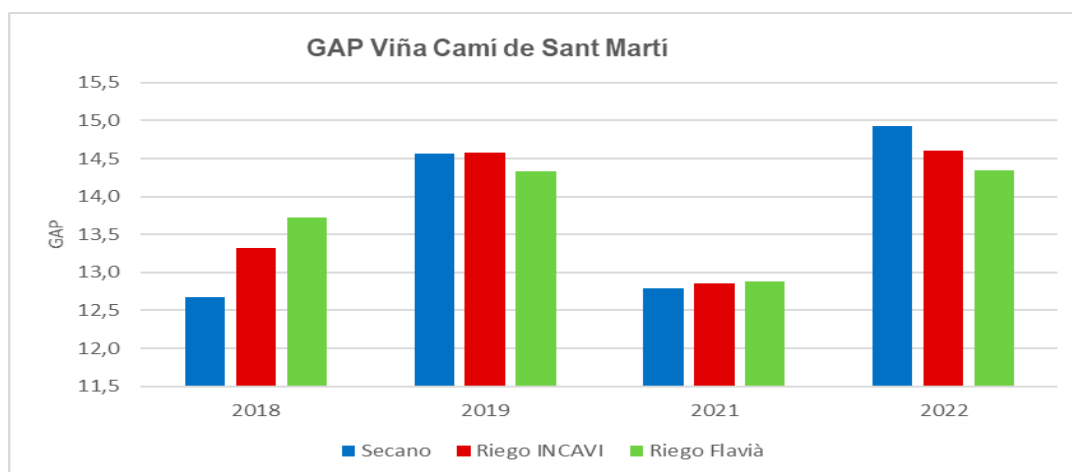


Fig. 12. Grado alcohólico probable (GAP) de la parcela del Camí de Sant Martí

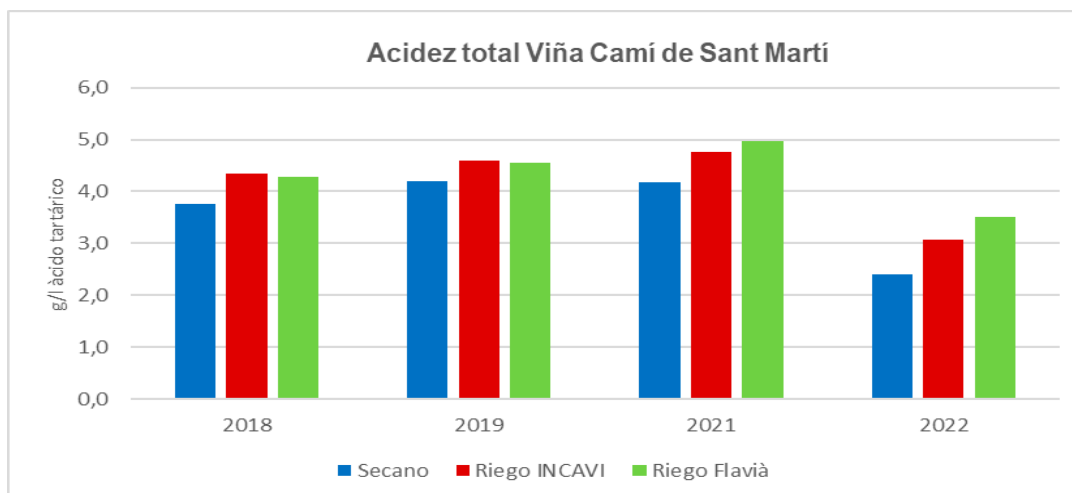


Fig. 13. Acidez total (g/l ac. Tartárico) de la parcela del Camí de Sant Martí

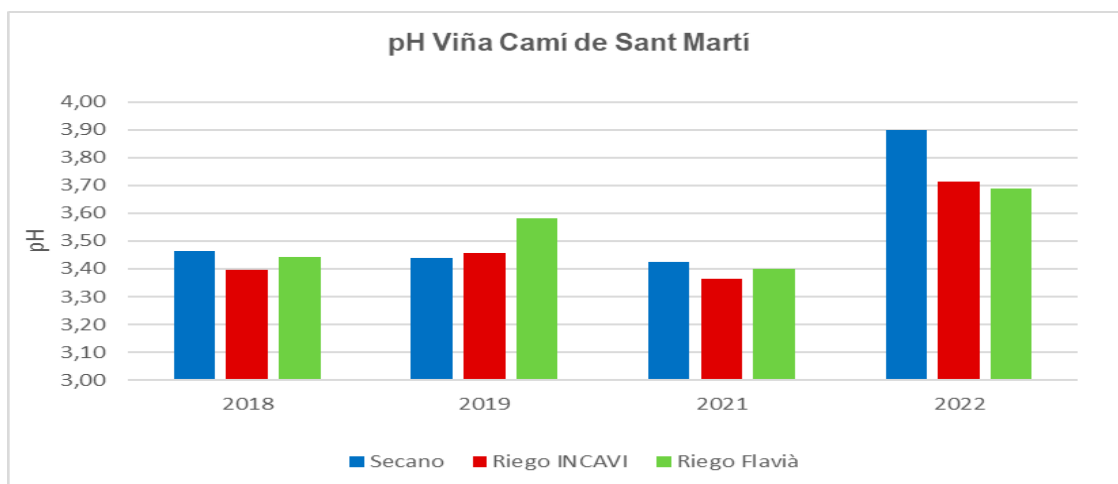


Fig. 14. pH de la parcela del Camí de Sant Martí

- Análisis sensorial del vino

La figura 15 muestra los resultados de los aspectos sensoriales de los vinos obtenidos los diferentes años. Los vinos de la tesis Riego INCAVI son los que presentan un comportamiento más regular.

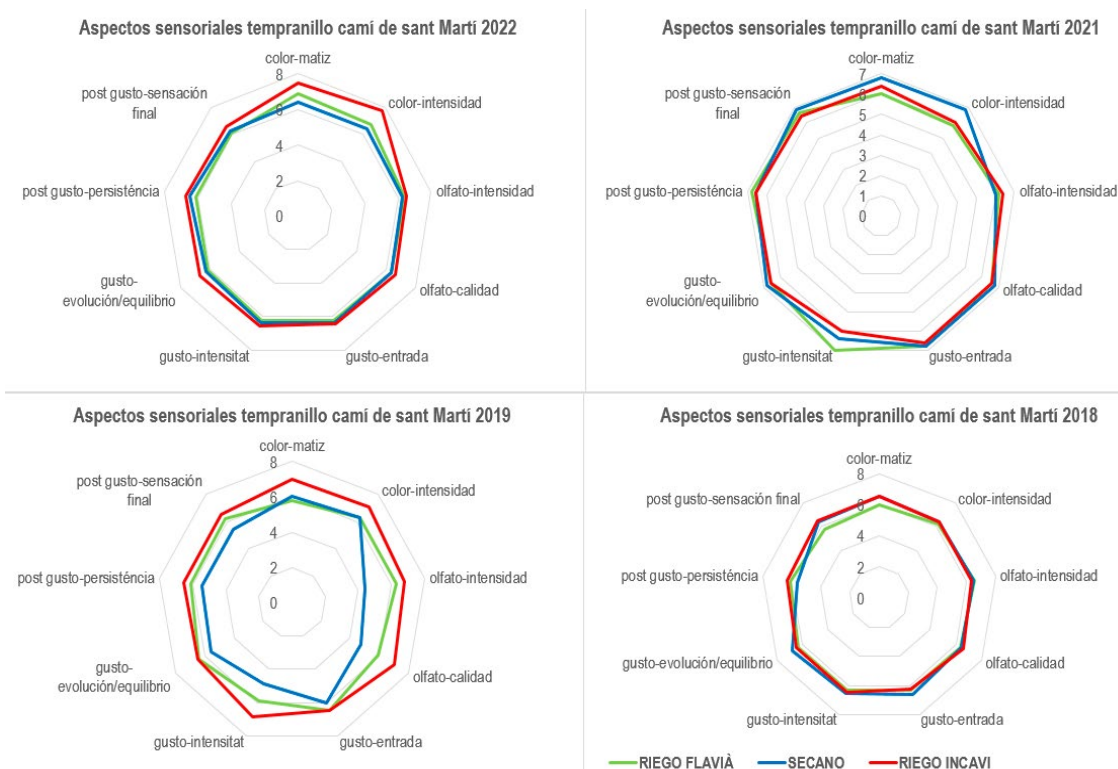


Fig. 15. Aspectos sensoriales tempranillo camí de Sant Martí 2022, 2021, 2019 y 2018



La figura 16 muestra los resultados del análisis sensorial sobre los aromas percibidos por los catadores en el año 2022, en el que la diferencia de las dosis de riego aportadas es mayor. Se observa que en el vino de la tesis Flavià se detectan aromas vegetales que indicarían, conjuntamente con un menor color, una menor maduración fenólica. La tesis INCAVI se ha puntuado mejor en aromas de fruta roja y fresca.

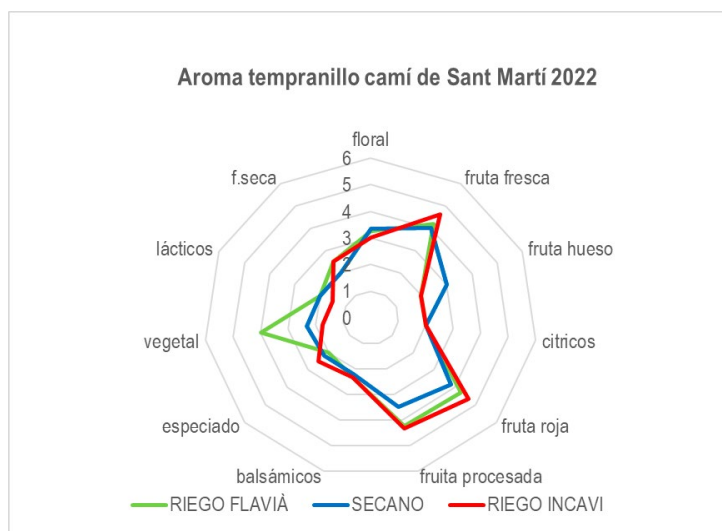


Fig. 14. Aspectos sensoriales tempranillo camí de Sant Martí 2022, 2021, 2019 y 2018

4. Conclusiones

Buen funcionamiento de la red de sensores. Los datos obtenidos y su interpretación técnica suponen una buena base en el apoyo a la decisión por el viticultor.

La interpretación de los datos de los sensores, debe tener en cuenta la composición del suelo y el año como factores de variabilidad

El estudio de la correlación entre los datos de potencial hídrico del suelo y el potencial hídrico foliar, abre la posibilidad de generar algoritmos para la automatización del sistema.

Ajustar la Kc, ha permitido una producción que se está dentro de los niveles de la DO, con un vino de calidad muy regular, manteniendo criterios de ahorro de agua, necesario en las condiciones de crisis climática.

5. Bibliografía

1. BAEZA, PILAR; LISSARRAGUE; SANCHEZ, PATRICIA. 2007. **Fundamentos, Aplicación y Consecuencias del Riego en la Vid**. Editorial Agrícola Española, S.A. 84-85441-86-93.
2. GIRALT, LLUIS; PERNA, ELISABET 2023 **Gestió del reg en parcel·les demostratives de vinya a la Terra Alta i Valls del Corb**. Dossier tècnic "Reg de precisió" num.121 Ruralcat. Pág.31-33.



3. OJEDA, HERNAN; DELOIRE, ALAIN; WANG, ZENPHING; CARBONNEAU, ALAIN. 2004 **Determinación y control del estado hídrico de la vid efectos morfológicos y fisiológicos de la restricción hídrica en vides.** Viticultura/enología Profesional. Nº90 Pág. 27-43.
4. SMART, RICHARD; ROBINSON, MIKE. 1991. **Sunlight into wine.** National Library of Australia Cataloguing-in-Publication. 1-875130-10-1
5. VILLARROYA, AGUSTÍ; SERRA, LLUIS; GELI, ROSA; TORRENTÀ, EVA; VILAVELLA, MARGARITA; BARTRA, ENRIC; CAMPAMÀ, CONCEPCIÓ; ESPELT, ANNA; PEREZ, ESTHER. 2009 **Assaig d'aplicació controlada d'aigua a la garnatxa negra en les condicions de la DO Empordà.** Dossier tècnic num.39 Ruralcat. Pág. 26-39.
7. VILLARROYA, AGUSTÍ; SERRA, LLUIS; ELORDUY, XOAN; RICO, SANDRA; ALTISENT, ENRIC. 2012. **Incidència sobre la producció i la qualitat de l'aplicació controlada d'aigua a la varietat Syrah a Belianes - DO Costers del Segre** – Artículo no publicado

6. Agradecimientos

Agradecemos a los viticultores Flavià Serret i Anna Escribà por participar en el estudio y ceder sus viñedos para aplicar las dosis de riego indicadas por INCAVI y dejar parte en secano. A la DO Costers del Segre y al DACC por patrocinar como actividad continuada el estudio.

Identificación del origen molecular de variantes clonales mejoradas de Tempranillo mediante un estudio de genómica comparativa

Pablo Carbonell-Bejerano¹, Noelia Alañón-Sánchez¹, Carolina Royo¹, Yolanda Ferradás¹, Detlef Weigel², José Miguel Martínez-Zapater¹, Javier Ibáñez¹

¹ *Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-Gobierno de La Rioja-UR), Finca La Grajera, Carretera de Burgos km 6, 26007 Logroño, España*

² *Max-Planck-Institute for Biology, Max-Planck-Ring 5, 72076 Tübingen, Alemania
941 89 49 80. pablo.carbonell@icvv.es*

Resumen

La selección clonal para la mejora intra-varietal en la vid se basa en variación somática que aparece como consecuencia de mutaciones espontáneas en el genoma de las células meristemáticas durante el crecimiento y la multiplicación vegetativa de las variedades. En este trabajo realizamos estudios de genómica comparativa para identificar el origen de caracteres de interés agro-enológico seleccionados en variantes clonales de Tempranillo. Como base, desarrollamos un ensamblaje de genoma de referencia que representa las copias que Tempranillo heredó de sus parentales Benedicto y Albillo Mayor para cada cromosoma. Alineando lecturas de secuenciación de los genomas de 10 variantes clonales con el genoma de referencia de Tempranillo identificamos (i) sustituciones de un solo nucleótido (SNV) asociadas con ciclo de maduración más largo, (ii) una gran delección que elimina un gen de acumulación de pruina en una variante con mayor extractabilidad de polifenoles durante la vinificación, y, en dos variantes con menor compacidad del racimo, (iii) translocaciones entre cromosomas o (iv) cambios epigenéticos en la metilación del ADN. La identificación de la variación genómica responsable ha permitido el desarrollo de marcadores moleculares para la trazabilidad de las mejoras seleccionadas, y en algunos casos también revela posibles consecuencias agronómicas adicionales.

1. Introducción

Desde que se domesticó la vid se ha generado una gran diversidad varietal que se cifra en >13.000 genotipos varietales distintos de vid disponibles actualmente (Maul, 2023). Sin embargo, la diversidad varietal en uso en España es muchísimo menor considerando que tan solo 6 variedades (Tempranillo Tinto, Airén, Garnacha, Viura, Bobal y Monastrell) ocupan el 65% del viñedo de vinificación nacional (Ministerio de Agricultura, 2022). El pequeño número de variedades en el que se basa la producción vitivinícola se relaciona con el clasicismo del sector del vino en el que tanto productores como consumidores prefieren variedades de élite tradicionales que confieren reconocimiento a las regiones en las que llevan cultivándose incluso durante siglos. Entre las variedades españolas, Tempranillo Tinto, que se emplea para la elaboración de vinos tintos de calidad, es la variedad con mayor superficie de cultivo actualmente con > 202.000 ha, destacando en regiones como Castilla - La Mancha (70.519 ha), Castilla y León (40.225 ha), La Rioja (36.296 ha), Extremadura (18.839 ha) o País Vasco (12.132 ha) (Ministerio de Agricultura, 2022). Sin embargo, el calentamiento de gran parte de estas regiones puede llegar a hacer que



sean más calurosas que las condiciones requeridas para la producción óptima en Tempranillo (Ramos et al., 2018; Jones et al., 2012), por lo que es deseable evolucionar la variedad para mejorar su adaptación a las condiciones cambiantes y lograr su sostenibilidad futura en estas regiones.

Una oportunidad para evolucionar las variedades de vid de élite en ausencia de transformación genética (lo que todavía no está aceptado en el mercado), es la variación somática que emerge ocasionalmente debido a la acumulación espontánea de mutaciones somáticas durante la multiplicación vegetativa de las variedades (Ibáñez et al., 2015; Carbonell-Bejerano et al., 2019). Esta variación somática ha sido explotada tradicionalmente por los viticultores para mejorar las variedades y es la base de la selección clonal que puede permitir la adaptación de una variedad a nuevas condiciones de cultivo, nuevas condiciones climáticas o nuevas demandas del mercado. Las variedades de vid se reproducen vegetativamente para acortar los ciclos de propagación y porque, dada su alta heterocigosidad (la variación que hay entre los dos de cromosomas homólogos que la variedad hereda de cada uno de sus dos parentales), la reproducción sexual da lugar a segregaciones genómicas que no permiten mantener los atributos varietales incluso cuando se realizan autofecundaciones. De este modo, las variedades tradicionales han sido propagadas vegetativamente durante periodos largos desde que germinó la semilla ancestral, lo que en ocasiones puede haber ocurrido hace varios siglos (Ibáñez et al., 2015; Carbonell-Bejerano et al., 2019). Aunque normalmente no hay registros históricos sobre el origen de las variedades de vid antiguas, en algunos casos el análisis genético ha permitido conocer su pedigrí. Este es el caso de Tempranillo Tinto para la que análisis genéticos recientes han mostrado que procede de un cruzamiento entre las variedades Benedicto y Albillo Mayor (Ibáñez et al., 2012). A partir de la semilla generada tras este cruzamiento, Tempranillo Tinto se ha propagado vegetativamente a lo largo del tiempo y de la extensa superficie de viñedos en la que se cultiva actualmente. Estos procesos prolongados de propagación de las variedades permiten la acumulación de un número reducido de mutaciones somáticas que dan lugar a distintos linajes clonales de la misma variedad (Calderon et al. 2021). En ocasiones, alguna de estas mutaciones puede producir caracteres nuevos de interés, siendo ésta la fuente de variación que sirve de base para la mejora mediante selección clonal (Ibáñez et al., 2015; Carbonell-Bejerano et al. 2019). De este modo, la selección clonal puede perseguir la identificación de variantes que permitan incrementar la calidad de la producción y adaptarla a condiciones cambiantes como las que derivan del cambio climático o de nuevas demandas de la sociedad.

La selección clonal permite la evolución y mejora de las variedades tradicionales locales, manteniendo a su vez los atributos varietales de calidad que otorgan tipicidad. Sin embargo, dado su carácter clonal, se requiere identificar las mutaciones somáticas responsables de los caracteres variantes seleccionados para poder desarrollar marcadores moleculares que garanticen la trazabilidad de las variantes clonales mejoradas. En este trabajo realizamos análisis de secuenciación de los genomas completos de variantes clonales de Tempranillo Tinto seleccionadas previamente por mostrar diferentes características de interés: ciclo de maduración más largo con potencial de adaptación a condiciones de cambio climático (Arrizabalaga et al., 2018), mayor extractabilidad de polifenoles durante la vinificación (Royo et al., 2021), o menor compacidad de racimo (Grimplet et al., 2019). Para facilitar la identificación de las mutaciones responsables de estas mejoras, nos propusimos producir un ensamblaje *de novo* del genoma de Tempranillo Tinto. Usando este ensamblaje como referencia sobre la que comparar el genoma de las variantes clonales de Tempranillo Tinto, conseguimos identificar mutaciones y variaciones genómicas de distinto tipo asociadas a los caracteres innovadores seleccionados.



2. Material y Métodos

Ensamblaje de genoma de referencia de Tempranillo Tinto

Se obtuvo ADN de alto peso molecular a partir de hojas jóvenes de una planta del clon de Tempranillo Tinto RJ-51 cultivada en el banco de germoplasma de la Finca Valdegón del Gobierno de La Rioja (Agoncillo, España). Este ADN se obtuvo tras el aislamiento de núcleos de células de hoja que fueron procesados con el kit 'Nanobind Plant Nuclei Big DNA Kit' (Circulomics). El ADN se secuenció con las tecnologías de lecturas largas de PacBio CLR y de Oxford Nanopore Technologies (ONT) en el Max Planck Institute for Biology (Tübingen, Alemania). Para el ensamblaje de genoma se siguió la estrategia de 'Canu trio binning' (Koren et al. 2018), usando información del pedigrí de Tempranillo (Ibáñez et al., 2012). Las copias genómicas ensambladas se compararon usando la herramienta bioinformática SyRI (Goel et al. 2019).

Secuenciación de genoma de variantes clonales de Tempranillo Tinto

Se obtuvo ADN a partir de hojas jóvenes de 10 variantes clonales de Tempranillo. Estas variantes corresponden a accesiones del banco de clones del ICVV del Gobierno de La Rioja localizado en la "Finca Valdegón" (Logroño, España), y de los bancos de germoplasma de Viveros Provedo (Logroño, España) y Vitis Navarra (Vergalijo, España). Para la extracción de ADN se empleó el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) a partir de polvo de hoja congelado. El genoma de las 10 variantes clonales de Tempranillo Tinto se re-secuenció con la tecnología de lecturas cortas de Illumina en el Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona). Se emplearon lecturas de 125 nucleótidos empajadas en los extremos de los fragmentos de la librería.

Búsqueda de variación genómica responsable en variantes clonales de Tempranillo Tinto

Búsqueda de mutaciones puntuales: Las lecturas de ADN de Illumina se cribaron para eliminar adaptadores y secuencias de baja calidad mediante la aplicación Cutadapt2. Para el alineamiento de las lecturas cribadas sobre el ensamblaje de genoma de Tempranillo Tinto se empleó la herramienta bioinformática bwa mem. Para la identificación de mutaciones somáticas, tanto variaciones puntuales de sustituciones de nucleótido (SNV) como pequeñas inserciones y deleciones (InDels), se aplicaron búsquedas de estas variantes sobre los alineamientos de las lecturas mediante las herramientas GATK y Octopus, cuyos resultados se filtraron aplicando samtools mpileup, vcftools, awk y otras herramientas de filtrado para llegar al conjunto final de variantes de gran fiabilidad. Se tomó como resultado final la intersección de las variantes identificadas tanto con Octopus como con GATK tras aplicar los filtros. Finalmente, se buscaron variantes específicas de cada una de las 10 accesiones como las mutaciones candidatas a determinar los caracteres agronómicos específicos seleccionados en cada accesión.

Búsqueda de reorganizaciones genómicas: Los mismos alineamientos de las lecturas de ADN de Illumina de las 10 accesiones de Tempranillo sobre el ensamblaje de genoma de Tempranillo se analizaron mediante la herramienta Delly-SV para detectar reorganizaciones de genoma. Mediante Delly-SV se buscaron alineamientos discordantes de las lecturas de ADN que fuesen indicativas de inversiones, duplicaciones, translocaciones y deleciones de gran escala y específicas de cada accesión.

Búsqueda de variación epigenómica: Sobre una de las variantes clonales de baja compacidad de racimo para la que no se detectaron mutaciones puntuales ni reorganizaciones genómicas asociadas, se realizó un análisis de variación epigenómica en la metilación del ADN.



Se empleó la tecnología ONT para secuenciar ADN de hoja, tanto de la variante somática como del clon control RJ-51 y de individuos resultantes de la autofecundación de los mismos, en el Max Planck Institute for Biology (Tübingen, Alemania). Las lecturas de ADN de ONT se alinearon frente al ensamblaje de genoma de Tempranillo Tinto mediante la aplicación minimap2 y se utilizaron las aplicaciones Guppy y Megalodon para analizar la presencia/ausencia de metilación en residuos de nucleótidos de citosina y buscando regiones genómicas con frecuencia de metilación diferencial entre la variante somática y el control.

Análisis de expresión génica: En el caso de la variante clonal de baja compacidad de racimo descrita en el apartado anterior también se realizó un análisis de expresión génica global mediante RNA-seq. Para ello se extrajo ARN utilizando el kit Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma) sobre muestras de inflorescencia de la variante somática y del clon control. A partir del ARN se prepararon librerías de cDNA que se secuenciaron con la tecnología de lecturas cortas de Illumina en el Centro de Regulación Genómica (CRG, Barcelona). Se emplearon lecturas de 125 nucleótidos emparejadas en los extremos de los fragmentos de la librería. Para el análisis del RNA-seq las lecturas cortas se alinearon con el ensamblaje de genoma de Tempranillo mediante la aplicación HiSat2 y se realizó un análisis de expresión génica diferencial empleando la herramienta DESeq2 sobre los 35.000 genes anotados en el ensamblaje de genoma de Tempranillo Tinto.

3. Resultados

Se obtuvo un ensamblaje de genoma del clon RJ-51 de Tempranillo Tinto en el que se pudieron reconstruir para cada uno de los 19 cromosomas tanto la copia heredada de Benedicto como la heredada de Albillo Mayor. La variación entre las dos copias genómicas ensambladas es del 2% en cuanto a variantes de pequeño tamaño (SNV e InDel) y >12% en cuanto a reorganizaciones genómicas estructurales. Estos resultados muestran que la variación entre las dos copias genómicas presentes en una variedad de vid está en torno al 15% del tamaño del genoma, lo que corrobora su alta heterocigosidad. Estos resultados apuntan a la necesidad de ensamblajes específicos de cada variedad y en los que se resuelvan los dos haplotipos (o copias genómicas) para poder representar la totalidad de la diversidad de sus genomas.

El análisis genómico de la variante clonal de Tempranillo Tinto con baya más oscura y mayor extractabilidad de antocianinas y polifenoles a lo largo de la vinificación (Royo et al., 2021), identificó una deleción de gran tamaño (>10.6 Mb) que afecta a la mitad de la copia del cromosoma 11 que Tempranillo heredó de Albillo Mayor (Fig. 1). Comparando los datos de secuenciación genómica de la variante con el ensamblaje de genoma de Tempranillo se halló que esta deleción desenmascara una copia no funcional de un gen de acumulación de ceras en la cutícula, de modo que tras la deleción solo queda la copia no funcional del gen en la variante clonal, lo que podría ser la causa directa de su color de baya más intenso.

En una de las dos variantes de baja compacidad de racimo se detectó una reestructuración de genoma que implica una translocación entre los cromosomas 1 y 3 (Fig. 2). El análisis de una progenie de autofecundación de la variante clonal indica que esta translocación co-segrega con una reducción en la viabilidad del polen. Estos resultados indican que esta translocación disminuye la viabilidad de los gametos, lo que reduce la tasa de cuajado de frutos dando lugar al carácter de baja compacidad en esta variante clonal.



En dos variantes clonales de ciclo de maduración más largo de lo normal no se identificaron reorganizaciones de genoma. Sin embargo, la secuenciación genómica confirmó la presencia de mutaciones puntuales de tipo SNV que causan cambios de aminoácido que pueden alterar la función de las proteínas codificadas por los genes afectados por los SNV. En concreto, mutaciones SNV en un gen de un transportador transmembrana de iones y en otro codificante de una enzima del sistema de ubiquitinación, podrían ser responsables de la variación en la maduración en cada una de las dos accesiones de Tempranillo Tinto de ciclo largo analizadas, respectivamente.

En una segunda variante clonal de baja compacidad de racimo no se detectó ninguna mutación puntual ni reorganizaciones de genoma ligadas al carácter variante. Ante la ausencia de variación genómica responsable se realizó un análisis de variación epigenética en la metilación del ADN. El análisis identificó una región cromosómica con hiper-metilación de citosinas en la variante somática en comparación con un clon de Tempranillo Tinto de compacidad de racimo normal. El análisis de metilación usando el ensamblaje de genoma de Tempranillo Tinto como referencia indica que la hiper-metilación en la variante de baja compacidad se da concretamente en la copia del cromosoma afectado que Tempranillo Tinto heredó del parental Albillo Mayor. Se confirmó que la hiper-metilación supone un epi-alelo estable, ya que también se detecta en un individuo resultante de la autofecundación de la variante clonal que hereda la copia procedente de Albillo Mayor de esa región cromosómica y sigue ausente en esa región tras la auto-fecundación del clon con compacidad de racimo normal (Fig. 3). Además, un análisis de expresión génica mediante RNA-seq mostró que la región genómica hiper-metilada precede a un gen que está sobre-expresado en inflorescencias de la variante somática de baja compacidad de racimo respecto a un clon de Tempranillo Tinto con compacidad normal (Fig. 3). Las diferencias de expresión de este gen también son consistentes en individuos de auto-fecundación de estas accesiones de Tempranillo Tinto y se asocian con el desarrollo anormal de la flor que presenta esta variante de baja compacidad. Estos resultados indican que la hiper-metilación de esta región del genoma es la causa de la sobre-expresión de este gen y del carácter de baja compacidad de racimo en esta variante clonal.

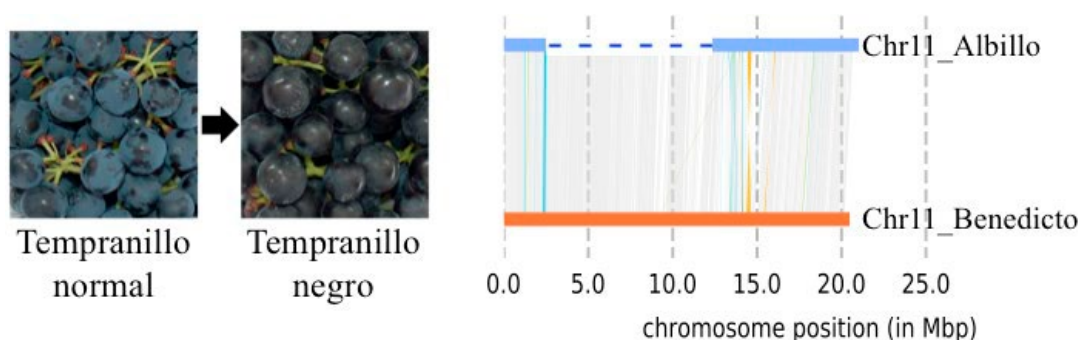


Fig. 1. Aspecto de la variante clonal de Tempranillo de uva oscura (a la izquierda) y la delección asociada a su origen (a la derecha).

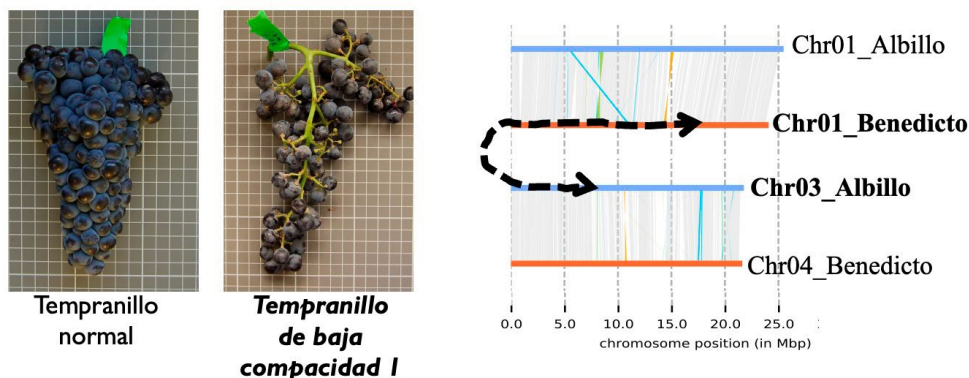


Fig. 2. Aspecto de la variante clonal de Tempranillo de baja compacidad de racimo 1 (a la izquierda) y la translocación asociada a su origen (a la derecha).

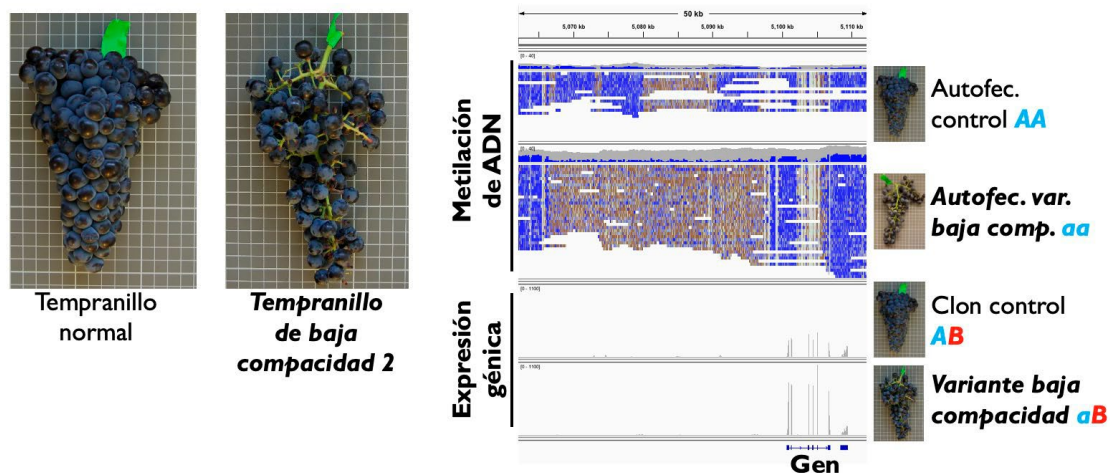


Fig. 3. Aspecto de la variante clonal de Tempranillo de baja compacidad de racimo 2 (a la izquierda) y diferencia de regiones de ADN metiladas (en marrón) frente a no metiladas (en azul) asociadas a la sobre-expresión del gen contiguo.

4. Conclusiones

El conocimiento del pedigrí de Tempranillo Tinto ha permitido ensamblar el genoma de la variedad con una representación completa y por separado de las copias genómicas heredadas de cada uno de los dos parentales para los 19 cromosomas del genoma.

El ensamblaje de genoma de Tempranillo Tinto ha permitido determinar que hasta un 15% del genoma de la variedad muestra variación entre las copias homólogas heredadas de cada parental y ha servido como referencia para encontrar variación genómica y epigenómica específica de variantes clonales de la variedad.

Variaciones de diverso tipo, desde cambios de secuencia puntuales, pasando por reestructuraciones de genoma que incluyen la pérdida de más de medio cromosoma o recombinaciones entre dos cromosomas, hasta cambios epigenéticos que no afectan a la



secuencia de ADN sino a modificaciones en su metilación, subyacen al origen de variación clonal útil para la mejora intra-varietal.

La identificación de la variación genómica responsable de caracteres mejorados seleccionados en variantes clonales permite desarrollar marcadores moleculares para la trazabilidad de las mejoras y entender cómo manejar posibles efectos secundarios asociados a las mejoras seleccionadas.

5. Bibliografía

1. MAUL, E. et al. 2023. **Vitis International Variety Catalogue**. 2023. www.vivc.de.
2. OIV. 2017. **Distribution of the world's grapevine varieties**. **Focus OIV 2017**. ISBN: 979-10-91799-89-8.
2. MINISTERIO DE AGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACIÓN. 2022. **Aplicación del régimen de autorizaciones de nuevas plantaciones de viñedo 2021 y potencial de producción vitícola en España**.
3. RAMOS, M.C.; JONES, G.V.; YUSTE J. 2018. **Phenology of Tempranillo and Cabernet-Sauvignon varieties cultivated in the Ribera del Duero DO: observed variability and predictions under climate change scenarios**. *OENO One* 52 2119.
4. JONES, G.V.; REID, R.; VILKS, A. 2012. **Climate, Grapes and Wine: structure and suitability in a variable and changing climate**. In: *The Geography of Wine*. Springer, Dordrecht. ISBN: 978-94-007-0464-0.
5. IBÁÑEZ, J.; CARREÑO, J.; YUSTE, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2015. **Grapevine breeding and clonal selection programmes in Spain**. In: *Grapevine breeding programs for the wine industry*. Oxford, Woodhead Publishing. ISBN: 978-1-78242-075-0.
6. CARBONELL-BEJERANO, P.; ROYO, C.; MAURI, N.; IBÁÑEZ, J.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2019. **Somatic variation and cultivar innovation in grapevine**. In: *Advances in grape and wine biotechnology*. IntechOpen. ISBN: 978-1-78984-613-3.
7. IBÁÑEZ, J.; MUÑOZ-ORGANERO, G.; ZINELABIDINE, L.H.; DE ANDRÉS, M.T.; CABELLO, F.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2012. **Genetic origin of the grapevine cultivar Tempranillo**. *American Journal of Enology and Viticulture* 63:4 549-553.
8. CALDERON, L.; MAURI, N.; MUNOZ, C.; CARBONELL-BEJERANO, P.; BREE, L.; BERGAMIN, D.; SOLA, C.; GOMEZ-TALQUENCA, S.; ROYO, C.; IBANEZ, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; LIJAVETZKY, D. 2021. **Whole genome resequencing and custom genotyping unveil clonal lineages in 'Malbec' grapevines (*Vitis vinifera* L.)**. *Sci Rep* 11 7775.
9. ARRIZABALAGA, M.; MORALES, F.; OYARZUN, M.; DELROT, S.; GOMÈS, E.; IRIGOYEN, J.J.; HILBERT, G.; PASCUAL, I. 2018. **Tempranillo clones differ in the response of berry sugar and anthocyanin accumulation to elevated temperature**. *Plant Sci* 267 74-83.
10. ROYO, C.; FERRADÁS, Y.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; MOTILVA, M.J. 2021. **Characterization of Tempranillo negro (VN21), a high phenolic content grapevine Tempranillo clone, through UHPLC-QqQ-MS/MS polyphenol profiling**. *Food Chem* 360 130049.
11. GRIMPLET J.; IBÁÑEZ S.; BAROJA E.; TELLO J.; IBÁÑEZ J. 2019. **Phenotypic, Hormonal, and Genomic Variation Among *Vitis vinifera* Clones With Different Cluster Compactness and Reproductive Performance**. *Front Plant Sci* 9 1917.



12. GOEL, M.; SUN, H.; JIAO, W. B.; AND SCHNEEBERGER, K. 2019. **SyRI: finding genomic rearrangements and local sequence differences from whole-genome assemblies.** Genome Biol 20 277.
12. KOREN, S.; RHIE, A.; WALENZ, B. P.; DILTHEY, A. T.; BICKHART, D. M.; KINGAN, S.B.; HIENDLEDER, S.; WILLIAMS, J.L.; SMITH, T.P.L.; PHILLIPPY, A.M. 2018. **De novo assembly of haplotype-resolved genomes with trio binning.** Nat Biotechnol 36 1174-1182.

6. Agradecimientos

Agradecemos a Elisa Baroja y Enrique García-Escudero (ICVV, Gobierno de la Rioja), Javier Eraso y Rafael García (Vitis Navarra) y a Ignacio Provedo (Viveros Provedo) por hacer disponible y colaborar en la caracterización de los materiales vegetales estudiados. Agradecemos a Ilya Bezrukov y Christa Lanz (Max Planck Institute) y a Miguel Angulo y Silvia Hernáiz (ICVV) por su asistencia. Esta investigación ha sido financiada con fondos EU de la Marie Skłodowska-Curie Individual Fellowship (SomaGrapeGenome, 79460) y de los proyectos del Ministerio de Economía (SOMAVID, BIO2014-59324) y del Ministerio de Ciencia e Innovación (DIGEVIDA, PID2020-120183RB-I00), así como con fondos de la 'Max Planck Society'.

Implicaciones del uso de herbicidas, laboreo o cubiertas vegetales bajo las cepas sobre la microbiota del suelo

Maidier Velaz¹, Gonzaga Santesteban^{1,2}, Paula Resano-Goizueta¹, Maite Loidi¹, Nazareth Torres^{1,2,*}

¹Dpto. de Agronomía, Biotecnología y Bromatología, Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadia, 31006 Pamplona, Navarra, España

²Instituto de Investigación Multidisciplinar en Biología Aplicada (IMAB-UPNA), Universidad Pública de Navarra, Campus Arrosadia 31006 Pamplona, España

Resumen

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del uso de cubiertas vegetales como alternativa a los herbicidas y al laboreo para el control de la vegetación adventicia, y sus implicaciones en la fisiología de las cepas y en la biodiversidad microbiana del suelo. El ensayo se llevó a cabo en macetas y se aplicaron 4 tratamientos: cubierta de *Trifolium fragiferum*, cubierta de *Bromus repens*, herbicida y laboreo (control) y se estudiaron sus efectos sobre el crecimiento de las cepas, el estado hídrico y las comunidades microbianas del suelo. Se encontró que la cubierta vegetal de la especie *T. fragiferum* obtuvo la mayor biomasa y tuvo un impacto positivo en la calidad biológica del suelo, sin afectar significativamente al crecimiento de las cepas en comparación con los otros tratamientos. El uso de cubiertas vegetales podría reducir la dependencia de los herbicidas y mejorar la sostenibilidad del cultivo de la vid con la mejora de la calidad del suelo, lo que podría mejorar el rendimiento a largo plazo.

1. Introducción

El manejo del suelo mediante cubiertas vegetales en las líneas de los viñedos es una práctica común en la viticultura, ya que mejora las características del suelo (Adad et al., 2021). Según estos autores, las cubiertas vegetales pueden influir en el ciclo de nutrientes, promover la infiltración, disminuir la erosión y mejorar la biodiversidad de la microbiota del suelo mejorando el estado fisiológico de las cepas. Sin embargo, el área de debajo de las cepas tiende a quedar desnuda mediante la aplicación de herbicidas o la realización del laboreo para evitar la competencia de las plantas adventicias con el cultivo en climas cálidos. El uso de cubiertas vegetales debajo de las cepas podría ser una alternativa plausible al uso de herbicidas o al laboreo, mejorando la calidad de la vid y las características del suelo (Abad et al., 2020; Nogales et al., 2021) y aumentando la materia orgánica del suelo y su biodiversidad (Kim et al., 2020; Vukicevich et al., 2016). Además, una investigación reciente ha demostrado que la introducción de un hongo micorrízico arbuscular (AMF) a través de cubiertas vegetales de centeno bajo las cepas fue un método eficiente para inocular cepas adultas mediante la promoción del establecimiento de comunidades micorrízicas de raíz de vid que fueron capaces de aumentar la adaptabilidad de las plantas a los eventos climáticos extremos (Nogales et al., 2021).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue estudiar las implicaciones de diferentes manejos del suelo bajo las cepas (herbicida, laboreo o cubiertas vegetales) sobre el crecimiento de las cepas, su estado hídrico y sobre las comunidades microbianas del suelo.



2. Material y Métodos

Material vegetal y condiciones de cultivo.

El experimento se realizó en las instalaciones experimentales de la Universidad Pública de Navarra (UPNA, Pamplona, Navarra, España) en 2022. Se utilizaron plantas de 2 años de edad de la variedad Tempranillo injertado sobre el portainjerto 110 Richter en macetas de 35 L llenas de turba crecidas en invernadero abierto. Las plantas se regaron por goteo para reemplazar el agua perdida por la evapotranspiración. El diseño experimental consistió en 4 tratamientos aplicados sobre cepas de Tempranillo en maceta con 10 repeticiones cada uno. Los tratamientos consistieron en dos especies de cubiertas vegetales (*Trifolium fragiferum* y *Bromus repens*), un herbicida (glifosato al 36%) y un control sin tratar.

Medidas de la planta.

La biomasa total de las cubiertas se pesó y secó para estimar el contenido de agua. Al final del periodo de crecimiento, se contaron las hojas y se midió la longitud total de los pámpanos. El área transversal total se estimó después de medir las áreas de los pámpanos con un calibre digital (CD67-S15PP, Mitutoyo Corp., Japón). El estado del agua se monitoreó midiendo el potencial hídrico del tallo (Ψ S) de una hoja completamente expuesta al sol y sin signos de enfermedad y/o daño por tratamiento-réplica. Para ello, las hojas se cubrieron antes de las mediciones con una bolsa de plástico con cremallera forrada con papel de aluminio reflectante para suprimir la transpiración. El Ψ S se midió con una cámara de presión Scholander (P3000, Soil Moisture Corp., Santa Barbara, CA, EE. UU.). Se recolectaron tres plantas por tratamiento y se midió tanto la masa fresca como la masa seca de los diferentes órganos (raíces y pámpanos). El contenido de agua se estimó como la relación entre las masas frescas y secas. Se recolectaron muestras de raíces y se tiñeron para determinar la colonización micorrícica según Torres et al. (2016). La diversidad microbiana del suelo y los perfiles fisiológicos se midieron utilizando las placas Biolog EcoplatesTM a partir de muestras de suelo recolectadas a 25 cm de profundidad.

Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con R studio versión 3.6.1 (RStudio Team, 2020). Los parámetros de crecimiento de la cepa, estado del agua y diversidad bacteriana se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) después de evaluar la normalidad de los datos. Se calcularon las medias \pm errores estándar (SE) y, cuando la relación F fue significativa ($P \leq 0,05$), se ejecutó una prueba posthoc de Duncan utilizando el paquete "agricolae" 1,2-8 R (de Mendiburu, 2016).

3. Resultados

3.1. La biomasa de la cubierta vegetal y el contenido de agua difirieron entre las especies estudiadas.

Las cubiertas vegetales utilizadas en este experimento difirieron mucho en su crecimiento, siendo el crecimiento de *T. fragiferum* cuatro veces mayor que el de *B. repens* y cien veces mayor respecto al control. Además, el uso de cubiertas promovió una mayor retención de agua en el



sistema (Tabla 1). Este resultado podría aumentar el balance neto de carbono del ecosistema (NECB), que estima las entradas y salidas de C en entornos de producción comercial a escala de viñedo. Nuestros resultados sugieren que el uso de *T. fragiferum* como cubierta vegetal podría estar relacionado con un mayor almacenamiento de C en el sistema dado que las cubiertas vegetales que producen una mayor biomasa aumentan el NECB (Zumkeller et al., 2022).

Tabla 1. Peso fresco y seco y contenido de agua de las cubiertas vegetales en el experimento en maceta de Tempranillo.

	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Contenido de agua
Control	9.686 ± 2.299 c	2,886 ± 0,570 c	0,678 ± 0,278 b
<i>B. repens</i>	244.625 ± 20.444 b	23.696 ± 2.487 b	0,899 ± 0,136 a
<i>T. fragiferum</i>	811.350 ± 41.365 a	118.031 ± 4.645 a	0,854 ± 0,003 a
ANOVA	*	*	*

Los valores son medias ± EE. Dentro de cada columna, diferentes letras representan una diferencia significativa según la prueba posthoc de Duncan.

3.2. Las cubiertas vegetales no tuvieron efecto sobre el crecimiento vegetativo de las cepas en maceta.

La Fig.1. muestra el crecimiento vegetativo de cepas cultivadas en macetas donde no se observó ningún efecto a causa del manejo del suelo. Investigadores anteriores han demostrado que el crecimiento vegetativo de la vid se ve afectado por las cubiertas vegetales en comparación con el laboreo convencional (Steenwerth et al., 2013; Wolff et al., 2018). Sin embargo, de acuerdo con estudios recientes, las cubiertas vegetales podrían no tener un efecto sobre ella (Abad et al., 2020; Zumkeller et al., 2022). El estado hídrico de las cepas no se vio afectado por diferentes manejos del suelo (datos no mostrados). En este sentido, varios estudios han señalado que tampoco observaron ningún efecto en el estado hídrico de las cepas a causa de las cubiertas vegetales dado que estos efectos son impulsados en gran medida por las condiciones climáticas y el régimen de riego de un lugar determinado (revisado por Zumkeller et al., 2023).



Fig. 1. Crecimiento vegetativo (número de hojas, longitud de pámpanos y área transversal de pámpanos) de cepas de Tempranillo/110R cultivadas en macetas con cubiertas vegetales (*Trifolium fragiferum* y *Bromus repens*), herbicida o sin tratar (control) en 2022.



3.3. El manejo del suelo con cubiertas vegetales afectó a los microorganismos asociados a las raíces de la vid y la rizosfera.

En nuestras condiciones experimentales, el manejo del suelo con cubiertas vegetales tendió a aumentar la colonización de micorrizas en comparación con el uso de herbicidas (Figura 2A). De igual forma, estudios previos demostraron que el establecimiento de cubiertas vegetales promueve la proliferación de comunidades naturales de micorrizas (Brígido et al., 2017; Soti et al., 2016; Nogales et al., 2021).

Por otro lado, el análisis de la diversidad de bacterias heterótrofas mostró que el uso de *T. fragiferum* como cubierta vegetal resultó en un mayor número de sustratos utilizados por las bacterias del suelo y mayores índices de Shannon y Simpson (Figura 2B). Del mismo modo, Likar et al. (2017) demostraron que la diversidad microbiana del suelo varió considerablemente entre viñedos bajo manejo convencional y ecológico, con comunidades bacterianas fuertemente afectadas por el laboreo.

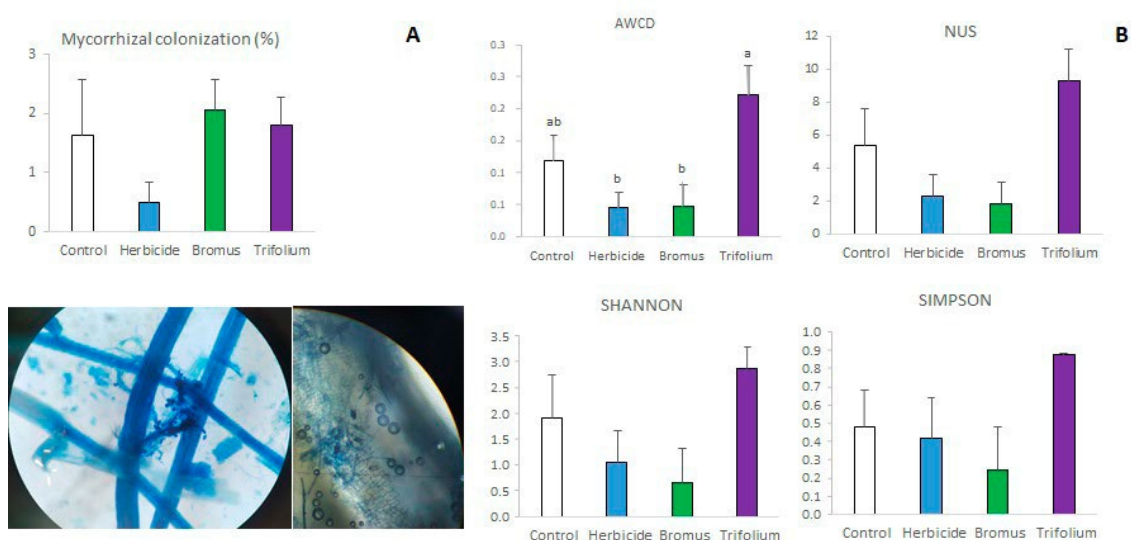


Fig. 2. (A) Colonización micorrícica (%), y (B) parámetros bacterianos heterótrofos obtenidos con Biologs EcoplatesTM de las cepas Tempranillo/110R cultivadas en macetas con cubierta vegetal (*Trifolium fragiferum* y *Bromus repens*), herbicida o sin tratar (control) en 2022.

4. Conclusiones

Aunque la investigación actual presenta datos de un experimento de un solo año, los datos son prometedores y el uso de cubiertas vegetales como herramienta para manejar el suelo bajo las cepas parece tener beneficios en comparación con el manejo convencional del suelo con herbicidas y/ o laboreo.



5. Bibliografía

1. ABAD, F.J; HERMOSO DE MENDOZA, I; MARÍN, D; ORCARAY, L; SANTESTEBAN, L.G. 2021. **Cover crops in viticulture. A systematic review (1): Implications on soil characteristics and biodiversity in vineyard.** OENO One 55, 295-312.
2. ABAD, F.J; MARÍN, D; SANTESTEBAN, L.G; CIBRIAIN, F.J; SAGÜÉS, A. 2020. **Under-vine cover crops: impact on weed development, yield and grape composition.** OENO One 54, 881-889.
3. BRÍGIDO, C; VAN TUINEN, D; BRITO, I; ALHO, L; GOSS, M.J; CARVALHO, M. 2017. **Management of the biological diversity of AM fungi by combination of host plant succession and integrity of extraradical mycelium.** Soil Biol. Biochem. 112, 237–247. doi: 10.1016/j.soilbio.2017.05.018.
4. DE MENDIBURU, M.F. 2016. **Package ‘agricolae.’ Statistical Procedures for Agricultural Research.** Version 1.3–0.
5. KIM, N; ZABALOY, M.C; GUAN, K; VILLAMIL, M.B. 2020. **Do cover crops benefit soil microbiome? A meta-analysis of current research.** Soil Biol. Biochem. 142, 107701. doi: 10.1016/j.soilbio.2019.107701.
6. NOGALES, A; ROTTIER, E; CAMPOS, C; VICTORINO, G; COSTA, J.M; COITO, J.L; PEREIRA, H.S; VIEGAS, W; LOPES, C. 2021. **The effects of field inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi through rye donor plants on grapevine performance and soil properties.** Agric. Ecosyst. Environ. 313, 107369.
7. SOTI, P.G., RUGG, S., RACELIS, A., 2016. **Potential of cover crops in promoting mycorrhizal diversity and soil quality in organic farms.** J. Agric. Sci. 8, 42. DOI: 10.5539/jas.v8n8p42.
8. STEENWERTH, K. L., MCELRONE, A. J., CALDERÓN-ORELLANA, A., HANIFIN, R. C., STORM, C., COLLATZ, W., MANUCK, C. 2013. **Cover crops and tillage in a mature Merlot vineyard show few effects on grapevines.** Am. J. Enol. Vitic. 64, 515–521.
9. TORRES, N., GOICOECHEA, N., MORALES, F., ANTOLÍN, M. C., 2016. **Berry quality and antioxidant properties in Vitis vinifera cv. Tempranillo as affected by clonal variability, mycorrhizal inoculation and temperature.** Crop. Past. Sci. 67, 961-977.
10. VUKICEVICH, E.; LOWERY, T.; BOWEN, P.; ÚRBEZ-TORRES, J.R.; HART, M. 2016. **Cover crops to increase soil microbial diversity and mitigate decline in perennial agriculture.** A review. Agron. Sustain. Dev., 363, 48.
11. WOLFF, M. W., ALSINA, M. M., STOCKERT, C. M., KHALSA, S. D. S., SMART, D. R. 2018. **Minimum tillage of a cover crop lowers net GWP and sequesters soil carbon in a California vineyard.** Soil and Tillage Research, 175, 244–254.



12. ZUMKELLER., M., YU, R., TORRES, N., MARIGLIANO, L.E., ZACCARIA, D., KURTURAL, S.K. 2022. **Site characteristics determine the effectiveness of tillage and cover crops on the net ecosystem carbon balance in California vineyard agroecosystems.** Front. Plant Sci. 13:1024606.
13. ZUMKELLER., M., TORRES, N., YU, R., MARIGLIANO, L.E., TANNER, J.D., ZACCARIA, D., KURTURAL, S.K. 2023. **Cover Crops and No-Tillage Show Negligible Effects on Grapevine Physiology in two different California Vineyard Agroecosystems.** Oeno One. In press.

6. Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el proyecto colaborativo regional “Ayudas a Agentes del SINAI para la realización de proyectos de I+D colaborativos” financiado por el Gobierno de Navarra (proyecto PC044-045_CUALVID). N. Torres es beneficiaria de una Beca Ramón y Cajal RYC2021-034586-I financiada por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033 y por “European Union NextGenerationEU/PRTR”.

Influencia de las cubiertas vegetales en producción y calidad de la uva en diferentes sistemas productivos del centro de la Península Ibérica

Andrés García-Díaz, Ramón Bienes Allas, Blanca Sastre Rodríguez, Gregorio Muñoz Organero y Eva Raboso Campos

Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín, Carretera A2 km 38, Alcalá de Henares. andres.garcia.diaz@madrid.org

Resumen

El uso de cubiertas vegetales en viñedo ha sido objeto de estudio en los últimos años debido a que aumentan la materia orgánica del suelo, mejorando su capacidad de retención de agua y nutrientes y reduciendo la erosión. Sin embargo, su implantación en ambientes mediterráneos semiáridos es aún marginal debido a la competencia que se produce entre cubierta y vid por agua y nutrientes. En este trabajo se analizó la influencia de las cubiertas vegetales en la producción y calidad del mosto teniendo en cuenta distintos sistemas productivos. Durante 2 años consecutivos se evaluaron parámetros productivos en planta y calidad de mosto, de 3 viñedos con variedades y sistemas productivos diferentes: Airén de 80 años en secano en vaso a 1200 plantas/ha (Belmonte de Tajo); Tempranillo de 18 años en secano en espaldera a 2222 plantas/ha (Campo Real) y Merlot de 15 años en regadío en espaldera a 3570 plantas/ha (Navalcarnero). De forma general, las cubiertas vegetales redujeron las producciones y aumentaron la acidez y los °Brix en mosto. Entre viñedos, los resultados fueron muy dispares siendo el viñedo con cultivo Merlot, en Navalcarnero, el que mostró las mayores diferencias, especialmente en cuanto a producción de uva, a pesar de estar en regadío.

1. Introducción

La combinación de suelos cultivados desde hace muchos siglos, temperaturas que favorecen la mineralización de la materia orgánica y bajos inputs de la misma asociados al abandono de prácticas tradicionales (estorcolado habitual), junto con un clima con lluvias muy erosivas, ha dado lugar a una situación de degradación de los suelos de viñedo que pone en cuestión la sostenibilidad ambiental del cultivo. En ese sentido, las previsiones acerca del cambio climático a través de un aumento de las temperaturas y un régimen de lluvias más irregular y torrencial podrían dar lugar a un empeoramiento en los procesos de degradación del suelo.

Las cubiertas vegetales se han demostrado como una estrategia de manejo del suelo eficaz para detener su degradación debido a que reduce drásticamente las tasas de erosión y aumenta la materia orgánica del suelo (Virto et al., 2012), mejorando así sus propiedades físico-químicas. Sin embargo, en amplias zonas con clima mediterráneo, la humedad edáfica es muy limitada y el estrés hídrico de la planta es una de las mayores preocupaciones de los agricultores. Más aún en el contexto del cambio climático. El efecto de las cubiertas vegetales en los rendimientos es aún controvertido debido a que está afectado por múltiples factores (Ripoche et al., 2011) aunque hay una gran cantidad de estudios que señalan una reducción del vigor y un aumento de determinados parámetros tales como la concentración de azúcar, la acidez o los antocianos.



La Política Agraria Común (PAC), a través de su última reforma, favorece la implantación de cubiertas vegetales en cultivos leñosos mediante los Ecoesquemas. No obstante, en ambientes mediterráneos semiáridos del centro peninsular, su implantación ha sido históricamente anecdótica debido al rechazo por parte de los agricultores y al desconocimiento general de la técnica agronómica para manejarlas. En ese sentido, la mayor parte de los trabajos que se pueden encontrar en la bibliografía, referidos a viñedos en estas condiciones edafoclimáticas, son en fincas experimentales en regadío. Se necesitan, por tanto, más estudios en fincas comerciales en condiciones, conducciones y sistemas de cultivo diferentes para aumentar el conocimiento técnico y realizar mejores recomendaciones de manejo.

En consecuencia, el objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de la influencia de dos tipos de cubiertas vegetales en la producción de uva y en varios parámetros de calidad del mosto teniendo diferentes sistemas productivos que se dan en la zona centro de España.

2. Material y Métodos

El estudio se llevó a cabo en 3 viñedos comerciales incluidos en la Denominación de Origen Protegida Vinos de Madrid, en la Comunidad de Madrid, España (Fig. 1). La precipitación anual en la región es de unos 400 mm y la temperatura media de 14.8 °C. Se estudiaron 3 viñedos representativos de diferentes zonas y tipos de viticultura cuyas principales características se detallan en la Tabla 1. Todos ellos se seleccionaron por tener, al menos, 9 calles consecutivas con características edáficas muy similares entre sí. En cada viñedo, se llevó a cabo una o dos calicatas para caracterizar los suelos. El experimento de campo empezó en el invierno de 2012/2013 con el establecimiento de las cubiertas. Los tratamientos del suelo fueron: i) laboreo convencional (LAB) que consistió en 3 o 4 pases de cultivador a 15 cm de profundidad siguiendo el manejo más común en cada zona; ii) cubierta vegetal sembrada de *Brachypodium distachyon* (BRA), sembrada en los 2 m centrales de la calle en diciembre de 2012 a una dosis de 20 kg/ha; iii) cubierta vegetal de vegetación espontánea (VE). Ambas cubiertas fueron segadas una o dos veces en primavera dependiente del desarrollo de la vegetación a una altura de 10 cm, los restos vegetales se dejaron sobre el suelo como mulch. Los tratamientos fueron llevados a cabo con 3 repeticiones cada uno.

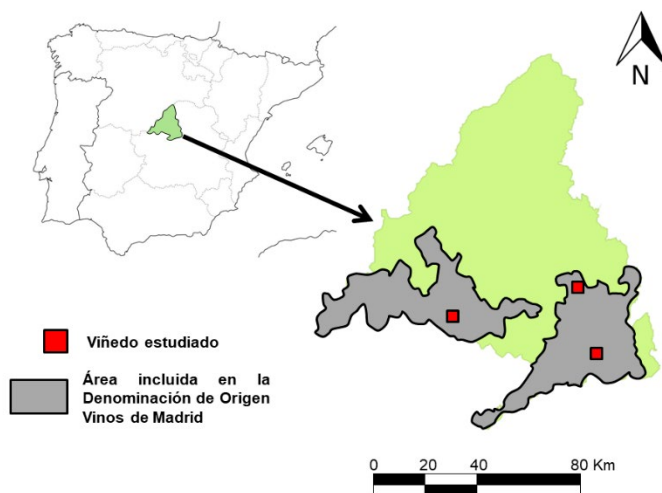


Fig. 1. Encuadre geográfico de los viñedos estudiados y área correspondiente a la DOP Vinos de Madrid en 2015.



Tabla 1. Clasificación del suelo (Soil Survey Staff, 2015) y características principales de los viñedos. P: profundidad enraizable.

Viñedo	Clasificación del suelo (USDA)	Altitud (m)	pH (1:2.5)	P (m)	Variedad	Edad	Densidad (Plantas ha ⁻¹)	Conducción
Belmonte de Tajo	Calcic Haploxeralf	754	8.5	0.2	Airén	>90	1200	Vaso transformado a cordón doble
Campo Real	Calcic Haploxeralf	783	8.6	0.4	Tempranillo	18	2222	Cordón doble
Navalcarnero	Typic Haploxeralf	586	7.7	0.4	Merlot	16	3570	Cordón simple

Las muestras de uva fueron tomadas en los años 2013, 2014 y 2015, aunque para este estudio solo tendrán en cuenta los dos últimos años. Las muestras fueron tomadas en el día antes de la cosecha por parte del agricultor. Cada año, la cosecha de 12 plantas por tratamiento fue pesada individualmente con un dinamómetro. Las uvas de 6 de las 12 cepas cosechadas fueron muestreadas aleatoriamente de la parte central, baja y alta de cada racimo según Jordan y Crosser (1983). Las muestras fueron exprimidas y el zumo fue analizado inmediatamente. Los sólidos solubles totales fueron medidos con un refractómetro ATAGO PR-100 y expresado como °Brix. La acidez total fue evaluada mediante una valoración con NaOH 0.1 N. Cada invierno, la madera de poda de 18 plantas por tratamiento, en cada viñedo, fue pesada con un dinamómetro. La poda fue llevada a cabo en cada viñedo siguiendo las indicaciones del propietario. Se hace notar que en 2014 no se dispone de datos de uva de Navalcarnero por cuestiones ajenas al equipo de trabajo.

Para el análisis estadístico, en primer lugar, se exploraron todas las variables, calculando estadísticos descriptivos de tendencia central y medidas de dispersión, analizando casos atípicos y extremos. Una vez conocidas las distribuciones, se han comparado los resultados de las variables productivas y de calidad entre tratamientos- factor (BRA, VE y LAB) analizando los datos de cada zona de estudio de forma independiente, tanto del año 2014 como de 2015. Se ha recurrido a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para muestras independientes (recomendable para muestras pequeñas y que no exige distribución normal) llevando a cabo comparaciones por parejas, con los valores de significación ajustados mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas. Se ha considerado que existían diferencias estadísticamente significativas cuando la significación es menor que 0.05 (95% de confianza). Se ha utilizado el software estadístico SPSS v.29 (IBM 2021).

3. Resultados

En el viñedo de Campo Real, en 2014 no hubo diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento en kg/ha. En 2015 la producción en LAB fue muy superior a los dos tipos de cubiertas vegetales y se registraron diferencias significativas entre LAB y BRA (Fig. 2). Vale la pena mencionar que en el caso del LAB se superó la producción máxima permitida para Tempranillo en la D.O.P. Vinos de Madrid y que las cubiertas vegetales tuvieron un rendimiento aceptable para esta variedad y en las condiciones del viñedo. Comparando específicamente, LAB y BRA, con un comportamiento más diferenciado, se puede observar que esta diferencia ha sido



debida a un gran aumento en la producción de LAB entre 2014 y 2015 y no a un efecto acumulativo en la competencia del BRA, puesto que este mismo tratamiento mejora levemente sus resultados de un año al otro. La VE se mantuvo en un punto intermedio los dos años con un rendimiento en kg/ha aceptable. En Belmonte de Tajo no se han encontrado diferencias significativas siendo los rendimientos muy bajos (1400-2400 kg/ha). En 2015, el LAB mostró una tendencia superior a BRA y VE. Por el contrario, en el viñedo de Navalcarnero, del que solo se dispone de datos de rendimiento en kg/ha de 2015, el LAB tuvo una producción estadísticamente superior a VE con BRA en una posición intermedia (Fig. 3). VE tuvo problemas en todo el ciclo vegetativo con la consecuencia de una maduración de uva fallida como se verá posteriormente.

En lo que concierne al peso de la madera de poda, en el viñedo de Campo Real no se encontraron diferencias significativas, si bien en 2015 se puede intuir una tendencia favorable al LAB, en especial al diferenciarse de VE. BRA, nuevamente, se quedó en valores intermedios (Fig. 4). En Belmonte de Tajo en 2015 LAB fue significativamente superior a BRA a pesar de la cantidad de datos atípicos debido a que el viñedo se encontraba con grandes diferencias entre cepas. En Navalcarnero (Fig. 5) LAB tuvo valores muy superiores a VE, como ocurrió en el rendimiento, con la particularidad de que en 2015 la madera de poda, en todos los tratamientos, fue muy inferior a los datos de 2014, de lo que se puede intuir muy malas condiciones de crecimiento vegetativo a nivel general para todo el viñedo.

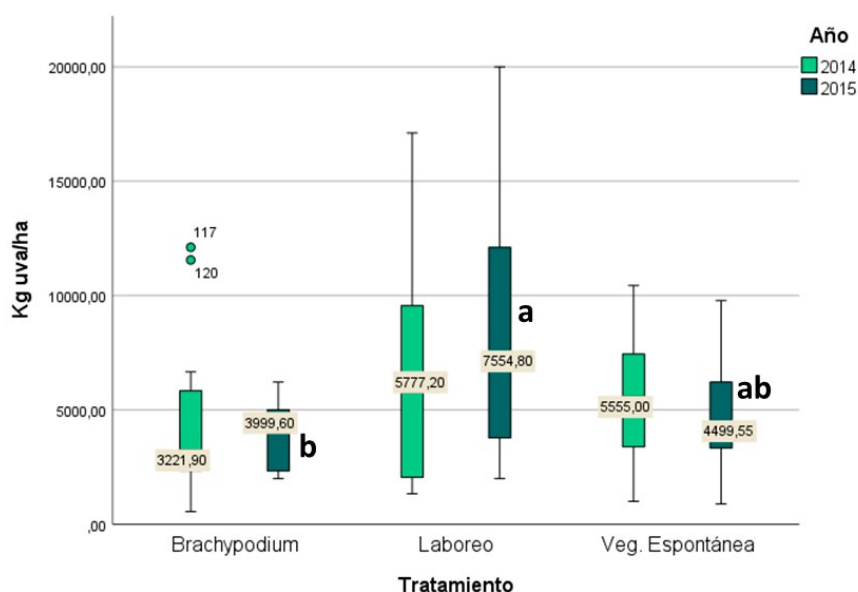


Fig. 2. Rendimiento en kg/ha en 2014 y 2015 con los diferentes manejos de suelo en el viñedo de Campo Real. Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo año.

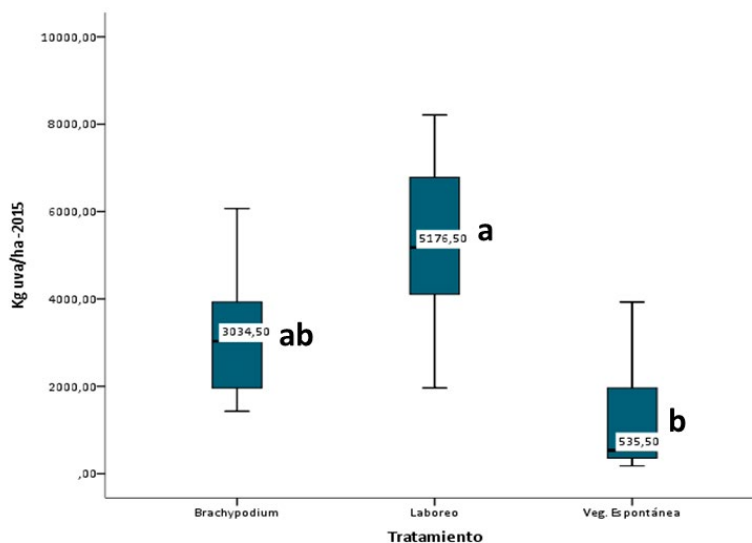


Fig. 3. Rendimiento en kg/ha en 2015 con los diferentes manejos de suelo en el viñedo de Navalcarnero.

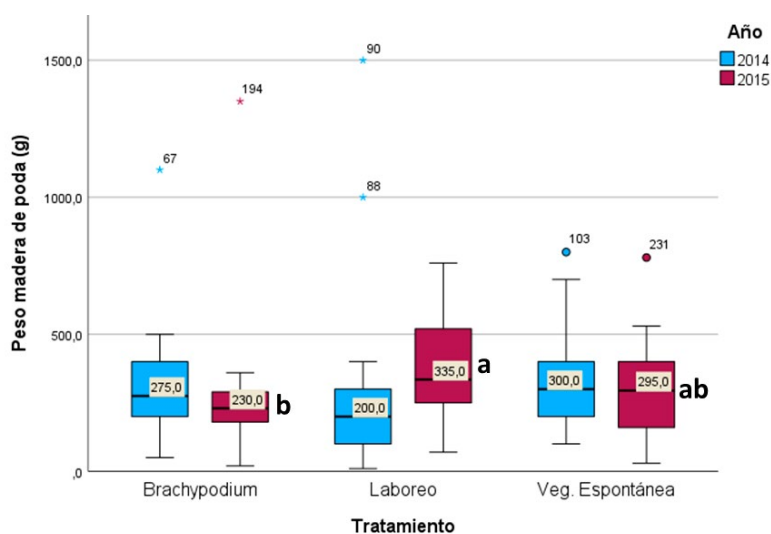


Fig. 4. Peso de madera de poda (g) con los diferentes manejos de suelo en el viñedo de Campo Real. Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo año.

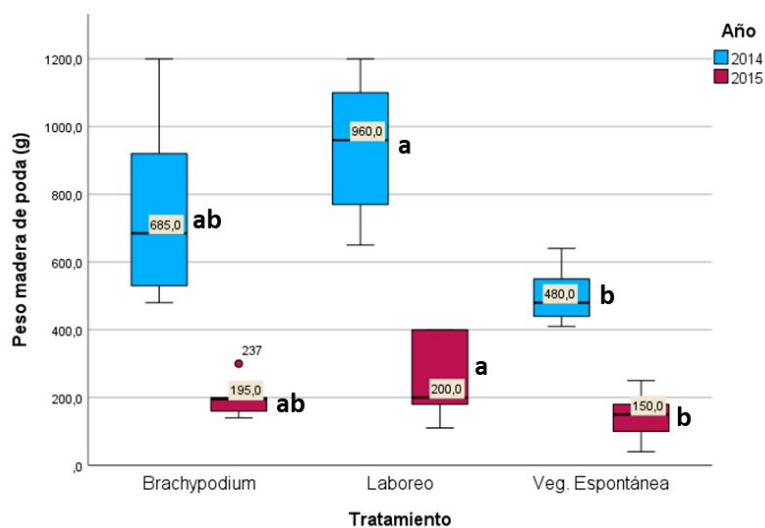


Fig. 5. Peso de madera de poda (g) con los diferentes manejos de suelo en el viñedo de Navalcarnero. Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo año.

En cuanto a los parámetros de calidad del mosto, las únicas diferencias significativas en el viñedo de Campo Real se encontraron en 2015, con VE registrando valores estadísticamente superiores a LAB. BRA se encontró en un punto intermedio (Fig. 6). Respecto a la acidez total, se destaca que VE tendió a valores por debajo de LAB y BRA registró valores ligeramente superiores sin ser diferencias destacables ni estadísticamente significativas. Conjuntamente, BRA tuvo valores iguales o superior a LAB en ambos parámetros. En el viñedo de Belmonte de Tajo, no se encontraron diferencias significativas en acidez en g/l de ácido tartárico, si bien, las dos cubiertas vegetales tendieron a mostrar valores por encima del LAB. Con respecto a los °Brix, VE tendió a estar por debajo de laboreo y BRA tuvo valores muy similares. En Navalcarnero, se entiende que los problemas de maduración que tuvieron lugar en especial en el caso de VE provocaron que la planta no sintetizara azúcares y, por tanto, valores muy bajos de °Brix. Si se descarta VE por los problemas anteriormente mencionados, no hubo diferencias significativas entre BRA y LAB en cuanto a la acidez total, siendo los valores de BRA ligeramente superiores (Fig. 7).

En consonancia con el hecho de que cada viñedo tiene una variedad de uva, una densidad de plantación, un sistema de conducción, un microclima, e incluso un desarrollo diferenciado de cada cubierta vegetal, los resultados fueron muy diferentes. En el viñedo de Belmonte de Tajo la influencia sobre la producción y los parámetros del mosto ha sido escasa o nula. En el caso de Campo Real las cubiertas vegetales redujeron la producción si bien resultaron no afectar o mejorar los parámetros del mosto. En el viñedo de Navalcarnero las cubiertas vegetales dieron lugar a una competencia muy importante que incluso produjo una maduración defectuosa en el caso de la cubierta de vegetación espontánea.

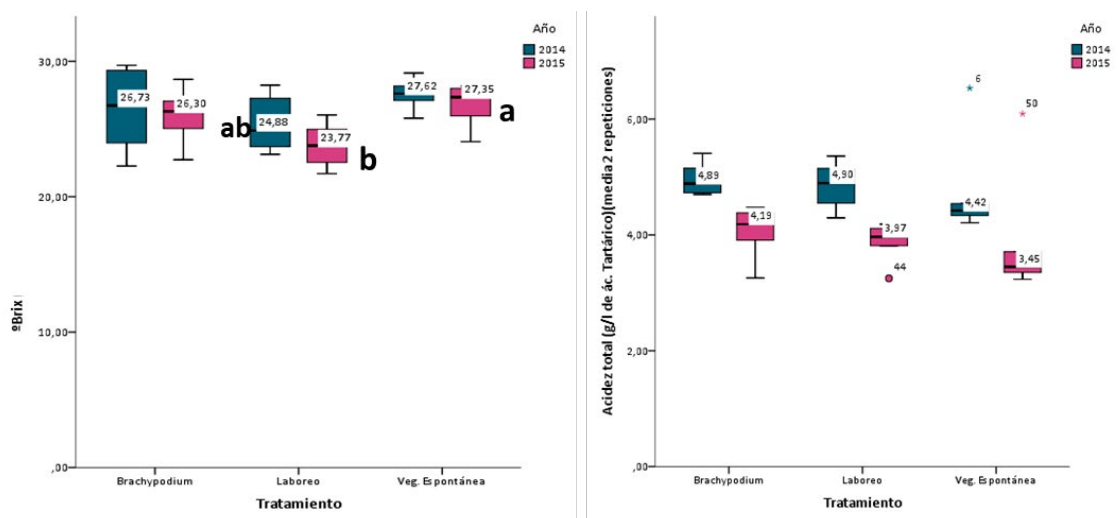


Fig. 6. Resultados de parámetros del mosto (°Brix y Acidez total g/l de ac. Tartárico) en el viñedo de Campo Real para los diferentes tratamientos y los dos años de seguimiento. Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro de un mismo año.

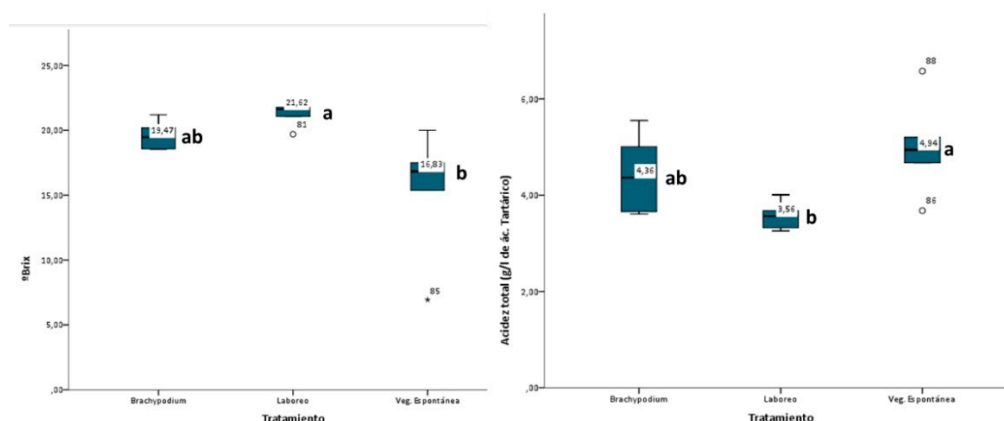


Fig. 7. Resultados de parámetros del mosto (°Brix y Acidez total g/l de ac. Tartárico) en el viñedo de Navalcarnero para los diferentes tratamientos y los dos años de seguimiento. Diferentes letras significan diferencias estadísticamente significativas.

4. Conclusiones

La influencia de las cubiertas vegetales sobre los parámetros estudiados ha sido muy variable en cada uno de los modelos de viñedo estudiados. Al contrario de lo esperable, los mayores efectos en cuanto a competencia y diferencias significativas han tenido lugar en el viñedo manejado en regadío. En los dos viñedos en secano, ambas cubiertas vegetales tendieron a reducir la producción de uva incrementando los grados Brix y la acidez total en ácido tartárico. En el actual panorama de la PAC, es imprescindible seguir evaluando la utilización de cubiertas vegetales adaptadas a condiciones mediterráneas semiáridas incluyendo nuevos parámetros: capacidad de retención de agua disponible del suelo/profundidad enraizable/tipo de suelo, microporosidad y conexión entre los poros, sistema radicar, factores químicos limitantes, portainjertos, sistemas de conducción, variedades, etc., así como sus interacciones.



5. Bibliografía

1. IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 29.0. Armonk, NY: IBM Corp.
2. Jordan, A.D., Crosser, B.J. 1983. **Determination of grape maturity by aroma/flavour assessment.** In: Lee, T.H., Somers, T.C. (Eds.), Proceedings of the Fifth Australian Wine Industry Technical Conference Australian Wine Research Institute, Glen Osmond.:261-274.
3. Ripoche, A., Metay, A., Celette, F., Gary, C. 2011. **Changing the soil surface management in vineyards: immediate and delayed effects on the growth and yield of grapevine.** Plant Soil 339:259-271. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-010-0573-1>.
4. Virto, I., Imaz, M.J., Fernandez-Ugalde, O., Urrutia, I., Enrique, A., Bescansa, P. 2012. **Soil quality evaluation following the implementation of permanent cover crops in semi-arid vineyards. Organic matter, physical and biological soil properties.** Span. J. Agric. Res. 10:1121-1132. doi: <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2012104-613-11>.

6. Agradecimientos

Estos ensayos no habrían podido llevarse a cabo sin la colaboración de los propietarios de los viñedos comerciales: Carlos Gosálbez, Felipe Ávila y Ricardo Benito. Este estudio ha sido financiado mediante fondos propios del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA): proyecto FP13-ICV.

Influencia de una cubierta vegetal espontánea sobre la concentración de nutrientes en peciolo (var. Graciano)

Roberto Pérez-Parmo, Olatz Unamunzaga Galarza, Ana Aizpurua Insausti

NEIKER (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario; Calle Berreaga, 1; 48160 Derio (Bizkaia))

Resumen

Las elevadas pendientes, y el manejo del suelo mediante laboreo hacen que exista un riesgo importante de erosión en el viñedo alavés. Las cubiertas vegetales reducen este riesgo, pero hay que tener en cuenta que pueden competir con el viñedo por los nutrientes y el agua. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto que distintos manejos de suelo tienen sobre la situación nutricional del viñedo. Para ello se realizó un ensayo en un viñedo de la variedad Graciano durante los años 2021 y 2022. Se compararon tres tratamientos: laboreo tradicional, cubierta vegetal espontánea y un manejo combinado de ambos. En el año 2021 el contenido de K, y Zn en el peciolo fue más alto en el tratamiento de cubierta vegetal con respecto al laboreo. Sin embargo, el potasio en vino fue más alto en el tratamiento de laboreo. Por otra parte, el nivel de Mn fue más alto en el tratamiento de laboreo respecto a cubierta vegetal. En el caso del Mg, cubierta vegetal y laboreo obtuvieron similares valores, mayores que en el tratamiento de manejo combinado. En el año 2022 solo se detectaron diferencias significativas para el P, cuyo contenido fue más alto en los tratamientos de laboreo y manejo combinado y más bajo en el tratamiento de cubierta vegetal.

1. Introducción

El viñedo es uno de los cultivos más susceptibles a la erosión en la región mediterránea, puesto que en las zonas sub-húmedas o semiáridas se manejan normalmente manteniendo el suelo desnudo a través de un laboreo convencional. Entre las técnicas más comunes y baratas que podemos encontrar para hacer frente a este problema se encuentra la cubierta vegetal permanente, espontánea o sembrada, técnica que ha demostrado reducir la pérdida de suelo y nutrientes comparado con suelos labrados (Bienes et al., 2012). Sin embargo, para extender su uso es necesario contar con datos de su influencia sobre el viñedo, y uno de los aspectos relevantes en este sentido es el estado nutricional. Así, las cubiertas pueden ejercer una competencia por los nutrientes que puede ser evaluada mediante el análisis de hoja.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diferentes manejos de suelo de un viñedo de variedad Graciano de Rioja Alavesa situado en pendiente, sobre el estado nutricional del viñedo.

2. Material y métodos

El viñedo a estudio está certificado en Agricultura Ecológica y pertenece a Bodegas Maisulan (Elvillar/Bilar, Álava/Araba). Se plantó en 2007 con la variedad 'Graciano' sobre portainjerto 110 R, tiene formación en espaldera, un sistema de poda en cordón simple y un marco



de plantación de 2,4 x 1,3 metros. La parcela tiene una pendiente entre 10-20%. Según la estación meteorológica de Párganos, la precipitación media anual ronda los 500 mm y no alcanza los 200 mm de media a lo largo del ciclo del cultivo (abril-octubre). El estudio comenzó en octubre de 2019 y continúa en la actualidad. Respecto al suelo, la textura es franca y el contenido de nutrientes es bajo (Tabla 1). El diseño experimental consistió en tres bloques al azar con tres tratamientos y 36 cepas por parcela elemental. Los tratamientos fueron: Cubierta vegetal espontánea (CVE), con 2 pases de segadora/año; Laboreo convencional (LAB), con 4 pases/año de maquinaria de laboreo (rotavator, chisel y/o rastra de púas); Manejo combinado (MC), con una calle con 2 pases/año de chisel y una calle sin labrar con 1-2 pases/año de segadora (las calles se alternan cada año). Durante las campañas 2021 y 2022, se tomaron muestras de material vegetal (60 peciolo/parcela elemental) en enero, y los nutrientes analizados fueron N, P, K, Ca, Mg, S, Mn, Cu y Zn.

Tabla 1 Análisis de suelos de la parcela (0-30 cm) al inicio de la experimentación.

Parámetro	Valor
Arena (%)	33,8
Limo (%)	49,9
Arcilla (%)	16,3
Clasificación Textural	Franca
Materia Orgánica Oxidable (W&B) (%)	0,8
pH en agua (1:2.5, w/v)	8,6
Carbonatos (%)	44
Caliza Activa (%)	16
Fósforo Olsen (mg/kg)	2,3
Potasio Asimilable (mg/kg)	97
Calcio Asimilable (mEq/100g)	10
Magnesio Asimilable (mEq/100g)	0,64
Nitrato (mg N-NO ₃ /kg)	1,3
Amonio (mg N-NH ₄ /kg)	1,8

3. Resultados

En general, las concentraciones de nutriente en peciolo se encontraban en el mismo orden de magnitud que las halladas por Domínguez *et al.* (2015) para la variedad Graciano. Sin embargo, en el caso del Mg y del Mn los valores hallados en este estudio fueron menores. En el año 2021 el contenido de K en peciolo en el tratamiento de cubierta vegetal y manejo combinado fue mayor que para el tratamiento de laboreo (Tabla 2). El mayor rendimiento productivo de este último tratamiento puede ser el causante de estas diferencias, puesto que es conocido que el fruto es un importante sumidero para este nutriente que hace que descienda el contenido en hoja. Descensos de la concentración de K en hoja debidos a la producción de uva han sido registrados por varios autores (Mpelasoka *et al.* (2003). En el trabajo llevado a cabo por Linares (2009), también se detecta una menor concentración de potasio en peciolo en el tratamiento sin cubierta, aunque en este caso el manejo se realizó mediante el uso de herbicida. Sin embargo, esto no coincide con lo observado por otros autores en trabajos realizados en viñedo que no encontraron diferencias en la concentración de potasio en peciolo en el enero al comparar tratamientos con cubierta y con laboreo (Ibañez, 201-5; Pérez-Álvarez, 2015) en la DO Ca Rioja. El nivel de potasio en suelo en estos trabajos era menor y algo mayor que el hallado en este



estudio respectivamente. Sin embargo, en otro estudio de 15 años llevado a cabo en Navarra (EVENA, 2012) en que el contenido de potasio en suelo era alto, se detectó una mayor concentración de potasio en el tratamiento de laboreo. Este efecto sumidero del racimo con respecto al potasio hizo que la concentración de potasio en vino fuera mayor en el tratamiento de laboreo los dos años de muestreo (Tabla 3). En el caso del Mg, cubierta vegetal y laboreo obtuvieron similares valores, mayores que en el tratamiento de manejo combinado. Por otra parte, la concentración de Mn fue mayor en el tratamiento de laboreo y menor en el de cubierta vegetal y justamente al contrario para el Zn. En otro trabajo (Kortabarria, 2017) llevado a cabo en Rioja Alavesa se observó que las cubiertas vegetales tendían a favorecer la concentración de Mn y Zn en hoja. Esto no coincide con los resultados de este estudio para el caso del Mn. El motivo aducido para el aumento de la concentración foliar de Mn y Zn bajo el manejo CV era la acidificación de la rizosfera a causa de la liberación de H⁺ por parte de las raíces. Las raíces de algunas plantas, suelen liberar H⁺ cuando la absorción total de cationes supera la de aniones, provocando un descenso del pH en la rizosfera (Grinsted *et al.*, 1982). Por tanto, teniendo en cuenta que la solubilidad de Zn es mayor a pH más ácidos (Sims, 1986), puede que la cubierta vegetal hubiese resultado en una mayor disponibilidad de Zn para las vides (Abbas *et al.*, 2016).

En el año 2022 el único nutriente para el que se observaron diferencias significativas entre tratamientos fue el P. Así el tratamiento de cubierta vegetal presentaba las menores concentraciones en peciolo. Esto puede estar indicando que las raíces del viñedo están explorando capas más profundas de suelo que los otros tratamientos, puesto que el contenido de P en suelo suele descender en profundidad. También puede ser debido a la competencia por este nutriente que se incrementa en el caso de la cubierta vegetal, sobre todo teniendo en cuenta que el contenido de P en suelo es muy bajo. Quizá el comportamiento del Zn puede estar influido por el del P, puesto que son nutrientes que tienen comportamientos antagónicos. Cabe destacar que, aunque el contenido de P en peciolo no varía significativamente en función del tratamiento, en el año 2021 la tendencia que se observa para este nutriente es la misma que en 2022.

No se observa un descenso del contenido de N en hoja ni de Nitrógeno fácilmente asimilable en mosto, como si ocurre en el caso de otros autores (Pérez-Álvarez *et al.*, 2015).

Tabla 2. Análisis foliares realizados en las campañas 2021 y 2022.

	2021			2022		
	CVE	MC	LAB	CVE	MC	LAB
N (g 100 g ⁻¹)	0,40	0,38	0,36	0,35	0,37	0,36
P (g 100 g ⁻¹)	0,08	0,14	0,13	0,06 b	0,11 a	0,11 a
K (g 100 g ⁻¹)	2,80 a	2,92 a	2,23 b	2,39	2,80	2,27
S (g 100 g ⁻¹)	0,09	0,10	0,09	0,07	0,08	0,07
Ca (g 100 g ⁻¹)	2,07	2,13	2,32	2,10	2,16	2,33
Mg (g 100 g ⁻¹)	0,71 a	0,62 b	0,77 a	0,84	0,78	0,93
Mn (mg kg ⁻¹)	12 b	9 b	16 a	17	13	16
Cu (mg kg ⁻¹)	127	91	71	3	4	3
Zn (mg kg ⁻¹)	47 a	41 ab	32 b	32	32	27

Medias con letras distintas corresponden a valores significativamente distintos entre tratamientos dentro de cada año.



Tabla 3. Resultados productivos y cualitativos de las campañas 2020, 2021 y 2022.

Campaña	Tratamiento	Producción (kg/planta)	Peso madera de poda (kg/planta)	Nitrógeno fácilmente asimilable (mg/l)	Potasio en vino (mg/l)
2020	CV	2,5	0,676 b	57	-
	MC	2,5	0,628 b	50	-
	LAB	2,7	0,866 a	60	-
2021	CV	3,2 b	0,384 c	81	632 b
	MC	3,4 b	0,493 b	86	761 a
	LAB	4,3 a	0,725 a	96	774 a
2022	CV	2,5 b	0,359 c	37	919 b
	MC	2,9 b	0,477 b	40	1007 a
	LAB	4,0 a	0,557 a	44	962 ab

Medias con letras distintas corresponden a valores significativamente distintos entre tratamientos dentro de cada año.

4. Conclusiones

El manejo del suelo mediante cubierta vegetal espontánea tiene consecuencias sobre el estado nutricional del viñedo. En este sentido, el mayor rendimiento de uva del tratamiento de laboreo respecto al los de cubierta vegetal generó una competencia por el potasio entre la hoja y el fruto que llevó a un descenso en la concentración de potasio en el peciolo, pero que incrementó el nivel de potasio en vino.

5. Bibliografía

1. ABBAS, G.; SAQIB, M.; AKHTAR, J.; MURTAZA, G.; SHAHID, M.; HUSSAIN, A. 2016. **Relationship between rhizosphere acidification and phytoremediation in two Acacia species**. Journal of Soils and Sediments, 16 (4): 1392-1399. 1.
2. BIENES, R., MARQUES, M.J., RUÍZ-COLMENERO, M. (2012). **Cultivos herbáceos, viñedos y olivares. El manejo tradicional del suelo y sus consecuencias en la erosión hídrica**. Cuadernos de Investigación Geográfica 1(38): 49-74.
3. DOMINGUEZ, N.; GARCÍA-ESCUADERO, E.; ROMERO, I.; BENITO, A.; MARTÍN, I. 2015. **Leaf blade and petiole nutritional evolution and variability throughout the crop season for Vitis vinifera L. cv. Graciano**. Spanish Journal of Agricultural Research, 13 (3): 17 pp. e0801
4. EVENA. Gobierno de Navarra, 2012. **Ensayos de cubiertas vegetales en viña. 1995-2010**. Gobierno de Navarra (Dpto. Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local). ISBN: 978-84-235-3315-2.
5. GRINSTED, M.J.; HEDLEY, M.J.; WHITE, R.E.; NYE, P.H. 1982. **Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (Brassica Napus var, Emerald) seedlings, I, pH change and the increase in P concentration in the soil solution**. New Phytologist, 91: 19-29.
6. IBAÑEZ, S. 2015. **Gestión del suelo en viñedo mediante cubiertas cegetales. Incidencia sobre el control del rendimiento y del vigor. Aspectos ecofisiológicos, nutricionales, microclimáticos y de calidad del mosto y del vino**. Gobierno de La Rioja (Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente). ISBN: 978-84-8125-678-9.



7. KORTABARRIA, J. 2017. **Cubiertas vegetales en un viñedo de Rioja Alavesa: influencia sobre el estado hídrico, crecimiento vegetativo, producción y calidad.** Tesis doctoral. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.
8. LINARES, R. 2009. **Estudio del empleo de cubiertas vegetales temporales para la regulación del régimen hídrico, crecimiento y manejo sostenible del viñedo.** Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.
9. MPELASOKA BS, SCHACHTMAN BP, TREEBY MT, THOMAS MR. 2003. **A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation.** Aust. J. Grape Wine Res. 9, 154–168.
10. PÉREZ-ÁLVAREZ, E.P. 2015. **Influencia del uso de cubiertas vegetales sobre la fertilidad del suelo, la expresión vegetativa de la vid y la composición de la uva y el vino en un viñedo de Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) de la D.O.Ca. Rioja.** Tesis doctoral. Universidad de La Rioja.
11. SIMS, G, K.; ELLSWORTH, T.R.; MULVANEY, R.L. 1995, **Microscale determination of inorganic nitrogen in water and soil extracts.** Communications in Soil Science and Plant Analysis, 26 (1–2): 303–316.

6. Agradecimientos

Este trabajo se enmarca en el proyecto MONTCLIMA (SOE3/P4/E0874): Clima y riesgos naturales en las montañas del SUDOE, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del programa Interreg SUDOE, y también en la extensión del proyecto RiskAqua Soil (EAPA_272/2016) cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del programa INTERREG Arco Atlántico. Así mismo agradecemos a la bodega Maisulan (Eva y Luis) por su trato, predisposición y participación en todos los trabajos.

Interacción entre genotipos de vid y productos de control biológico basados en especies de *Trichoderma*

Ester Abarquero¹, Dolores Loureiro¹, Raquel Rodríguez-Cudeiro, David Gramaje², Emilia Díaz-Losada¹

¹Estación de Viticultura y Enología de Galicia. Ponte San Clodio s.n 32428, Leiro Ourense

²Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV). Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad de La Rioja – Gobierno de La Rioja. Ctra. LO-20 Salida 13, Finca La Grajera. 26007 Logroño.

Resumen

En respuesta a una legislación cada vez más restrictiva en el uso de productos químicos, se está implantando el uso del control biológico como estrategia para la prevención de enfermedades de la madera de la vid. Sin embargo, estudios realizados recientemente muestran variabilidad en los resultados de la eficacia de estos agentes de biocontrol, posiblemente consecuencia del elevado número de factores que pueden afectar a su viabilidad.

Con la finalidad de evaluar la influencia que puede tener el genotipo en su afinidad por los distintos productos en base a *Trichoderma* spp. comercializados en España (Esquive® ®, Vintec® ®, y Blindar®), se estableció un campo de ensayo en bloques al azar de 9 variedades de vid. Tras la poda, se trataron 40 heridas de poda con los distintos productos. Transcurridos 2 meses se evaluó la incidencia y severidad para cada genotipo y producto.

Los resultados mostraron un comportamiento diferencial en relación al grado de implantación en las heridas de poda de los distintos productos, siendo Vintec® el de mayor grado de implantación. No se observaron diferencias significativas en relación a la afinidad por el genotipo en la aplicación con Vintec®, pero sí en relación a Esquive®, siendo el cultivar Mencía el que presentó menor grado de afinidad.

1. Introducción

Las enfermedades de la madera de la vid, concretamente el decaimiento por *Botryosphaeria*, eutipiosis y la yesca, son las que producen las mayores pérdidas en los viñedos de todo el mundo. Una de las principales vías de infección de los viñedos ocurre a través de las heridas producidas en la poda cuando la cepa está en reposo vegetativo (Gramaje y col., 2018). Distintos estudios han demostrado que las heridas en la madera son susceptibles a la infección por esporas de los hongos patógenos hasta 2 o 3 meses después de producirse el daño por la poda, en función de las condiciones meteorológicas, la época del año y probablemente, del propio viñedo (variedad, edad, riego, etc.) (Eskalen y col., 2007; Úrbez-Torres y Gubler, 2011).

El control de las EMV no es sencillo: plantas asintomáticas jóvenes pueden presentar síntomas cuando son adultas, después de un periodo de latencia más o menos dilatado en el tiempo. Además, para el aislamiento e identificación de estos patógenos se debe arrancar la cepa, por tanto, no podemos saber cómo evolucionaría la enfermedad (Armengol, 2013).



La retirada de numerosas materias activas fungicidas de origen químico, han despertado el interés de programas de gestión integrada (GIP) para el control de las EMV. Estos programas incluyen prácticas culturales y uso de productos orgánicos con agentes de control biológico (ACB) (Bertsch y col., 2013). Los ACB son organismos especialmente seleccionados por su antagonismo intrínseco hacia un patógeno o grupo particular de patógenos. Suelen incluir especies del género bacteriano *Bacillus* y del género fúngico *Trichoderma*. Estas últimas son las más estudiadas y representan uno de los ACB más importantes utilizados en la agricultura (Verma y col., 2007). Las especies de *Trichoderma* son ascomicetos filamentosos que suelen vivir en las raíces y en el ecosistema del suelo (Harman y col., 2004). Su utilización en el suelo otorga grandes beneficios a la planta estimulando su crecimiento consecuencia de una mayor movilización y absorción de nutrientes. Además, las especies de *Trichoderma* pueden proteger las heridas de poda, persistiendo en ellas durante un tiempo y compitiendo por los nutrientes y por el espacio frente a los hongos causantes de las EMV (Mutawila y col., 2016).

El efecto supresor de *Trichoderma* spp. sobre los patógenos podría deberse a las propias especies de *Trichoderma*, ser el resultado de la interacción entre la especie de *Trichoderma* y la planta, o ser debido a una sinergia de estos dos efectos. Se ha demostrado en condiciones *in vitro* que dentro de los mecanismos de acción de *Trichoderma* sobre patógenos causante de EMV está el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por nutrientes y espacio (John y col., 2005; Kotze, 2011). Mutawilla y col. (2011) evaluó la interacción entre distintas especies de *Trichoderma* y distintos cultivares de vid, observando diferencias significativas en la interacción de una misma especie de *Trichoderma* y los distintos cultivares, pero también entre las distintas especies de *Trichoderma* para un mismo cultivar; así la incidencia de *Trichoderma* fue más elevada en Chenin Blanc, frente a Chardonnay en el que se observó una menor incidencia. La incidencia de *Trichoderma harzianum* fue más baja que la de *Trichoderma atroviride* en los cultivares Colombard y Shiraz (Mutawila y col., 2011).

Estudios realizados recientemente muestran variabilidad en los resultados de la eficacia de estos agentes de biocontrol, posiblemente consecuencia del elevado número de factores que pueden afectar a su viabilidad. Martínez-Diz y col., (2021), mediante inoculaciones controladas de los hongos *Phaemoniella chlamydospora* y *Diplodia seriata* en heridas de poda protegidas con diferentes especies de *Trichoderma* mostraron la eficacia en la protección de las heridas de poda variaba en función de la especie de *Trichoderma*.

En este sentido en España, existen tres productos autorizados para el control de hongos asociados a las EMV en el registro de productos fitosanitarios del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2023), basados en distintas especies del género *Trichoderma*: Esquive® (*Trichoderma atroviride* cepa I-1237), Vintec® ® (*Trichoderma atroviride* cepa SC1), Blindar® (*Trichoderma asperellum* cepa ICC012 y *Trichoderma gamsii* cepa ICC080).

Con la finalidad de profundizar en el mecanismo de acción del género *Trichoderma* para su posterior utilización como agentes protectores de heridas de poda, se evaluar la influencia que puede tener el genotipo en su afinidad por los distintos productos actualmente comercializados en base a *Trichoderma* spp.



2. Material y Métodos

2.1. Localización y características del viñedo experimental

El ensayo se llevó a cabo en el año 2022 en la finca experimental de la Estación de Viticultura y Enología de Galicia (EVEGA) en la Denominación de Origen Ribeiro (Galicia).

La parcela, es un viñedo de 30 años, en el que se plantaron 9 variedades de relevancia para la obtención de vinos gallegos: Brancellao, Sousón y Mencía, variedades de vinificación de uva tinta, y Albariño, Dona Branca, Treixadura, Torrontés, Loureira y Godello variedades de vinificación de uva blanca. De la variedad Mencía se obtienen la gran mayoría de los vinos tintos gallegos, fundamentalmente en la Denominación de Origen Ribeira Sacra. Sousón y Brancellao son variedades minoritarias, si bien su cultivo ha aumentado en los últimos años, utilizándose en la elaboración de vinos monovarietales o plurivarietales elaborados utilizando estos dos cultivares o en combinación, en el caso de Sousón, con la variedad Mencía. En relación a las variedades blanca, Albariño, si bien contemplada en los pliegos de las 5 denominaciones de Origen gallegas, es principal componente de los vinos de la D.O. Rías Baixas. De la variedad Treixadura se obtienen vinos de la Denominación de Origen Ribeiro. Con ella se elaboran vinos monovarietales o plurivarietales en combinación con Torrontés y Loureira, variedades minoritarias cultivadas fundamentalmente en esta Denominación de Origen. La variedad Godello es cultivada fundamentalmente en la Denominación de Origen Valdeorras, si bien su cultivo se ha extendido en los últimos años a las denominaciones de Origen Monterrei, Ribeira Sacra y Ribeiro. Dona Branca, se cultiva fundamentalmente en la Denominación de Origen Monterrei.

La densidad de plantación del viñedo es de 2,40m x 1,25cm Las plantas están conducidas en espaldera, formadas en cordón doble, y podadas a pulgares de dos yemas. En el viñedo se realizaron las prácticas culturales estándar para el control de las principales enfermedades endémicas que afectan al viñedo gallego (mildiu, oidio, podredumbre negra y botrytis), siguiendo las directrices de la Gestión Integrada de Plagas (GIP).

En las proximidades de la parcela a menos de 500m está localizada una estación meteorológica de MeteoGalicia (Servicio de Meteorología de la Comunidad Autónoma de Galicia) que nos permite la obtención de datos climáticos de la campaña de estudio. Los ensayos se realizaron entre marzo y mayo del año 2022. En la fig. 1 se muestran las variaciones diarias de la temperatura media y la humedad relativa durante los meses de ensayo.

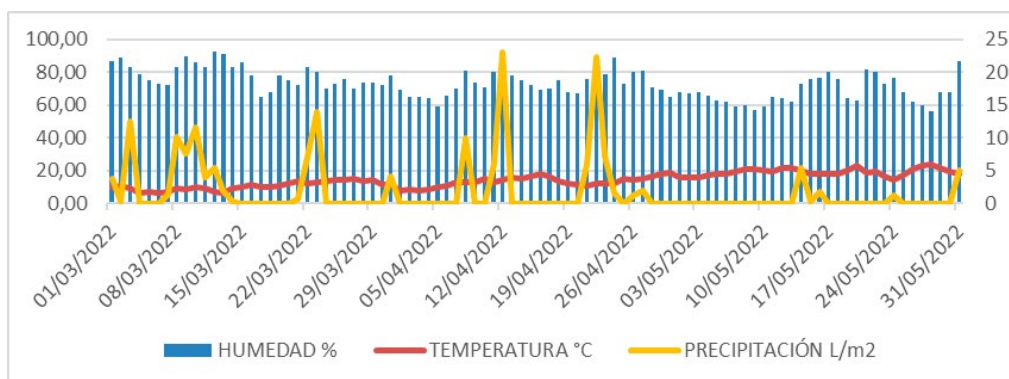


Fig. 1. Temperatura media diaria, porcentaje de humedad relativa y precipitaciones medias diarias, durante el periodo de ensayo



La temperatura media diaria durante este periodo fue de 11,35°C y la humedad relativa del 72%. La precipitación media fue de 1,26 L/m².

2.2. Características de los productos comerciales

Se han evaluado 3 productos comerciales basados en especies de *Trichoderma*: Esquive®, comercializado por Idai Nature S.L., Blindar® por Gowan, y Vintec® por Certis Belchim. En la tabla 1 se indican para cada producto su composición, dosis de aplicación y otras observaciones recomendadas de uso aplicación

Tabla 1. Características de los productos comerciales indicadas por los fabricantes

Nombre comercial	Composición	Recomendación de uso	Formulación	Dosis recomendada
Blindar®	<i>Trichoderma asperellum</i> (cepa ICC012) 2% + <i>Trichoderma gamsii</i> (cepa ICC080) 2% (3 x 10 ⁷ UFC/g)	Yesca - Complejo de hongos de madera	polvo mojable	2,5 gL ⁻¹
Esquive®	<i>Trichoderma atroviride</i> (cepa I-1237) 5% (1x10 ⁸ ufc/g)	Control de brazo negro muerto (BDA) (<i>Diplodia mutila</i>), eutipiosis de la vid (<i>Eutypa lata</i>) y yesca de la vid (<i>Stereum hirsutum</i>)	polvo mojable	100 gL ⁻¹
Vintec®	<i>Trichoderma atroviride</i> (cepa SC1) 1x10 ¹⁰ ufc/g	Yesca (<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> y <i>Phaeoacremonium minimum</i>) y eutipiosis de la vid (<i>Eutypa lata</i>).	polvo mojable	2 gL ⁻¹

La casa comercializadora de Blindar® recomienda aplicarlo por pulverización localizada a las heridas de poda a más tardar al final del desborre. En viñedos con una alta presión de enfermedad indica que es posible realizar una segunda aplicación durante a la misma dosis. La aplicación Esquive® se recomienda en pulverización mediante tractor o manual en una dosis de 4kg/ha o mediante pincel a una dosis de 100g/L⁻¹, a partir del estadio fenológico de yemas latentes (BBCH 00). Aplicarlo en un plazo máximo de 2 semanas después de la poda. Se puede efectuar una aplicación por campaña. En el caso de Vintec® indica aplicación durante periodo de latencia invernal, antes del inicio del hinchamiento de las yemas (BBCH 00). Se pueden efectuar 1-2 aplicaciones por campaña a intervalos de 7 días y con un volumen de caldo de 100-200 L/ha. La conservación de este producto debe realizarse con temperaturas de 0-4°C.

La viabilidad de las diferentes cepas de *Trichoderma* de los productos comerciales se comprobó antes de realizar el ensayo, para que fuera al menos del 85% (Pertot et al., 2016). Una dilución de la suspensión de conidios se sembró en PDA, se incubó a temperatura ambiente durante 24-48 h, y se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias.



2.3. Ensayo de campo y diseño experimental

Las variedades en el viñedo están dispuestas en bloques aleatorios con 4 repeticiones de 7 plantas cada una. El 9 de marzo de 2022, coincidiendo con la época de poda habitual en esta región, los sarmientos de 1 año de todas las plantas se podaron a tres yemas. Una de las plantas, de cada variedad y repetición, se trató con un producto comercial diferente, obteniendo como media 40 heridas de poda tratadas. Una planta por variedad y repetición se utilizó como control negativo, aplicando en la herida de poda solamente agua. Las formulaciones líquidas se prepararon mediante una suspensión del producto en agua, en las dosis recomendadas por los fabricantes. El producto Blindar® fue prehidratado 24h antes de la aplicación en campo, y se mantuvo a temperatura ambiente. Los productos, Esquive® y Vintec® se prepararon en el momento de la aplicación. Las aplicaciones se dieron a mano con la ayuda de un pincel, para evitar posibles contaminaciones entre las heridas de poda de plantas próximas.

2.4. Reaislamiento de *Trichoderma* spp.

Tras 60 días de la aplicación de los tratamientos las plantas se podaron por encima de la segunda yema obteniendo varetas de aproximadamente 10 cm, que se almacenaron a 4°C hasta su evaluación en el laboratorio.

Se eliminó la corteza de las varetas con la ayuda de un bisturí, se esterizaron durante 1 minuto en hipoclorito sódico al 33% (40 g NaCl comercial) y se enjuagaron dos veces durante 1 minuto en agua destilada. Tras secarlas al aire sobre papel de filtro estéril para eliminar el exceso de humedad, cada vareta se cortó, utilizando tijeras de podar esterilizadas, en pequeños trozos de unos 12 mm², tomados del margen entre el tejido de madera muerta y el tejido de madera vivo o aparentemente sana. Se colocaron 10 fragmentos de cada vareta en dos placas (5 fragmentos por placa) con Agar Extracto de Malta (MEAS) suplementado con 0,35 gL⁻¹ de sulfato de estreptomina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Los cultivos se incubaron a 25 °C y se inspeccionaron diariamente durante 8 días. Todas las colonias se transfirieron a placas de PDA y se evaluó la presencia o ausencia de micelio fúngico de *Trichoderma* spp.

A continuación, se realizó la identificación de *Trichoderma* spp a nivel de especie mediante la secuenciación de la región ITS utilizando cebadores universales ITS1F/ITS4 (Gardes & Bruns, 1993). Todos los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% (agarosa D-1 Low EEO, Conda Laboratories) y se secuenciaron en ambas direcciones por Eurofins GATC Biotech (Colonia, Alemania).

2.5. Análisis de los datos

La afinidad de los distintos genotipos por los diferentes productos comerciales se determinó como el porcentaje medio de recuperación (MPR) de las especies de *Trichoderma* en las varetas analizadas para cada variedad.

Se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas antes del análisis estadístico de los datos, realizando la transformación de los datos cuando fue necesario mediante el arcoseno de la raíz cuadrada de (MPR)^{1/2}. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un ANOVA considerando como variables dependientes los distintos tratamientos. Para el análisis de los datos se utilizó el software XLSTAT- 2020



3. Resultados

El porcentaje de recuperación de las especies de *Trichoderma*, tras 2 meses de su inoculación en campo, ha variado en función del producto comercial. Siendo más elevado en el tratamiento con Vintec®, y más bajo en el tratamiento con Blindar®, independientemente del tipo de cultivar.

En la figura 1, se representa para cada cultivar el porcentaje de medio de *Trichoderma* spp. aislado de heridas de poda 2 meses después de que las heridas fueron tratadas con los productos comerciales a base de *Trichoderma*.

Trichoderma atroviride (cepa SC1) presentó un mayor grado de implantación en las heridas de poda, con valores de incidencia que variaron entre un 85 y un 95%. En el caso de *Trichoderma atroviride* (cepa I-1237), el grado de implantación varió con el cultivar correspondiendo el mayor porcentaje a la variedad Albariño (97,5%), y el menor porcentaje a la variedad Mencía (61,6%).

Distintos factores pueden influir en la implantación de los BCA, sobre todo condiciones ambientales como la temperatura. En este ensayo las condiciones ambientales fueron adecuadas para el desarrollo del hongo, teniendo en cuenta las prescripciones técnicas indicadas por las casas comerciales. En el momento de aplicación no hubo precipitaciones y se registró una temperatura de 10,64°C y una humedad de 79,0% en el ambiente.

El distinto grado de implantación de *Trichoderma atroviride* podría relacionarse con las distintas cepas de esta especie utilizadas en nuestro ensayo. Un estudio previo mostró diferente grado de implantación de la especie *Trichoderma atroviride* en función de la cepa utilizada ha sido también descrito por otros autores (Mutawila et al., 2011).

Los porcentajes de implantación de *Trichoderma asperellum* (cepa ICC012) + *Trichoderma gamsii* (cepa ICC080) variaron entre 0 y 36%. Por lo que se pueden considerar que estas especies de *Trichoderma* podrían ser menos efectivas en la protección de heridas de poda.

El análisis de la varianza reveló para los tratamientos con Esquive® y Blindar® una interacción significativa ($P < 0,05$) entre cultivar × tratamiento, mientras que no se observan diferencias significativas entre cultivares respecto al tratamiento con Vintec®.

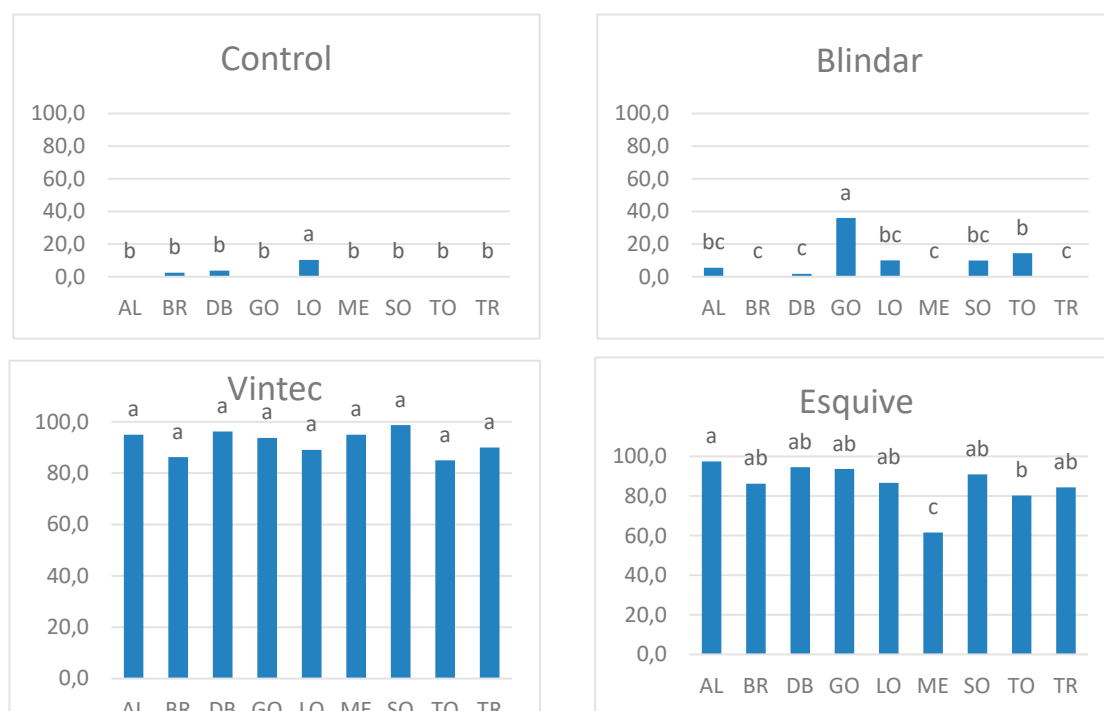


Fig.1. Incidencia media de *Trichoderma* spp. (%) aislado de heridas de poda 2 meses después de que las heridas de poda fueron tratadas con los productos comerciales en base a *Trichoderma*. Blindar® (*Trichoderma asperellum* cepa ICC012 + *Trichoderma gamsii* cepa ICC080, Esquive® (*Trichoderma atroviride* cepa I-1237) y Vintec® (*Trichoderma atroviride* cepa SC1). Medias seguidas de la misma letra no presentan diferencias significativas ($P>0.05$)

Trichoderma atroviride cepa I-1237) presento diferente afinidad entre las variedades Albariño, Mencía y Torrontés. Mientras que no mostro diferencias frente al las restantes variedades analizadas (Brancellao, Dona Branca, Godello, Loureira, Sousón y Treixadura)

Las especies *Trichoderma asperellum* (cepa ICC012) + *Trichoderma gamsii* (cepa ICC080) presentaron mayor afinidad por Godello, y no se implantaron en Brancellao, Mencía, Treixadura y Dona Branca.

4. Conclusiones

Distintos productos basados en agentes de control biológico están siendo comercializados para reducir el uso de sustancias químicas convencionales. Entre estos, tres formulados con el hongo ascomiceto *Trichoderma* están recomendados para su uso en la protección de heridas de poda frente a las EMV. Estudios realizados recientemente muestran variabilidad en los resultados de la eficacia de estos agentes de biocontrol, posiblemente consecuencia del elevado número de factores que pueden afectar a su viabilidad. En este estudio se demuestra que tanto las distintas especies y cepas de *Trichoderma* como la afinidad entre estas y los diferentes genotipos de vid condicionan su implantación y por lo tanto su utilidad en la aplicación en heridas de poda para protección frente a las EMV.



5. Bibliografía

1. ARMENGOL, J. 2013. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Estrategias de manejo. Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal, ISSN 1131-8988, Nº 252, 2013
2. BERTSCH, C.; RAMÍREZ-SUERO, M.; MAGNIN-ROBERT, M.; LARIGNON, P.; CHONG, J.; FONTAINE, F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathology 62(2): 243–265.
3. ESKALEN, A.; FELICIANO A, J.,; GUBLER, W.D.; 2007. Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptoms development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. Plant Disease 91, 1100– 4.
4. GARDES, M.; BRUNS, T.D.; 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. 2, 113–118.
5. GRAMAJE, D.; ÚRBEZ-TORRES, J. R.; SOSNOWSKI, M. R.; 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. Plant Dis. 102, 12–39.
6. HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M., 2004. Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2, 43e56.
7. JHON S., WICKS, T.J.; HUNT, J.S.; LORIMER, M.F.; OAKEY, H. & SCOTT, E.S. 2005. Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harsianum* and *Fusarium lateritium*. Australasian Plant Pathology 34, 569-575
8. PERTOT, I., PRODORUTTI, D., COLOMBINI, A., PASINI, L., 2016. *Trichoderma atroviride* SC1 prevents *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* infection of grapevine plants during the grafting process in nurseries. Biocontrol 61, 257-267.
9. MARTÍNEZ-DIZ, P.M.; DÍAZ-LOSADA, E.; ANDRÉS-SODUPE, M.; BUJANDA, R.; MALDONADO-GONZÁLEZ, M.M.; OJEDA, S.; YACOUB, A.; REY, P.; GRAMAJE, D. 2021. Field Evaluation of Biocontrol Agents against Black-foot and Petri Diseases of Grapevine. Pest Manag. Sci. 77, 697–708.
10. MUTAWILA, C., FOURIE, P. H., HALLEEN, F., & MOSTERT, L. 2011. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. Phytopathologia Mediterranea, 50, S264–S276.
11. URBEZ-TORRES, J.R., GUBLER, W.D., 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. Plant Pathol. 60, 261–270.
12. VERMA M., BRAR S.K., TYAGI R.D., SURAMPALLI R.Y., VALÉRO J.R., 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal 37: 1–20.

6. Agradecimientos

Agencia Estatal de Investigación por la ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2017-2020.

La variedad Listán Prieto en la Comunidad de Madrid: entre el pasado y el futuro

Gregorio Muñoz Organero, Andrés García Díaz, M^a Teresa De Andrés, Alba M^a Vargas,
eMobodega 3reales

*Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA),
Finca El Encín, Ctra. A-2, Km 38,200, 28800 Alcalá de Henares (Spain). Tel. 918879483,
e-mail: gregorio.munoz@madrid.org*

Resumen

La variedad de vid Listán Prieto, también conocida como Mission, de cultivo bien arraigado en las Islas Canarias y en el Nuevo Mundo, ha sido identificada en parcelas viejas de varios municipios de la Comunidad de Madrid y ha despertado interés por parte de algunos viticultores y bodegueros de la región. Se han realizado vinos experimentales y se ha propuesto al Consejo Regulador de la DOP Vinos de Madrid para su inclusión en la misma. Este trabajo resume las características agronómicas y enológicas de esta variedad en la región, así como la importancia histórica de su cultivo en la zona. La maduración tardía de sus uvas, así como su cultivo en tiempos pasados, favorecen que esta variedad se posicione en la región gracias a una adecuada combinación entre tradición e innovación.

1. Introducción

En los últimos años ha crecido el interés por conocer a fondo las denominadas variedades minoritarias, dada la necesidad que muestran las bodegas por distinguir sus productos en un mercado global más competitivo, donde cobra mayor importancia la calidad diferenciada. Dotar al vino de un elemento diferenciador que lo haga reconocible frente a la competencia, puede ser un valor añadido en un mercado global. Así, la idea de un conjunto ecológico constituido por variedad, suelo y clima, se potencia en la elaboración del producto y en su marketing, realzando su singularidad. Esta singularidad que ofrece un producto de calidad diferenciada, además encuentra en estos momentos un sector de público más receptivo que nunca y que, poco a poco, es creciente. Además, se hace necesario el conocimiento de variedades con características de interés que han estado presentes o son residuales en nuestra zona o que podrían estarlo, al complementar y mejorar las características de los vinos actuales.

El Consejo Regulador de la D.O.P. "Vinos de Madrid", lleva años impulsado y realizando prospecciones en viñedos antiguos con la ayuda de bodegas y viticultores. La variedad Listán Prieto es una variedad que se cultivaba en la zona ya en el siglo XV, y así lo muestran los diferentes pies centenarios encontrados en varias parcelas de la D.O.P. Vinos de Madrid y en otras de Comunidades Autónomas limítrofes. Históricamente tiene su importancia porque es una de las primeras variedades de vid que se llevaron a América tras el descubrimiento (Tapia et al., 2007) y que todavía se cultiva en numerosos países del nuevo continente con el nombre de Criolla, entre otros. La sinonimia más conocida de esta variedad es Mission (California), pero tiene otras muchas como Negra Criolla, Rosa del Perú y Negra Corriente (Perú), Criolla Chica (Argentina), País (Chile), Misionera o Negra Criolla (Bolivia), Mision (México), Palomina Negra (España), Listrao (Portugal), Hariri (Marruecos) por citar las más importantes (Cabello et al., 2019).



Alonso de Herrera (1513) menciona y describe la variedad “Palomina Negra” como “una de las variedades cultivadas en el Reino de Castilla”. La describe como “variedad de racimos grandes y sueltos, de maduración tardía y de la que se elaboraban vinos claros y buenos”. En 1807 Rojas Clemente cita el cultivo de Listán Prieto en Andalucía. La describe como “variedad de uvas no muy translúcidas”. García de los Salmenes (1914) cita el cultivo de la variedad Palomina, de uva tinta, en las provincias de Ávila y de Toledo y también en Extremadura. La variedad descrita como Palomina por Alonso de Herrera (1513) y la Palomino Común descrita por Rojas Clemente (1807) coincidirían con la descripción morfológica de Listán Prieto. La Palomina o Palomino Común presenta racimos cónicos muy largos y densidad media, la baya es negra azulada y de maduración tardía. Esta variedad da una gran cantidad de racimos (Zero et al., 2006).

El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento agronómico y enológico de la variedad Listán Prieto que se cultivó sin duda en el pasado en la región de Madrid y limítrofes para ver el interés que tendría recuperarla, por su interés histórico y por la diferenciación y tipicidad que puede aportar a los vinos de la zona.

2. Material y Métodos

El material utilizado en este trabajo para el estudio agronómico y enológico proviene de la colección de variedades de vid de “El Encín”, perteneciente al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) de la Comunidad de Madrid y de dos bodegas de los municipios de Cenicientos y Cadalso de los Vidrios en la D.O.P. Vinos de Madrid.

El suelo de la colección de El Encín (Alcalá de Henares) se caracteriza por un color pardo claro en seco y pardo rojizo en húmedo, textura arcillosa-limosa, sin estructura, ligeramente aglomerado y bastante compacto. Las plantas, de 14 años de edad, están conducidas con poda corta en espaldera mediante un sistema de “cordón simple”. El clima general de Alcalá de Henares es mediterráneo continental, con una temperatura media anual de 13.1°C y una precipitación anual de 434 mm.

Los suelos donde se localizan los viñedos de los agricultores (Cenicientos, Cadalso de los Vidrios) están íntimamente relacionados con la geología del Sistema Central, eminentemente granítica, donde también aparecen gneises y rocas filonianas. El viñedo se asienta en laderas y piedemontes de las inmediaciones de la Sierra, así como en llanuras aluviales. Los pH son ácidos o neutros (entre 5,5 y 7,5), con ausencia total de carbonatos y con una textura franco-arenosa predominante. La altitud de los viñedos está entre los 600 y 800 m sobre el nivel del mar, con una precipitación media anual de 650 mm. El número de horas de sol que se reciben en la zona de producción oscila entre 2.300 y 2.800 horas.

El material prospectado en viñedos de varias regiones se identificó con 26 marcadores microsatélites (Zarouri et al., 2015; y se describió morfológicamente con 67 caracteres (CPVO, 2009; OIV, 2009) coincidiendo completamente con el perfil de las plantas utilizadas para el estudio agronómico y enológico.

Se realizó un seguimiento fenológico utilizando la escala BBCH utilizada para la vid por Rustioni et al. (2014). Cuando las bayas pasan el estado fenológico 85 y el racimo está enverado al 100%, comienza el seguimiento de la maduración del fruto mediante la medida semanal de azúcares en la uva por refractometría. Los vinos se elaboraron según las metodologías



tradicionales de la zona para vinos tintos. Se utilizaron varios tipos de depósitos de fermentación (acero inoxidable, barro y hormigón) y se realizaron crianzas en barricas de roble.

3. Resultados

La variedad Listán Prieto se cultiva actualmente en Canarias (39 ha en 2009) y está autorizada en las Denominaciones de Origen de Abona, El Hierro, Gran Canaria, La Gomera, La Palma, Tacoronte-Acentejo, Valle de Güimar y Valle de la Orotava. Sin embargo, las prospecciones realizadas en viñedos antiguos de la geografía peninsular (Tabla 1) confirman que esta variedad se cultivaba hace mucho tiempo también en bastantes regiones de la meseta castellana, corroborando la información publicada en las citas bibliográficas antiguas (Herrera, 1513; Rojas Clemente, 1807, García de los Salmones, 1914). La figura 1 muestra las ubicaciones donde se ha localizado esta variedad en la península.



Fig. 1: Situación geográfica de localizaciones donde se encontraron plantas aisladas de la variedad de vid Listán Prieto en la Península Ibérica. En algún caso, viñedos completos.

En la Comunidad de Madrid, las cepas localizadas se cultivan en terrenos arenosos y rodeados de Garnachas Tintas, con frecuencia de pie franco con personalidad propia, pues destacan sobre las demás en su gran porte y vigor, dejando colgar racimos de gran tamaño muy abiertos y alargados de colores violeta y morado, a los que les cuesta enverar. Las cepas son fácilmente reconocibles por su sarmiento de color rosado y de porte semierguido. Su potente sistema radicular perfora el suelo en todas direcciones en busca de alimento y sus hojas tienen un importante tamaño. Se han localizado fundamentalmente en viñedos de las subzonas de San Martín de Valdeiglesias y El Molar (figura 2), ambas zonas dominadas por la variedad Garnacha Tinta y por terrenos cercanos al Sistema Central con predominio de suelos arenosos.

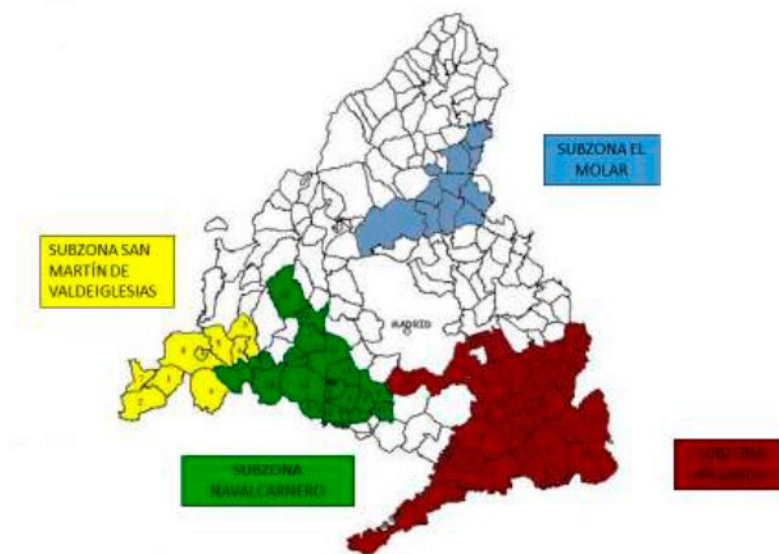


Fig. 2: Localización geográfica de las 4 subzonas en la D.O.P. Vinos de Madrid.

Tabla 1. Plantas de Listán Prieto localizadas en la Península Ibérica.

Provincia/País	Localidad/Región	Nombre muestra	Identificación	Referencia bibliográfica
Madrid	Cenicientos	Huertezuelo	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	Cadalso de los Vidrios	Ratón	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	San Martín de Valdeiglesias	Peña Caballera	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	Colmenar de Oreja	Paraje número dos	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	Villaconejos	Camilo del silo	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	Valdilecha	Main	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	Valdemorillo	Majuelo de la mona	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	Carabaña	La linde	Listán Prieto	IMIDRA
Madrid	Navalcarnero	Barranco Berbique	Listán Prieto	IMIDRA
Cáceres	Valverde de la Vera	Palomina	Listán Prieto	IMIDRA
Cáceres	Valverde de la Vera	Palomina	Listán Prieto	IMIDRA
Granada	Cerro el Quemado	Picuda	Listán Prieto	IMIDRA
Cuenca	Campo de Hellín	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Toledo	Torrijos	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Toledo	Escalona	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Toledo	Talavera de la Reina	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Toledo	Sierra de San Vicente	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Toledo	La Jara	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014



Ciudad Real	Campo de Calatrava	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Ciudad Real	Campo de Daimiel	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Ciudad Real	Campo de San Juan	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Ciudad Real	Tomelloso	Moscatel Negro	Listán Prieto	Mena et al 2014
Navarra	Luquin	Moscatel Negro	Listán Prieto	Urrestarazu et al. 2015
Málaga	Ronda	Ronda 4:2006	Listán Prieto	Jimenez-Cantizano, 2014
PORTUGAL	Algarve	Portimão	Listán Prieto	Cuhna et al 2016
PORTUGAL		Listrão Rs	Listán Prieto	Veloso et al 2010

La variedad responde bien a distintas formas de poda: la poda corta es buena ya que tiende a abrir la planta para su correcta aireación y con podas largas fructifica mejor, teniendo en estos casos que controlar su vigor.

Es una variedad rústica y fuerte, de gran vigor (Tabla 2). En campo vegeta bien y es resistente a las enfermedades habituales, que en esta zona es el oídio. Puede sufrir problemas de corrimiento, al igual que la variedad Garnacha Tinta, cultivada en las mismas zonas y también con gran vigor.

Se comporta bien injertada sobre 110 Richter, uno de los portainjertos más utilizados en la D.O.P. Vinos de Madrid y también con el Rupestris de Lot, utilizado tradicionalmente en la subzona de San Martín de Valdeiglesias.

Precisa de laderas bien soleadas para expresar mejor su potencial vitícola, suelos notablemente ácidos, tierras sueltas y muy arenosas. En suelo muy fértil no madura bien y en suelo arcilloso produce racimos pequeños. Por esta razón se adaptaría mejor su cultivo a las subzonas de San Martín de Valdeiglesias y El Molar, donde precisamente se han encontrado plantas en cultivo.

Tiene buena producción (alcanza con facilidad los 3 kg/cepa), con buen rendimiento en mosto. Los racimos son más grandes que los de la variedad Garnacha Tinta y las bayas son muy frutales y grandes, medianamente ácidas y con poco color.

Las uvas maduran muy tarde, llegando a alcanzar adecuados grados de madurez a finales de octubre, y en alguna ocasión, en noviembre. Esta característica hace la variedad interesante de cara al cambio climático, donde la maduración se verá adelantada por el incremento de las temperaturas. No obstante, se aconseja plantarla en orientaciones soleadas.



Tabla 2. Características agronómicas de Listán Prieto comparándola con otras variedades tintas cultivadas a gran escala en la Región.

	Tempranillo	Garnacha Tinta	Listán Prieto
Producción	Media (2-3 kg/planta)	Media-Alta (4 kg/planta)	Media (2-3 kg/planta)
Fecha de maduración	Temprana	Media	Tardía
Vigor	Medio	Alto	Alto
Sensibilidad a mildiu	Alta	Alta	Alta
Sensibilidad a oídio	Alta	Alta	Media-Baja (menor en racimo que en hoja)

Se han elaborado vinos ligeros, en algunas añadas de alta graduación. Se producen vinos adecuados para crianza con uno o dos años de envejecimiento en bodega de roble y al menos tres meses en botella. La variedad ofrece vinos versátiles que se pueden adaptar a tendencias actuales de elaboración como son los recipientes de barro y de hormigón, donde se han conseguido buenos resultados. El pH de los vinos de Listán Prieto fue adecuado para la conservación en el tiempo y la acidez titulable, que es superior a la encontrada en vinos de la variedad Tempranillo.

Los vinos presentan moderada intensidad de color, con tonos violáceos muy acusados. La intensidad olfativa es persistente y duradera, con aromas limpios y donde llama la atención las notas a menta inusuales en otras variedades. El vino es de fácil entrada y paso por boca, un poco ácido, fresco y sedoso. El sabor recuerda a caramelos de menta y deja un retrogusto agradable a fresa ácida y de persistencia media.

4. Conclusiones

El cultivo de la variedad Listán Prieto, claramente tradicional en la D.O.P. Vinos de Madrid puede resultar de gran interés por su historia, su presencia actual en la región, por la peculiaridad de los vinos elaborados con sus uvas y por su adaptación a las características edafológicas y climáticas. Es de gran importancia la maduración tardía de esta variedad, que le daría mejores posibilidades futuras frente a otras variedades teniendo en cuenta las subidas de temperaturas y golpes de calor producidos por el cambio climático.

5. Bibliografía

1. CABELLO, F., ORTIZ, J. M., MUÑOZ, G., RODRÍGUEZ, I., BENITO, A., RUBIO, C., ... and SÁIZ, R. (2019). **Varietades de vid en España**. Madrid, Comunidad de Madrid and Editorial Agrícola. 2ª Edición.
2. CPVO. 2009. TP/50 **Protocol for distinctness, uniformity and stability test *Vitis L Grapevine***. Community Plant Variety Office.
3. CUNHA, J., IBÁÑEZ, J., TEIXEIRA-SANTOS, M., BRAZAO, J., FEVEREIRO, P., MARTÍNEZ-ZAPATER, J. M., & EIRAS-DIAS, J. E. (2016). **Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms**. *Australian journal of grape and wine research*, 22(3), 504-516.



4. GARCÍA DE LOS SALMONES, N. (1914). **Estudio general de conjunto de las viníferas españolas.** In *Memoria general de las Sesiones del Congreso y Ponencias presentadas. Congreso Nacional de Viticultura celebrado en Pamplona* (pp. 512-534).
5. HERRERA, A.D. 1513. **Agricultura General.** Edición facsimil (1981). Servicio de Publicaciones del Ministerio de Agricultura y Pesca, Madrid.
6. JIMÉNEZ CANTIZANO, A. C. (2014). **Caracterización Molecular del Banco de Germoplasma de vid del Rancho de la Merced.**
7. MENA, A., MARTÍNEZ, J., & FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. (2014). **Recovery, identification and relationships by microsatellite analysis of ancient grapevine cultivars from Castilla-La Mancha: The largest wine growing region in the world.** *Genetic resources and crop evolution*, 61, 625-637.
8. OIV. 2009. **OIV descriptor list for grape varieties and *Vitis* species** (2nd edition). Org Int Vigne Vin.
9. ROJAS CLEMENTE Y RUBIO, S.D. 1807. **Ensayo sobre las variedades de la vid común que vegetan en Andalucía.** Edición facsimil (2002). Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla.
10. RUSTIONI, L., COLA, G., FIORI, S., FAILLA, O., BACILIERI, R., MAUL, E.; MAGHRADZE, D. 2014. **Application of standard methods for the grapevine (*Vitis vinifera* L.) phenotypic diversity exploration: phenological traits.** *Acta Horticulturae*, 1032, 253-260.
11. TAPIA, A.M.; CABEZAS, J.A.; CABELLO, F.; LACOMBE, T.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; HINRICHSEN, P. and CERVERA, M.T. (2007). **Determining the Spanish origin of representative ancient American grapevine varieties.** *American journal of enology and viticulture*, 58(2), 242-251.
12. URRESTARAZU, J., MIRANDA, C., SANTESTEBAN, L. G., & ROYO, J. B. (2015). **Recovery and identification of grapevine varieties cultivated in old vineyards from Navarre (Northeastern Spain).** *Scientia Horticulturae*, 191, 65-73.
13. VELOSO, M., BALEIRAS-COUTO, M. M., FEVEREIRO, P., & EIRAS-DIAS, J. E. (2010). **Base de dados de microsatélites das castas (*Vitis vinifera* L.) utilizadas na produção de vinho em Portugal.** *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 25(2), 53-61.
14. ZAROURI, B., VARGAS, A.M., GAFORIO, L. et al. (2015). **Whole-genome genotyping of grape using a panel of microsatellite multiplex PCRs.** *Tree Genetics & Genomes* 11, 17
15. ZEROLO, J., and CABELLO, F. (2006). **Variedades de vid de cultivo tradicional en Canarias** (Grape Varieties Traditionally Grown in the Canary Islands). *Gobierno de Canarias, Instituto Canario de Calidad Agroalimentaria.*

Modificación del nivel de la relación pámpanos-racimos, antes del envero: efectos vegetativos, productivos y cualitativos, en cv. Verdejo

Jesús Yuste, Daniel Martínez-Porro

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
Ctra. Burgos km.119, 47071 Valladolid. 983 317460. *E-mail: yusbomje@itacyl.es

Resumen

El balance entre cantidad de uva y desarrollo foliar es un aspecto crítico para la composición de la uva. En muchos casos, la limitación del nivel productivo unitario es pretendido como factor principal para alcanzar cotas de alta calidad en el vino, pero se conocen poco los efectos que las operaciones en verde pueden tener en las variedades blancas. Por ello, este trabajo plantea el estudio de la eliminación de la mitad de los pámpanos, con sus racimos, inmediatamente antes del envero, en el cv. Verdejo.

En el periodo 2017-2019, la respuesta del cv. Verdejo, en 110-R, fue estudiada, en Valladolid, a partir de la aplicación, en fase de pre-envero, de los tratamientos experimentales: T, testigo (pámpanos íntegros); DP, despampanado (eliminación de un pámpano de cada pulgar, respetando el otro pámpano). El diseño experimental es en 4 bloques al azar, con parcela elemental de 12 cepas de control, en un viñedo en espaldera vertical, plantado en 2012, podado en cordón Royat bilateral.

El despampanado produjo una reducción drástica de productividad y de desarrollo vegetativo. La reducción de la producción de uva, un 46%, fue debida a la eliminación de la mitad de los racimos, pues el resto de componentes del rendimiento no se vio prácticamente afectado. El peso de madera de poda fue notablemente reducido, un 38%, por la disminución del número de pámpanos, a pesar del aumento del peso del sarmiento. Consecuentemente, el índice de Ravaz se vio ligeramente reducido por el despampanado. El despampanado provocó un ligero aumento de azúcares, pH y potasio, a la par que una leve reducción de la acidez total, el ácido tartárico y el ácido málico. La conveniencia del despampanado cerca del envero, para regular la carga productiva, dependerá de la limitación hídrica que sufra el viñedo y de los componentes cualitativos que se quieran potenciar en la uva.

1. Introducción

El balance entre cantidad de uva y desarrollo foliar es un aspecto crítico para la composición de la uva, ya que el efecto sumidero de la uva frente a la superficie foliar, como fuente de fotosintatos, resulta fundamental, dada la repercusión que dicho balance puede tener en el desarrollo del viñedo y en la composición y la calidad de la uva (Candar et al. 2020). En muchos casos, la limitación del nivel productivo unitario es pretendido como factor principal para alcanzar cotas de alta calidad en el vino, olvidando la importancia que tienen, además de la relación fuente-sumidero, otros factores ambientales y de manejo del canopy (Candolfi-Vasconcelos et al. 1994), los cuales condicionan el transporte y la distribución de los compuestos orgánicos producidos durante la fotosíntesis y la asimilación de nutrientes (Keller et al. 2015).



Una práctica simple utilizada para reducir la carga de cosecha anual es el despampanado (eliminación parcial de pámpanos) de la cepa, que evidentemente reduce el número de racimos de la misma, pero que modifica el nivel de la relación fuente-sumidero, ya que reduce tanto la superficie foliar como el número de racimos, y, por tanto, puede alterar el metabolismo interno de la planta (Kliewer y Dokoozlian 2005). Evidentemente, la reducción neta de la carga de cosecha provocada por el despampanado suele perseguir la modificación de las condiciones de maduración de la uva, tanto a través del efecto en el propio metabolismo de la planta como del efecto en el entorno microclimático (Keller 2015). Sin embargo, la repercusión en los aspectos agronómicos y en la composición de la uva depende de la competencia que se establezca por la recepción de fotoasimilados con los órganos de reserva y el crecimiento vegetativo como sumideros de dichos fotoasimilados (Wisdom y Considine 2022).

La relación funcional entre órganos vegetativos y reproductivos debe ser considerada en el contexto de la influencia de diversos factores, entre los que se incluyen el clima, el suelo, el material vegetal -mayormente la variedad vinífera- y el manejo del viñedo, por lo que el patrón de distribución y almacenamiento de asimilados no puede extrapolarse a todas las situaciones y debe ser abordado con el apoyo de la experimentación en cada explotación vitícola. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el trabajo persigue conocer la respuesta agronómica y cualitativa del viñedo a la eliminación de la mitad de los pámpanos, llevada a cabo en la fase inmediatamente anterior al envero, en el cv. Verdejo, para valorar su posible conveniencia en el manejo del viñedo en las condiciones de cultivo semiáridas del valle del río Duero (España).

2. Material y Métodos

El trabajo se llevó a cabo durante el periodo 2017-2019 en Valladolid (Castilla y León, España). El material empleado es *Vitis vinifera* L., cv. Verdejo, sobre portainjerto 110 Richter, plantado en 2012, con un marco de 2,8 m x 1,4 m (2.551 plantas.ha⁻¹). La orientación de filas es NNE (N+25°). El sistema de conducción es espaldera vertical, mediante cordón Royat bilateral y poda con 4 pulgares de 2 yemas en cada brazo (16 yemas por cepa).

El ensayo experimental consiste en la aplicación de dos tratamientos: T, testigo (mantenimiento de pámpanos íntegros), y DP, despampanado, que consiste en la eliminación de 1 pámpano de cada pulgar, respetando el otro pámpano de dicho pulgar; en la fase inmediatamente anterior al envero. El diseño experimental es en bloques al azar, con 4 repeticiones por tratamiento y parcela elemental de 12 cepas de control, con líneas contiguas a cada lado destinadas al efecto borde.

El cultivo del viñedo se llevó a cabo mediante apoyo de riego deficitario (25% ETo) desde el estado de tamaño guisante hasta la semana anterior a vendimia, aplicado semanalmente mediante goteros separados 75 cm.

El suelo del ensayo (tabla 1) presenta alta pedregosidad (más de 65% de elementos gruesos), lo que le confiere un buen drenaje, con una capacidad potencial de retención de agua estimada en 70 mm / m de profundidad. Es de tipo arcillo-arenoso en el 1^{er} horizonte (20 cm) y franco-arcillo-arenoso en los dos horizontes siguientes (20-100 cm), llano, sin limitaciones físicas ni químicas para el cultivo de viñedo.



Tabla 1. Características físicas de los horizontes presentes en el perfil del suelo del viñedo experimental.

Profundidad (cm)	Elementos gruesos (%)	Textura U.S.D.A.			Clase textural
		Arena	Limo	Arcilla	
0-20	70,7	45,3	19,4	35,3	AcAr
20-45	68,8	47,4	19,5	33,1	FrAcAr
45-100	74,8	61,4	9,5	29,1	FrAcAr

En la tabla 2 aparecen reflejados los datos termopluviométricos del periodo 2017-2019.

Tabla 2. Datos termo-pluviométricos de las campañas 2017, 2018 y 2019, en Valladolid.

T_m, temperatura media (°C): T_{ma}, T_{mc}, T_{mv}; **T_{max}**, temperatura media de máximas (°C): T_{maxa}, T_{maxc}, T_{maxv}; **T_{min}**, temperatura media de mínimas (°C): T_{mina}, T_{minc}, T_{minv}; **P**, precipitación (mm): P_a, P_c, P_v. Los periodos corresponden, según subíndice, a las fechas: **a** (anual): 1-oct/30-sep; **c** (ciclo): 1-abr/30-sep; **v** (verano): 1-jul/30-sep.

Año	T _{ma}	T _{mc}	T _{mv}	T _{maxa}	T _{maxc}	T _{maxv}	T _{mina}	T _{minc}	T _{minv}	P _a	P _c	P _v
2017	13,1	18,9	20,6	20,7	27,5	29,3	6,2	10,5	12,0	262,1	98,2	47,0
2018	12,4	18,0	21,6	19,5	25,9	30,9	6,1	10,8	13,1	521,8	270,2	50,2
2019	12,4	17,6	20,8	19,9	25,7	29,2	5,7	9,8	13,0	302,5	137,4	75,2

Se midieron los parámetros siguientes: peso de madera de poda y número de sarmientos; peso de uva, número de racimos y peso de baya; sólidos solubles totales, pH, acidez total, ácido tartárico, ácido málico y potasio, en mosto. A partir de estos parámetros se calcularon otros parámetros derivados. El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante análisis de varianza con el programa SPSS 16.

3. Resultados

Desarrollo vegetativo

El desarrollo vegetativo, estimado a través del peso de madera de poda (tabla 3), se vio significativamente reducido todos los años por el tratamiento de despampanado, una media del 38%, con respecto al testigo. Esta reducción se debió, lógicamente, a la eliminación de la mitad (48%) de los pámpanos de cada cepa, a pesar de que el incremento del peso del sarmiento compensó parcialmente dicha eliminación, con un aumento del 18%. La reducción del número de sarmientos se produjo mayor y significativamente a través de los sarmientos francos, puesto que la aportación de los chupones, aunque mostró la misma tendencia a la reducción, fue de muy escasa cuantía.



Tabla 3. Madera de poda (kg), N° total de sarmientos, N° de sarmientos francos, N° de chupones, por cepa; Peso de sarmiento (g); Rendimiento en uva (t/ha), N° de racimos por cepa, Peso de racimo (g), Peso de baya (g), N° de bayas por racimo; e Índice de Ravaz, a lo largo del periodo 2017-2019, de los tratamientos T y DP. Nivel de significación estadística: no significativo (-); p<0,05 (*).

	Trat.	Madera Poda	N° Sarm.	N° francos	N° chup.	Peso Sarm.	Rdto.	N° Racimos	Peso Racimo	Peso Baya	N° Bayas	Índice Ravaz
2017	T	0,932	15,7	15,0	0,7	59,4	6,84	20,8	129,2	1,21	107,2	2,89
	DP	0,594	8,2	8,1	0,1	72,7	3,59	11,0	127,2	1,23	103,6	2,44
	Sig.	*	*	*	*	-	*	*	-	-	-	-
2018	T	1,348	15,4	14,6	0,8	87,7	9,38	26,1	140,1	1,96	71,9	2,78
	DP	0,759	8,2	7,9	0,3	93,1	5,09	14,4	136,7	1,93	67,6	2,65
	Sig.	*	*	*	*	-	*	*	-	-	-	-
2019	T	0,940	15,9	15,4	0,4	59,3	10,08	28,0	140,7	1,42	99,3	4,35
	DP	0,631	8,0	7,9	0,1	78,9	5,61	14,6	149,5	1,51	95,2	3,55
	Sig.	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-
Media (2017-2019)	T	1,073	15,6	15,0	0,6	68,8	8,77	25,0	136,7	1,53	92,8	3,34
	DP	0,661	8,1	8,0	0,2	81,5	4,76	13,4	137,8	1,55	88,8	2,88

Producción de uva y componentes del rendimiento

El rendimiento en uva (tabla 3) se redujo drásticamente con el despampanado, una media del 46%, con respecto al testigo, observándose, lógicamente, diferencias estadísticamente significativas todos los años. Las diferencias en producción fueron mayormente debidas a la reducción significativa del número de racimos por cepa, que también disminuyó un 46 % en el tratamiento despampanado con respecto al testigo. El peso del racimo no mostró diferencias entre tratamientos, a pesar de que hubo ligeras variaciones entre los mismos en función del año. Los componentes del tamaño del racimo tampoco mostraron diferencias reseñables entre tratamientos, pues el número de bayas apenas mostró una media ligeramente superior en el testigo mientras que el peso de baya mostró una media ligeramente superior en el tratamiento despampanado, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos en ninguno de los años de estudio. El Índice de Ravaz disminuyó ligeramente, una media del 14%, en el tratamiento de despampanado con respecto al testigo, como consecuencia de la mayor reducción de la producción de uva que del peso de madera de poda, con respecto al testigo.

Composición de la uva

La concentración de sólidos solubles totales (tabla 4) se vio favorecida por el despampanado, con aumento medio interanual de 0,7 °brix con respecto al testigo, aunque las diferencias entre ambos tratamientos solo resultaron estadísticamente significativas en el último año de estudio. El pH del mosto presentó una ligera tendencia al aumento con el despampanado, frente al testigo, que solo resultó significativa en el segundo año de estudio. La acidez titulable mostró cierta tendencia a la reducción en el tratamiento despampanado con respecto al testigo, inversamente relacionada con la tendencia del pH, aunque las diferencias solo resultaron estadísticamente significativas en el segundo año de estudio. El ácido tartárico mostró una tendencia similar a la acidez titulable, aunque con diferencias de menor cuantía. Asimismo, el ácido málico también se vio ligeramente reducido por el despampanado con respecto al testigo. Las diferencias entre ambos tratamientos no fueron estadísticamente



significativas en ninguno de estos dos parámetros, aunque mantuvieron la tendencia entre tratamientos a lo largo del periodo de estudio. El contenido de potasio en uva mostró una tendencia general al aumento en el tratamiento despampanado frente al testigo, que a pesar de no ser de gran cuantía presentó diferencias estadísticamente significativas en el primer año y el último año de estudio.

Tabla 4. Sólidos solubles totales (S.S.T., °brix), pH, acidez titulable (Ac. total, g TH₂/L), ácido tartárico (g/L), ácido málico (g/L) y potasio (ppm), a lo largo del periodo 2017-2019, de los tratamientos T y DP. Nivel de significación estadística: no significativo (-); p<0,05 (*).

		S.S.T.	pH	Ac. total	Ac. tartárico	Ac. málico	Potasio
2017	T	24,0	3,66	4,55	8,31	1,12	1933
	DP	24,3	3,67	4,46	8,30	1,09	2053
	Sig.	-	-	-	-	-	*
2018	T	23,1	3,48	5,09	6,69	2,21	1685
	DP	23,5	3,58	4,30	6,30	1,97	1727
	Sig.	-	*	*	-	-	-
2019	T	22,5	3,29	5,72	7,27	1,48	1338
	DP	23,9	3,32	5,37	7,12	1,33	1413
	Sig.	*	-	-	-	-	*
Media (2017-2019)	T	23,2	3,47	5,12	7,42	1,60	1652
	DP	23,9	3,52	4,71	7,24	1,46	1731

4. Conclusiones

El despampanado aplicado justo antes del envero produjo una disminución significativa del desarrollo vegetativo, reduciendo un 38% el peso de madera de poda con respecto al testigo, que fue debida a la eliminación de la mitad de los pámpanos, a pesar del incremento de un 18% del peso del sarmiento. Así, el despampanado pudo suponer cierta reducción de estrés hídrico al viñedo durante la fase de maduración, al disminuir notablemente la superficie foliar del mismo.

La producción de uva se redujo drásticamente a través del despampanado, una media del 46%, con respecto al testigo, debido mayormente a la reducción significativa del número de racimos por cepa. Sin embargo, el peso del racimo no mostró diferencias entre tratamientos, a pesar de que hubo ligeras variaciones entre los mismos en función del año. En este sentido, no se constataron diferencias reseñables en los componentes del tamaño del racimo, entre tratamientos, pues tanto el número de bayas como el peso de baya apenas mostraron valores medios ligeramente superiores en el testigo y en el despampanado respectivamente. El Índice de Ravaz disminuyó ligeramente a través del despampanado con respecto al testigo, como consecuencia de la mayor reducción de la producción de uva que del peso de madera de poda.

El despampanado favoreció la concentración de azúcares, con aumento medio interanual de 0,7 °brix, y, aunque más leve, del contenido en potasio, con respecto al testigo. Asimismo, el pH del mosto mostró una ligera tendencia al aumento debida al despampanado, mientras que la acidez titulable presentó cierta tendencia a la reducción, inversamente relacionada con la tendencia del pH, a la par que el ácido tartárico presentó un comportamiento similar a la acidez titulable, aunque con diferencias entre valores de menor cuantía. El ácido málico también se vio ligeramente reducido a través del despampanado con respecto al testigo.



En definitiva, atendiendo a los resultados observados, la conveniencia de aplicación de despampanado cerca del envero, para regular la carga productiva, dependerá de la limitación hídrica que sufra el viñedo y de los componentes cualitativos que se quieran potenciar en la uva.

5. Bibliografía

1. CANDAR S., BAHAR E., KORKUTAL I. 2020. **Impacts of leaf area on the physiological activity and berry maturation of Merlot (*Vitis vinifera* L.)**. Applied ecology and environmental research 18(1): 1523-1538.
2. CANDOLFI-VASCONCELOS M.C., CANDOLFI M.P., KOBLET W. 1994. **Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L.** Planta 192: 567-573.
3. KELLER M. 2015. **The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology**. Ed. Elsevier. 509 p.
4. KLIEWER W.M., DOKOOZLIAN N.K. 2005. **Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality**. American Journal of Enology and Viticulture 56: 170-181.
5. WISDOM J.M., CONSIDINE J.A. 2022. **Whole-vine resources modify within-vine relationships between growth parameters and metabolites in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon**. Oeno One 56(3): 205-217.

6. Agradecimientos

La elaboración de este trabajo ha sido posible a través del apoyo de los proyectos RTA2014-00049-C05-01 y PID2019-105039RR-C42 y fondos FEDER de la Junta de Castilla y León, con la colaboración de compañeros de la Estación Enológica del ITACYL.

¿Podemos utilizar gemelos digitales para aprender/enseñar a podar?

Mónica GALAR¹, Luis Gonzaga SANTESTEBAN¹, Nazareth TORRES¹, Bárbara SEBASTIÁN², Julián PALACIOS², Carlos MIRANDA¹

¹Dpto de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Universidad Pública de Navarra (UPNA), Campus Arrosadía, 31006 Pamplona, Navarra

²Viticultura Viva S.L., C/ 13 de septiembre, 3. 31495 San Martín de Unx, Navarra

Resumen

La docencia y el aprendizaje de la poda de la vid son procesos que presentan numerosos desafíos, por la necesidad de realizar buena parte de la misma en condiciones de campo y por estar limitada al periodo de reposo de esta planta, lo que no siempre es compatible con las necesidades logísticas de la enseñanza. Por ello, debemos considerar las opciones que nos proporcionan las nuevas tecnologías, ya que la digitalización en el ámbito de la enseñanza ha venido para quedarse. En este sentido, la utilización de los denominados “gemelos digitales” puede ser una herramienta para mejorar la experiencia de la enseñanza y aprendizaje en poda. En este trabajo se recogen los primeros resultados conocidos a nivel internacional sobre el potencial del uso de gemelos digitales como herramienta para la enseñanza de la poda de la vid. En concreto, presentamos los resultados obtenidos cuando se utilizó esta metodología para evaluar los conocimientos adquiridos por los asistentes a dos jornadas de formación en poda en las que, previamente, se habían impartido unas charlas sobre poda con metodologías docentes tradicionales. Los gemelos digitales consistían en reproducciones en 3D de estructuras de poda (pulgares), sobre los que se presentaban 3 opciones de poda ejecutados virtualmente. Para evaluar el aprendizaje, los asistentes a las jornadas debían escoger en 6 supuestos (6 gemelos digitales de pulgares) cuál de las 3 opciones de poda era la más adecuada y justificarlo.

1. Introducción

La revolución digital genera continuamente nuevos términos que se convierten en frases y clichés icónicos, a menudo de corta duración. En los últimos 10 años, términos como *cloud computing*, plataformas, *big data*, ciudades inteligentes, *machine learning*, inteligencia artificial, y se han acuñado para describir las modas recientes en computación y comunicación, impulsando cada vez más la automatización de la sociedad. El último término que se añade a este arsenal es el “gemelo digital” o *digital twin* (Batty, 2018).

El concepto de gemelo digital se propuso por primera vez hace 15 años, y desde entonces, varias disciplinas han adoptado gemelos digitales, como la industria de la fabricación y el diseño de productos, ya que puede ayudar a los fabricantes a reducir los costos y mejorar la calidad al optimizar los procesos de producción y diseño. Este concepto también se está utilizando en la gestión de la salud, donde los gemelos digitales pueden ayudar a los médicos a predecir el comportamiento de enfermedades y terapias en pacientes (Pylianidis et al., 2021). En resumen, el gemelo digital es un término relativamente nuevo en el ámbito de la tecnología y la industria, pero ha demostrado ser una herramienta útil para la simulación y predicción en una variedad de disciplinas. A medida que la tecnología continúa avanzando, es probable que sigamos viendo un mayor uso de los gemelos digitales en diferentes campos y aplicaciones. Concretamente, el



progreso de la ciencia y la tecnología tiene un impacto en el campo de la educación todo el tiempo, lo que conlleva a un cambio constante en su forma de transmisión. (Zhou & Wu, 2022). Si bien es cierto que existen varias definiciones para los gemelos digitales, entre ellas se encuentra la definición que propone Tao et al., (2019) destacando la idea de que los gemelos digitales son una herramienta que conecta los mundos físicos y virtuales. En otras palabras, un gemelo digital puede utilizarse para representar un objeto o proceso físico en el mundo virtual, y proporcionar información sobre su estado y comportamiento en tiempo real.

En el caso presentado en este trabajo, lo que se pretende conseguir con esta herramienta es facilitar la comprensión, y el aprendizaje de la poda de la vid, ya que se trata de la práctica de cultivo más compleja en el viñedo, que requiere conocer muy bien la fisiología de la planta y los objetivos que nos marcamos con la poda. Además, su ejecución requiere de la visualización tridimensional de los objetos que tienen que ser podados (pulgares o varas), los cuales son complejos desde el punto de vista tridimensional y, además, es necesario visualizar bien muchos detalles, como las yemas o el giro que toman los sarmientos, para poder decidir correctamente dónde y cómo ejecutar los cortes. Por si todo lo anterior no fuera suficiente, la dificultad de la enseñanza de la poda es aún mayor, ya que la observación y el aprendizaje de la poda solo puede hacerse en invierno, lo que limita las posibilidades de formación fuera de este periodo. Además, las condiciones medioambientales pueden no ser las mejores el día del curso: lluvia, falta de luz natural... o, incluso siendo todas las circunstancias favorables, resulta complejo enseñar en detalle en el campo a un número superior a seis u ocho estudiantes.

Como se ha destacado previamente, en términos generales, un gemelo digital es un modelo virtual diseñado para reflejar con precisión un objeto físico, y cuando hablamos de gemelos digitales en nuestra rama de estudio, nos estamos refiriendo a modelos virtuales que permitan representar de manera fiel las estructuras a podar (pulgares o varas), las cuales han sido previamente digitalizadas tridimensionalmente en campo mediante escaneo.

2. Material y Métodos

Para crear los gemelos digitales es necesario contar con un escáner 3D que permita capturar la información necesaria para generar la representación virtual. La elección del escáner 3D dependerá de las necesidades específicas de cada proyecto y las características del objeto o proceso que se desea simular. En el caso de la poda de la vid, es importante contar con un escáner 3D que sea capaz de capturar con alta precisión y resolución la estructura de la vid y las diferentes técnicas de poda. En nuestro caso, el equipo utilizado fue el Artec Space Spider, ya que es un escáner 3D de alta resolución que puede capturar objetos pequeños con gran precisión y colores brillantes, lo que puede ser útil para capturar la estructura de la vid y los detalles de las diferentes técnicas de poda.

En este estudio se desarrollaron seis gemelos digitales que simulaban situaciones reales de poda de vid. Para ello, se capturaron seis pulgares antes de podar en un viñedo de San Martín de Unx. Una vez realizada la captura en campo, los modelos obtenidos se procesaron para convertirse en una representación virtual que pueda ser utilizada en la simulación. Para ello se empleó el software Artec Studio, que permite, además de apoyar en la captura del escaneo en campo, procesar todas las imágenes hasta convertirlas en un objeto 3D o gemelo digital. (Artec3d, 2023)

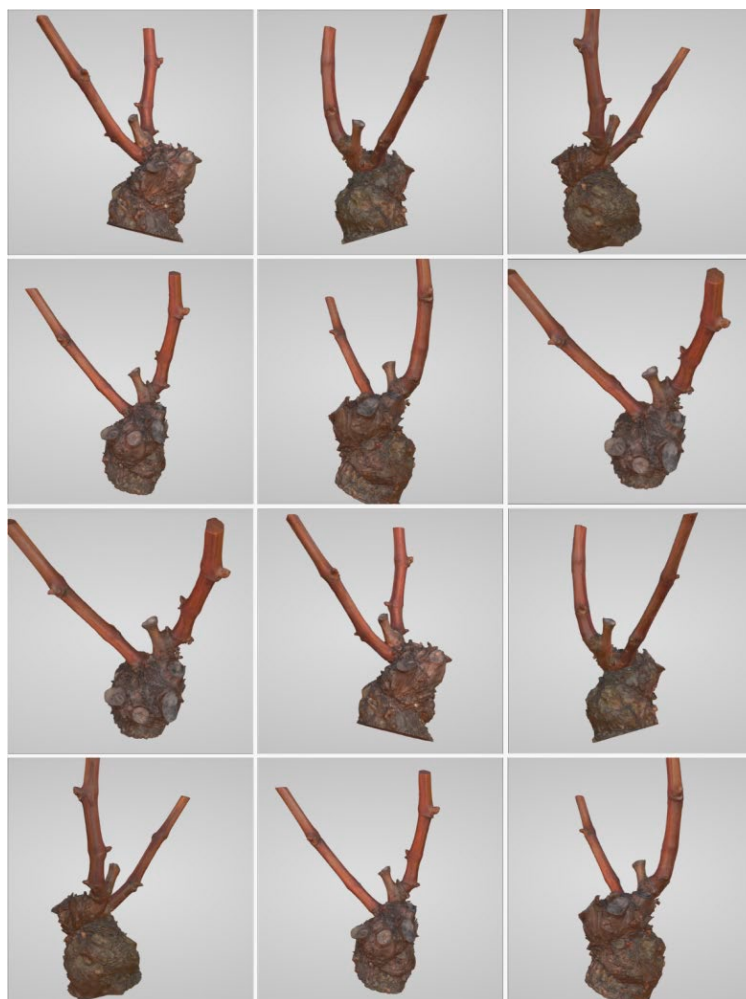


Fig 1. Ejemplo de un gemelo digital

Esta metodología se presentó en dos cursos prácticos de poda de vid en Madrid y Pamplona, donde asistieron más de 25 personas a cada uno de ellos, la mayoría de ellos técnicos de viticultura o viticultores profesionales. Durante la formación, se combinaron diferentes metodologías, incluyendo aula, campo, vídeos y gemelos digitales. Los modelos digitales se emplearon para, en la parte final de la jornada, evaluar el aprendizaje. Para ello, utilizando la plataforma docente MiAulario, se preparó un examen en el que, para cada uno de los seis pulgares escaneados a modo de gemelo digital, se presentaban, también como modelo tridimensional, tres respuestas que recogían tres modalidades de poda para cada uno. Los participantes pudieron observar las distintas situaciones de poda, evaluar cuál sería la mejor opción y ver la estructura podada una vez realizados los cortes, teniendo que seleccionarla y explicar en un campo de texto libre las razones de su elección. Al finalizar la actividad, se realizó una evaluación de la experiencia y del interés de la metodología de los gemelos digitales por parte de los estudiantes. La formación fue llevada a cabo en colaboración con la Escuela de Innovación del Vino, la Plataforma Tecnológica del Vino y la empresa Viticultura Viva.



3. Resultados

A continuación, se presentan las respuestas de los asistentes juntos con las preguntas que se les planteó al finalizar ambos cursos de poda

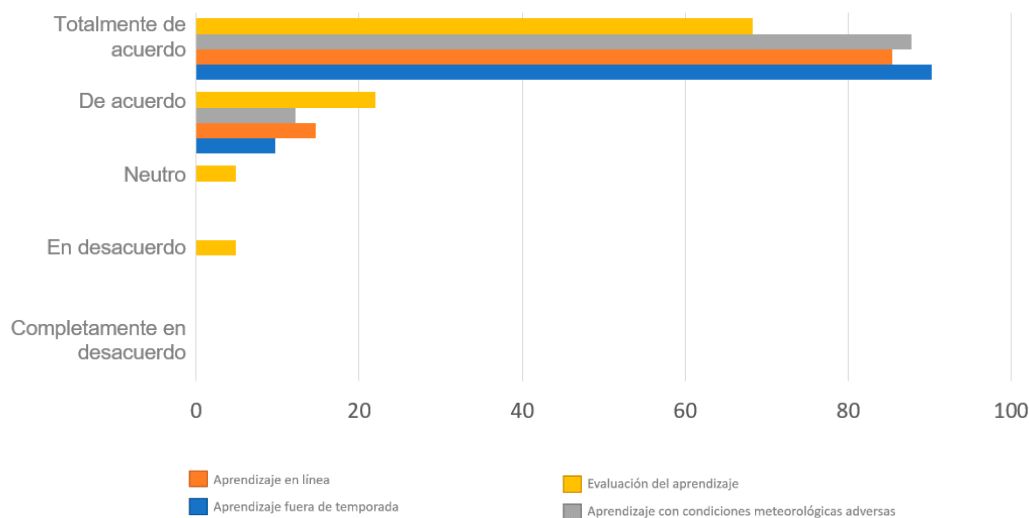


Fig 2. Respuestas de los asistentes a la pregunta “Considero que los gemelos digitales son un recurso didáctico interesante para...”

La mayoría de ellos (Fig. 2) estuvo de acuerdo en que los gemelos digitales son un recurso didáctico interesante para aprender online, cuando las condiciones climáticas no lo permiten o cuando nos encontramos fuera de la temporada de poda. Además, aunque hubo algunas diferencias en cuanto a su utilidad para evaluar el aprendizaje, el 90% de los asistentes estuvieron de acuerdo en que los gemelos digitales son útiles para esta tarea.

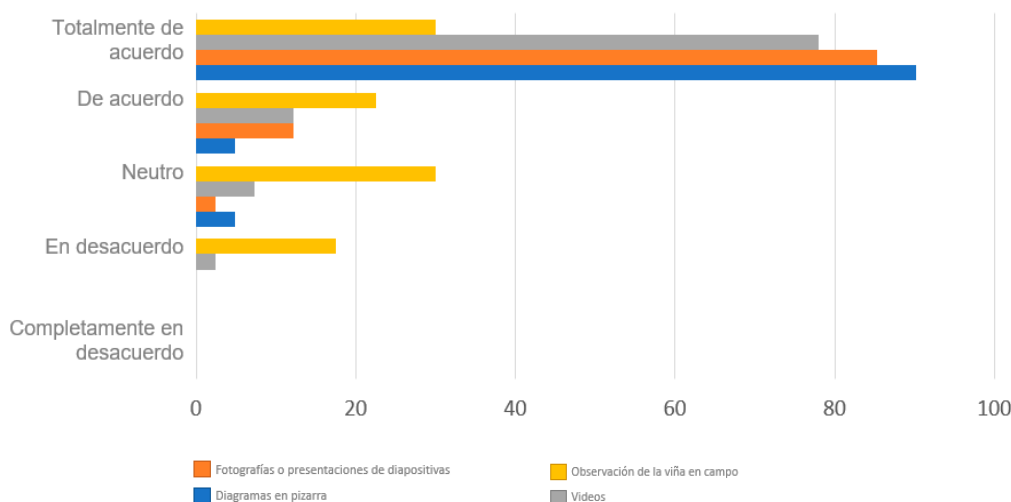


Fig 3. Respuesta de los asistentes a la pregunta “Considero que los gemelos digitales mejoran la experiencia de aprendizaje con respecto a...”



Los resultados (Fig. 3) indican que el 50% de los asistentes estuvieron de acuerdo en que los gemelos digitales mejoran el aprendizaje en comparación con la observación en campo, mientras que el 30% tuvo una opinión neutral y menos del 20% estuvieron en desacuerdo. Además, la mayoría de los asistentes estuvo de acuerdo en que los gemelos digitales son útiles para mejorar el aprendizaje con respecto a otras áreas. Es importante destacar que los gemelos digitales pueden complementar y enriquecer la experiencia de aprendizaje, pero no necesariamente reemplazar la observación en campo, ya que ambas formas de aprendizaje pueden ser importantes y complementarias.

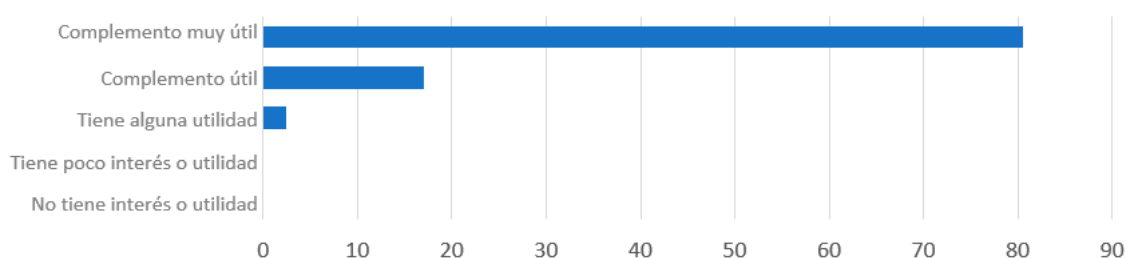


Fig 4. Respuestas de los asistentes a la pregunta “Considero la evaluación general como instrumento de capacitación”

En cuanto a las respuestas obtenidas en la tercera pregunta (Fig. 4), se puede observar como todos ellos consideraron útil o muy útil dicho complemento.

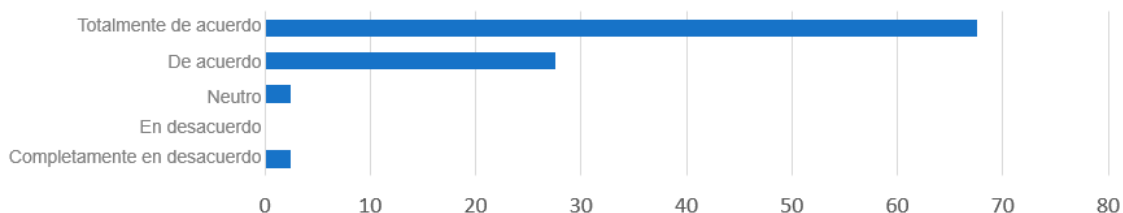


Fig 5. Respuestas de los asistentes a la pregunta “Considero que este recurso es una herramienta útil para la formación del personal técnico de mi empresa o institución”

Por último, es interesante saber que los asistentes a ambos cursos consideraron que los gemelos digitales son una herramienta útil para la formación de personal técnico (Fig. 5). En dichas formaciones, los gemelos digitales pueden ser utilizados para enseñar a los estudiantes cómo funcionan los sistemas y procesos, y cómo solucionar problemas en situaciones reales. Esto permite a los estudiantes practicar en un entorno seguro y controlado, y adquirir habilidades técnicas de manera más efectiva.

4. Conclusiones

A pesar de la diversidad de los conocimientos previos sobre la poda entre los asistentes, todos consideraron de manera muy positiva la utilización de esta herramienta. La utilización de gemelos digitales para la enseñanza puede ser una herramienta valiosa para mejorar la experiencia de aprendizaje de los estudiantes. En el caso de la poda de la vid, los gemelos digitales pueden representar estructuras de poda en 3D, lo que permite a los estudiantes explorar la



estructura y comprender mejor cómo se deben realizar las diferentes técnicas de poda. Además, los gemelos digitales pueden ser utilizados en cualquier momento, independientemente de la temporada de poda, lo que permite a los estudiantes practicar y aprender en cualquier momento del año.

Los asistentes encuestados valoraron que, aunque esta metodología no puede nunca sustituir al 100% a la experiencia de ver una cepa en condiciones de campo, resulta de mucha utilidad como complemento formativo para estudiantes como para la impartición de cursos a cuadrillas de poda y técnicos de campo. Esto sugiere que los gemelos digitales pueden ser una herramienta valiosa para complementar las metodologías docentes tradicionales y mejorar la experiencia de aprendizaje de los estudiantes.

5. Bibliografía

1. ARTEC3D. 2023. **Escáneres 3D profesionales**. <https://www.artec3d.com/es>.
2. CHRISTOS (PYLIANIDIS, C.); SJOUKJE (OSINGA, S.); IOANNIS N. (ATHANASIADIS, I.N.) 2021. **Introducing digital twins to agriculture**. Computers and Electronics in Agriculture.
3. FEI (TAO, F.); FANGYUAN (SUI, F.); ANG (LIU, A.) et al. 2019. **Digital twin-driven product design framework**. International Journal of Production Research, vol. 57, no. 11-12, pp. 3935–3953.
4. MICHAEL (BATTY, M.). 2018. **Digital twins**. Environment and Planning B: Urban Analytics and City Science, 817-820, 45(5).
5. XUEYUN (ZHOU, X.); XINLING (WU, X.). 2022. **Teaching Mode Based on Educational Big Data Mining and Digital Twins**. Computational Intelligence and Neuroscience, 1-13.

6. Agradecimientos

El trabajo realizado fue posible gracias al proyecto Escuela de Innovación del Vino de la Plataforma Tecnológica del Vino (PTV), surgido de la necesidad identificada de fomentar y potenciar la formación del sector vitivinícola nacional acerca de las nuevas herramientas digitales y tecnologías disponibles actualmente en el mercado. Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el marco del programa del PERTE de Digitalización.

Y por último, transmitir nuestro agradecimiento a la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Biociencias (ETSIAB) perteneciente al Campus de Arrosadía de la Universidad Pública de Navarra en Pamplona, y al Centro Integrado de Formación Profesional (CIFP) Escuela de la Vid en Madrid, por la cesión de sus instalaciones y por su disposición e interés a ayudarnos a ampliar el alcance de nuestras formaciones.

Polilla del racimo 20 años de seguimiento de la plaga en Navarra

Carmen Goñi*, José Félix Cibriáin**, Julen Onieva**

*INTIA S.A., Avd Serapio Huico nº 22 31610 Villava (Navarra). 650 67 58 81. cgoni@intiasa.es

**Sección de Viticultura y Enología- EVENA del Departamento de Desarrollo Rural y Medio Ambiente de Gobierno de Navarra, C. del Valle de Orba, 34, 31390 Olite, Navarra.

Resumen

La polilla de la vid *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller, 1775 es la plaga más importante del viñedo causando daños importantes en las producciones, fundamentalmente indirectos en forma de botritis. El monitoreo de la plaga, mediante el empleo de trampas de feromona, permite obtener información sobre la dinámica poblacional de la plaga, así como determinar el momento más adecuado para la aplicación de las posibles estrategias para su control.

En Navarra se dispone de una red de monitoreo de la plaga que lleva registrando datos desde hace casi 20 años, en base a cuyos datos se han definido tres zonas de comportamiento de la plaga. Esta red está formada por técnicos y agricultores que gestionen en torno a 45 puntos anuales.

En esta publicación se realiza el análisis comparativo de la campaña 2022 con respecto a la serie de datos histórico por zonas, así como la tendencia, en el comportamiento de la plaga, en estos 20 años, probable consecuencia del cambio climático.

1. Introducción

La polilla del racimo, *Lobesia botrana*, es una de las principales plagas que afecta a los viñedos. Extendida por toda Europa meridional, norte de África, Próximo Oriente y Sur de Sud América. En España en 1926 señala como extendida en Barcelona, en Orense en 1927 y sucesivamente en Almería Alicante, Lérida, Tarragona, Badajoz, Toledo y Ávila. En 1933 se comprueba su presencia en León, Lugo y Pontevedra. Actualmente está presente en toda la península.

Los adultos presentan unos 6 mm de longitud y 12 mm de envergadura alar. Las hembras ponen entre 50 y 80 huevos de forma aislada. Los huevos son aplanados y tienen forma lenticular, de unos 0,8 mm de diámetro. Su coloración va cambiando de transparente hasta amarillo a medida que van madurando y previo a su eclosión se observa la larva con la cabeza oscura. Las orugas son de color verdoso y pasan por 5 estadios larvarios evolucionando de 1 mm al nacer hasta alcanzar el centímetro antes de crisalidar. La crisálida es de color marrón y está protegida por una envoltura algodonosa y se suelen encontrar en el suelo, en la corteza de las cepas o en los racimos.

En Navarra, presenta tres generaciones anuales pudiendo llegar a una cuarta en función de las condiciones climáticas de final del verano y de la zona geográfica (Ribera Baja). Pasa el invierno en forma de crisálida en la corteza de las cepas, en el suelo, etc. En primavera los adultos



emergen de forma escalonada e inician el vuelo dando lugar a la primera generación. Estos adultos realizan las puestas sobre la corola o las brácteas de los botones florales. Las larvas de esta primera generación se comen los botones florales, flores e incluso bayas recién cuajadas, no suponiendo, en general, un daño importante para el cultivo. La segunda generación comienza a volar hacia mediados del mes de junio (cuajado) siendo más agrupado y la tercera, a principios de agosto (envero). Los adultos realizan las puestas en las bayas y, una vez eclosionados, las larvas roen los granos o penetran realizando galerías. Estos daños directos no son los más importantes, son los daños indirectos, sobre todo en la tercera generación, los que pueden ser más graves puesto que son vía de entrada hongos que causan podredumbres, especialmente botrytis, afectando a la producción y a la calidad final.

2. Material y Métodos

Red de monitoreo en Navarra

Para poder conocer la dinámica de la población de la plaga y poder realizar una correcta aplicación de los diferentes métodos de lucha existente contra la polilla del racimo, es preciso conocer el ciclo de la plaga mediante una red de monitoreo y disponer de un sistema de análisis. Además, es necesario un sistema de comunicación o de difusión ágil de esta información.

Desde el año 2005 en Navarra existe una red de monitoreo y seguimiento de la polilla del racimo gracias a cuyo trabajo se dispone de una gran cantidad de datos con los que poder determinar, en cada momento y en cada zona de producción el momento más adecuado para realizar el control de la plaga, así como para poder analizar y determinar el comportamiento de la plaga en la Comunidad.

Esta red de monitoreo, coordinada desde la Sección de Viticultura y Enología del Gobierno de Navarra (EVENA), está integrada por agricultores, personal técnico de bodegas, personal técnico de la administración y de empresas públicas. Está compuesta por 20 colaboradores que gestionan en torno a 45 trampas anuales. Colocan las trampas, realizan la revisión y conteo semanal de las trampas, se encargan del mantenimiento de las trampas y reportan los datos de las capturas a la Estación de Avisos.

Tras casi 20 años de seguimiento de la polilla se ha zonificado el comportamiento de la plaga y se está trabajando con tres zonas de comportamiento homogéneo para la plaga (ver figura 1). Cada una de las trampas de monitoreo está adscrita a una zona y en base a los datos registrados se emiten los correspondientes avisos y recomendaciones que son diferentes en fechas en función de la zona.

Desde el año 2017 en Navarra se cuenta con la herramienta web “Estación de Avisos” coordinada por INTIA (Instituto Navarro de Tecnologías e Infraestructuras Agroalimentarias SA). Con este sistema se gestiona toda la información sanitaria de los cultivos producidos en Navarra. Con esta herramienta de carácter público, el personal técnico y colaboradores realizan el registro de los datos de las capturas de las trampas de monitoreo. A través de visor de la Estación de Avisos esta información se muestra a todo el sector, incluyendo el análisis de la información sobre la situación de una plaga en unas diferentes zonas y en diferentes momentos (gráficos o recomendaciones de actuación). Ver figura 2



3. Resultados

Tal y como se ha mencionado anteriormente el análisis de la información disponible en estos casi 20 años de monitoreo ha permitido definir 3 zonas de comportamiento de la polilla del racimo diferentes en Navarra. **Zona 1 - Ribera Baja, Zona 2 - Ribera Alta y Zona 3 - Zona Montaña.**

Se analiza en cada zona la campaña 2022 y un pequeño resumen de la serie de los 20 años de capturas.

Zona 1 – Ribera Baja

En esta zona se realiza el seguimiento de 11 trampas de monitoreo. En la figura 3 se muestra la media de capturas en 2022 de las 11 trampas con respecto a los datos medios históricos de todas las trampas en esa misma zona.

Capturas desde la semana 14 (principios de abril) hasta la semana 34 (finales de agosto). La curva de vuelo ha marcado muy bien la primera generación, no así la segunda y tercera en las que ha habido cierta confusión entre el final y el inicio de cada una de ellas respectivamente.

En 2022 ligero retraso en el inicio del vuelo de la plaga (1ª generación), semana 14 (2 de abril) con un pico de capturas retrasado entre una y dos semanas. Final de la generación a finales de mayo-principios de junio. La segunda generación comenzó a principios de junio y se caracterizó por la rapidez en su desarrollo, prácticamente en tres semanas volaron todos los adultos con un pico de vuelo más alto que en lo recogido en los datos históricos y adelantado una semana. Final de este segundo vuelo a principios de julio con lo que este ciclo duró 5 semanas frente a las 7 semanas de media del histórico. Tercer vuelo de la plaga a partir del 10 de julio con niveles ligeramente inferiores. En base a los modelos de predicción se estima que hubo inicio de la cuarta generación.

Con respecto a los datos de la serie histórica en la campaña 2022 se ha observado una disminución en torno a un 50% de las capturas totales de la plaga en esta zona. Destaca también el aumento de las capturas del pico de vuelo en 2ª generación (20%) mientras que en 3ª generación se ha producido un descenso del 30%. Otro aspecto relevante y diferenciador del comportamiento de la plaga en esta campaña ha sido el hecho de que los picos de vuelo de segunda y tercera generación suelen ser muy similares en cuanto a cantidad. Sin embargo, en esta campaña no se ha cumplido, en tercera generación el pico de vuelo ha descendido en un 42% con respecto al pico de la segunda. Destaca también el aumento en un 83% del pico de segunda con respecto al de primera generación frente al 38% en la serie histórica. Ha ocurrido también que mientras, las capturas totales en tercera generación aumentaban en un 38% aproximadamente con respecto a las de segunda, en este año 2022 se ha producido un ligero descenso de las mismas. Las temperaturas extremas durante el verano, así como la ausencia de lluvias en 2022 pueden estar detrás de esta variación en el comportamiento de la plaga.

Zona 2 – Ribera Alta

Seguimiento de 18 trampas de monitoreo con cuyos datos, tal y como se observa en la figura 4 la curva de vuelo en 2022 las tres generaciones han estado muy bien marcadas y siguiendo, más o menos, el patrón del histórico.



Registro de las primeras capturas en la semana 16 (mediados de abril) y final de seguimiento del vuelo en la semana 35 (finales de agosto).

En 2022 ligero retraso en el inicio del vuelo (mediados de abril) lo que provocó un desplazamiento hacia la derecha de la primera generación, con un nivel de capturas inferior. Adelanto muy importante de la segunda generación (inicio a principios de junio) con menor nivel de capturas y con un pico muy elevado que se produjo en la semana 25 (mediados de junio) de forma muy rápida prácticamente en el inicio de este vuelo. En esta zona no se ve tan marcada el acortamiento de la segunda generación, destaca sobre todo la rapidez de desarrollo y el pico inicial. Tercera generación con comienzo en la semana 30 (23 de junio) y también menor cantidad de capturas. Probablemente inicio de vuelo de una cuarta generación.

Con respecto a los datos históricos destaca, en la campaña 2022, la disminución en torno a un 55% de la presión total de la plaga en esta zona. Hecho que se ha producido en las tres generaciones siendo la tercera en la que mayor disminución se ha constatado (75%). Las capturas en los picos en los tres vuelos han seguido comportamientos diferentes: mantenimiento en primera, aumento del 50% en segunda y disminución del 50% en la última generación controlada.

Se observan también en esta zona las diferencias importantes en el comportamiento de los picos de capturas producidos entre las diferentes generaciones. Descenso del 68% de las capturas entre el pico de segunda generación y el de tercera, frente a los niveles similares que marca la curva de históricos. Destaca aún más en esta zona la diferencia de comportamiento en los picos entre primer y segundo vuelo: incremento de 128% en 2022 frente al 50% de media en los años de registro.

Con respecto a las capturas según las generaciones se observan también diferencias de comportamiento en esta campaña. Mientras que en la serie histórica el total de capturas de primera y segunda generación eran muy similares, en la campaña 2022 ha habido un incremento del 48% de capturas. En el caso de comparar las capturas entre segunda y tercera generación en tercer vuelo aumentan un 48% mientras que en la campaña 2022 las capturas han disminuido un 53%.

Zona 3 – Zona Montaña

Seguimiento de 9 trampas con capturas en 2022 desde la semana 17 (finales de abril) hasta la semana 39 (finales de septiembre) con las tres generaciones bien marcadas (figura 5). Destaca el retraso con el consiguiente desplazamiento de 3 semanas de la primera generación. Se observa también la curva de vuelo de la segunda generación con un pico al principio del vuelo y adelanto en el desarrollo de la tercera generación en una-dos semanas.

Retraso de dos semanas en el inicio del vuelo (última semana de abril) lo que provocó un desplazamiento hacia la derecha de la primera generación, con un nivel de capturas inferior. Inicio de la segunda generación muy similar en cuanto a fechas (mitades de junio), si bien destaca que el inicio del vuelo coincide con el pico de la generación. Las capturas en esta segunda generación también inferiores y no se observa que esta segunda generación haya sido más corta. Tercera generación que comienza en la semana 32 (principios de agosto) con el pico adelantado un par de semanas y menor presión de plaga.



Al igual que en el resto de zonas destaca, en esta campaña 2022, la disminución en torno a un 40% de la presión total de la plaga que se ha producido en las tres generaciones. A diferencia de lo sucedido en las otras dos zonas de seguimiento, en esta zona el pico de la segunda generación no ha destacado por el incremento en el número de capturas, en este caso hay un descenso del 16% de adultos capturados en el pico de vuelo.

No se observan en esta zona las diferencias importantes entre los picos de vuelo producidos en las tres generaciones que se veían claramente en las otras dos áreas. Mencionar el descenso del 25% de capturas entre el pico de primera y segunda generación que se ha producido en 2022 mientras que en los registros históricos se mantienen similares. Con respecto a las diferencias de capturas entre generaciones la mayor diferencia se encuentra entre la segunda y tercera que, según los históricos, aumenta un 18% mientras que en la campaña 2022 se ha mantenido similar.



Fig. 1. Mapa de Zonificación Comportamiento Polilla del Racimo

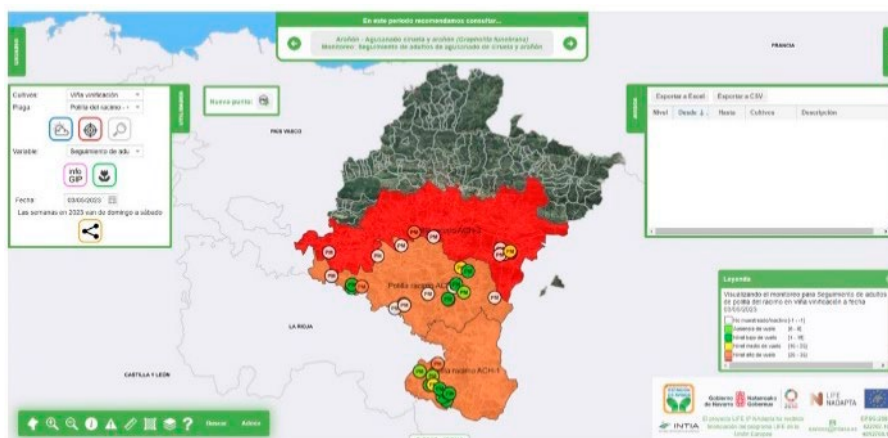


Fig. 2. Visor estación de Avisos: Puntos de Monitoreo y Situación a 03/05/2023

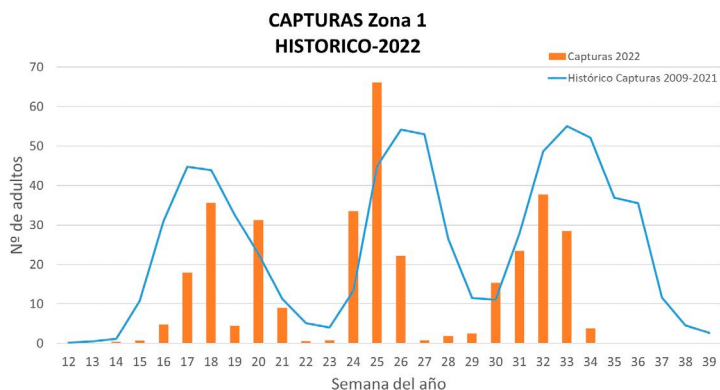


Fig. 3. Histórico Capturas - Capturas 2022. Zona 1

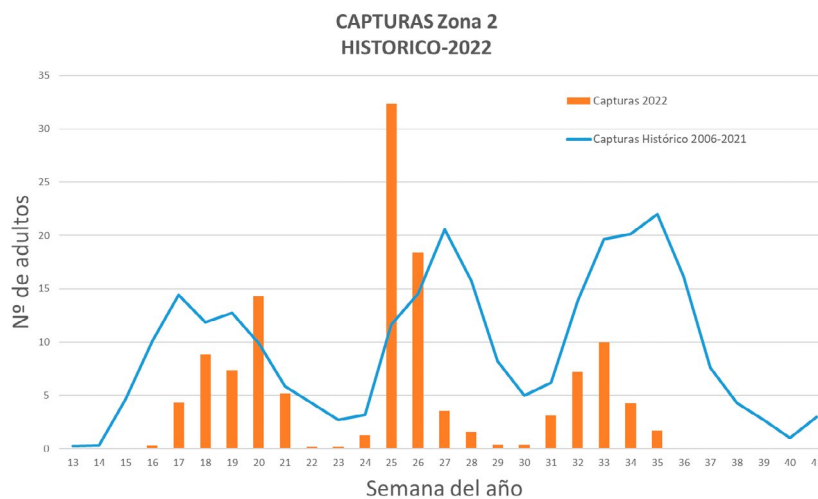


Fig. 4. Histórico Capturas - Capturas 2022. Zona 2

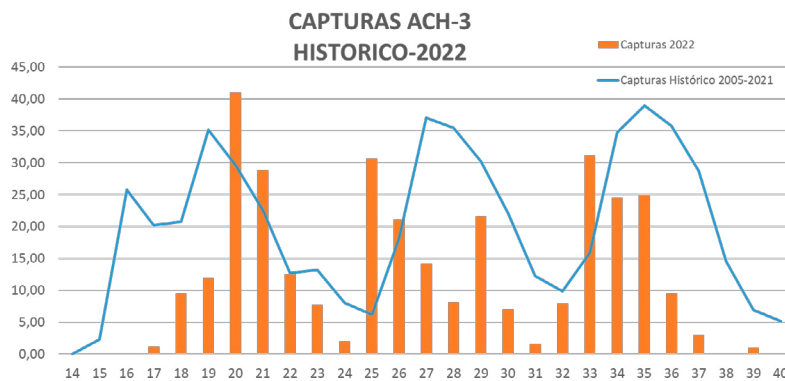


Fig. 5. Histórico Capturas - Capturas 2022. Zona 3



4. Conclusiones

El seguimiento de la plaga en campo a través de trampas de monitoreo es un trabajo determinante para conocer el comportamiento de la polilla y poder elegir en cada momento y en cada zona, la estrategia de control más adecuada. La implementación del monitoreo lleva consigo la implicación de las personas productoras y relacionadas con la actividad, así como el disponer de herramientas de fácil acceso (Estación de Avisos) con las que poder gestionar esta información.

Disponer de una red de estaciones con la que poder acceder a los datos climáticos para el análisis conjunto con los datos de capturas resulta también fundamental para poder evaluar el comportamiento de la plaga y tratar de predecir comportamientos futuros.

Campañas como la de 2022 con temperaturas extremas y escasa precipitaciones traen consigo variaciones en el comportamiento de la polilla que complican tanto su seguimiento como su control.

Con los datos registrados durante estos casi 20 años de monitoreo junto con los datos de variación de temperaturas medias en las zonas, se intuyen ciertas tendencias de variación en el comportamiento de la plaga en las diferentes zonas productoras que habrá que seguir analizando.

Se observa disminución de las capturas de la plaga en la Ribera Baja y en la Ribera Media, hecho que no se aprecia en la Zona de Montaña. Destaca el adelanto del inicio de vuelo de la plaga en las tres zonas productoras. Ciertos desplazamientos en el comportamiento de la plaga tendentes a adelantar los picos poblacionales, en algunos casos, y a acercarlos más al inicio de los vuelos de las generaciones. Presencia de inicios de cuartas generaciones en algunos de los años de control, como en 2022, nos da también una idea del cambio en el comportamiento de la plaga, que si encuentra condiciones adecuadas puede seguir desarrollándose.

5. Bibliografía

1. SAGÜÉS, ANA; ABAD, FRANCISCO JAVIER; RODRÍGUEZ, MAITE; ERBURU, ANDONI; CAMINERO, LAURA. 2016. **Control de la polilla de la vid mediante *Bacillus thuringiensis***. Navarra Agraria 216. 44-48.
2. TORRES, LUÍS MIGUEL. 2023. **Un aniversario aciago: dos siglos de historia como plaga de la polilla del racimo de la vid, *Lobesia botrana* Den. y Schiff.**
<http://www.seea.es/index.php/seea-informa/divulgacion/15-divulgacion/64-seea-lobesia-botrana>

6. Agradecimientos

A toda la red de colaboradores que, durante estos 20 años, con su implicación y trabajo hacen posible disponer de toda esta información tan valiosa para todo el sector.

Reducción de la relación hojas-racimos, antes del envero: efectos vegetativos, productivos y cualitativos, en cv. Verdejo

Jesús Yuste, Daniel Martínez-Porro

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León
Ctra. Burgos km.119, 47071 Valladolid. 983 317460. *E-mail: yusbomje@itacyl.es

Resumen

La relación entre superficie foliar y carga de cosecha puede ser un factor decisivo en la producción de uva orientada a vino de alta calidad en la que se aplica deshojado para favorecer la aireación de la cepa, debido a la importancia del balance entre fuente y sumidero en la maduración de la uva. Por ello, se plantea un trabajo sobre la eliminación de la mitad de las hojas, de forma alterna a lo largo de todos los pámpanos, inmediatamente antes del envero.

En el periodo 2017-2019, se estudia, en Valladolid, la respuesta productiva y cualitativa del cv. Verdejo, en 110-R, a partir de la aplicación, en fase de pre-envero, de los tratamientos experimentales: T, testigo (pámpanos íntegros); DH, deshojado parcial (eliminación de hojas alternas de cada pámpano, respetando los racimos). El diseño experimental es en 4 bloques al azar, con parcela elemental de 12 cepas de control, en viñedo en espaldera vertical, plantado en 2012, podado en cordón Royat bilateral.

El deshojado alterno provocó escasos efectos de reducción del desarrollo vegetativo, con apenas una disminución del 5% en el peso de madera de poda, y muy escaso impacto de disminución en la producción de uva, menos del 3%, con respecto al testigo, sin modificar el índice de Ravaz. El deshojado no causó diferencias notables en los parámetros básicos de composición de la uva, con apenas unas décimas de reducción en la concentración de azúcares, el pH y el ácido málico, y apenas unas décimas de aumento en la acidez total y el ácido tartárico, con respecto al testigo, sin modificar la concentración de potasio.

El interés de la aplicación del deshojado alterno, en la proximidad del envero, para aligerar el posible estrés hídrico y mejorar la aireación del canopy, dependerá de las condiciones climáticas y del coste de aplicación en cada situación de cultivo.

1. Introducción

La relación entre superficie foliar y carga de cosecha puede ser un factor decisivo en la producción de uva orientada a vino de alta calidad en la que se aplica deshojado para favorecer la aireación de la cepa, debido a la importancia que el balance entre fuente y sumidero puede tener en la maduración de la uva, hasta el punto de que se ha llegado a proponer la clasificación de niveles de ratio entre área foliar y carga de cosecha (Kliewer y Dokoozlian 2005).

En diversas zonas productoras, sobre todo amparadas por figuras o marcas de calidad, se ha pretendido imponer una limitación máxima del nivel productivo unitario en aras de conseguir una materia prima que permita alcanzar un nivel de alta calidad en el vino, olvidando la



importancia que tienen, además de la relación fuente-sumidero, otros factores ambientales y de manejo del canopy (Keller 2015). Los compuestos orgánicos, producidos durante la fotosíntesis y la asimilación de nutrientes, deben ser transportados desde las hojas a otros sumideros, con especial relevancia a los racimos. La distribución se produce en función de los recursos globales de la planta, a diversas escalas, pues la acumulación de sustancias en la baya depende de la dimensión de la estructura foliar, de la eficiencia productiva de asimilados de las hojas y de la competencia entre órganos de reserva y de crecimiento (Wisdom y Considine 2022).

El deshojado reduce, evidentemente, la relación fuente-sumidero, ya que disminuye la superficie foliar con respecto al número de racimos, y, por tanto, puede alterar el metabolismo interno de la planta (Candar et al. 2020). Sin embargo, la distribución de asimilados en los distintos órganos sumideros depende de la proximidad de los órganos, según la cual, aunque las hojas de un pámpano exportan asimilados a otros pámpanos, cuanto más cerca esté la fuente más probable es la llegada de asimilados al sumidero, de manera que, por esta razón, un racimo recibiría fotoasimilados mayormente de las hojas más cercanas, pero los mecanismos que intervienen en la distribución de asimilados en los órganos sumideros son diversos y complejos (Taiz y Zeiger 2006). Por otro lado, la competencia entre sumideros determina la prioridad de captación de asimilados. En este sentido, los racimos tienen gran prioridad desde el cuajado, sobre todo desde hojas adyacentes y cercanas, pero a partir del envero deben competir con los órganos de reserva (Candolfi-Vasconcelos et al. 1994), lo cual condiciona la acumulación final de asimilados en la uva.

Evidentemente, la reducción de parte de la superficie foliar provocada por el deshojado facilita la aireación del *canopy*, particularmente orientada a los racimos, con la finalidad de reducir el riesgo de infección por enfermedades fúngicas y la consecuencia de modificación de las condiciones microclimáticas de maduración de la uva, la cual representa un objetivo fundamental en el proceso de producción vitícola.

La relación funcional entre órganos vegetativos y reproductivos debe ser considerada en el contexto de la influencia de diversos factores, entre los que destacan el clima, el suelo, el material vegetal -mayormente la variedad vinífera- y el manejo del viñedo, por lo que el patrón de distribución y almacenamiento de asimilados no puede extrapolarse a todas las situaciones y debe ser abordado con el apoyo de la experimentación en cada explotación vitícola. Con esta orientación, el trabajo persigue conocer la respuesta agronómica y cualitativa del cv. Verdejo a la eliminación de la mitad de las hojas, de forma alterna a lo largo de todos los pámpanos, aplicada en la fase inmediatamente anterior al envero, para valorar su posible conveniencia en el manejo del viñedo en las condiciones de cultivo semiáridas del valle del río Duero (España).

2. Material y Métodos

El trabajo se llevó a cabo durante el periodo 2017-2019 en Valladolid (Castilla y León, España). El material empleado es *Vitis vinifera* L., cv. Verdejo, sobre portainjerto 110 Richter, plantado en 2012, con un marco de 2,8 m x 1,4 m (2.551 plantas.ha⁻¹). La orientación de filas es NNE (N+25°). El sistema de conducción es espaldera vertical, mediante cordón Royat bilateral y poda con 4 pulgares de 2 yemas en cada brazo (16 yemas por cepa).

El ensayo experimental consiste en la aplicación de dos tratamientos: T, testigo (mantenimiento de pámpanos íntegros), y DH, deshojado parcial, que consiste en la eliminación



de hojas alternas de cada pámpano, en la fase inmediatamente anterior al envero. El diseño experimental es en bloques al azar, con 4 repeticiones por tratamiento y parcela elemental de 12 cepas de control, con líneas contiguas a cada lado destinadas al efecto borde.

El cultivo del viñedo se llevó a cabo mediante apoyo de riego deficitario (25% ETo) desde el estado de tamaño guisante hasta la semana anterior a vendimia, aplicado semanalmente mediante goteros separados 75 cm.

El suelo del ensayo (tabla 1) presenta alta pedregosidad (más de 65% de elementos gruesos), lo que le confiere un buen drenaje, con una capacidad potencial de retención de agua estimada en 70 mm / m de profundidad. Es de tipo arcillo-arenoso en el 1^{er} horizonte (20 cm) y franco-arcillo-arenoso en los dos horizontes siguientes (20-100 cm), llano, sin limitaciones físicas ni químicas para el cultivo de viñedo.

Tabla 1. Características físicas de los horizontes presentes en el perfil del suelo del viñedo experimental.

Profundidad (cm)	Elementos gruesos (%)	Textura U.S.D.A.			Clase textural
		Arena	Limo	Arcilla	
0-20	70,7	45,3	19,4	35,3	AcAr
20-45	68,8	47,4	19,5	33,1	FrAcAr
45-100	74,8	61,4	9,5	29,1	FrAcAr

En la tabla 2 aparecen reflejados los datos termopluviométricos del periodo 2017-2019.

Tabla 2. Datos termo-pluviométricos de las campañas 2017, 2018 y 2019, en Valladolid. T_m, temperatura media (°C): T_{ma}, T_{mc}, T_{mv}; T_{max}, temperatura media de máximas (°C): T_{maxa}, T_{maxc}, T_{maxv}; T_{min}, temperatura media de mínimas (°C): T_{mina}, T_{minc}, T_{minv}; P, precipitación (mm): P_a, P_c, P_v. Los periodos corresponden, según subíndice, a las fechas: a (anual): 1-oct/30-sep; c (ciclo): 1-abr/30-sep; v (verano): 1-jul/30-sep.

Año	T _{ma}	T _{mc}	T _{mv}	T _{maxa}	T _{maxc}	T _{maxv}	T _{mina}	T _{minc}	T _{minv}	P _a	P _c	P _v
2017	13,1	18,9	20,6	20,7	27,5	29,3	6,2	10,5	12,0	262,1	98,2	47,0
2018	12,4	18,0	21,6	19,5	25,9	30,9	6,1	10,8	13,1	521,8	270,2	50,2
2019	12,4	17,6	20,8	19,9	25,7	29,2	5,7	9,8	13,0	302,5	137,4	75,2

Se midieron los parámetros siguientes: peso de madera de poda y número de sarmientos; peso de uva, número de racimos y peso de baya; sólidos solubles totales, pH, acidez total, ácido tartárico, ácido málico y potasio, en mosto. A partir de estos parámetros, se calcularon otros parámetros vegetativos, productivos y cualitativos. El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante análisis de varianza con el programa SPSS 16.

3. Resultados

Desarrollo vegetativo

El crecimiento vegetativo, estimado a través del peso de madera de poda (tabla 3), no se vio modificado sustancialmente ningún año por el tratamiento de deshojado, suponiendo apenas



una reducción media del 5%, con respecto al testigo. Esta ligera reducción se debió exclusivamente a la disminución del peso del sarmiento, puesto que el número de sarmientos, tanto francos como chupones, no se vio afectado por la operación de deshojado a lo largo del periodo de estudio.

Producción de uva y componentes del rendimiento

El rendimiento en uva (tabla 3) mostró una disminución media en el tratamiento de deshojado, de aproximadamente el 3%, con respecto al testigo, sin que la diferencia resultase estadísticamente significativa ninguno de los años. Ninguno de los componentes del rendimiento se vio apreciablemente afectado por el deshojado, observándose muy poca variación interanual tanto en el número de racimos, que fue el componente que perjudicó ligeramente la producción de uva citada, como en el peso del racimo, que fue algo más favorable al tratamiento de deshojado. En este sentido, el número de bayas del racimo resultó ligeramente superior en el testigo, mientras que el peso de baya fue algo más alto en el tratamiento deshojado, siendo la diferencia en ambos parámetros de muy escasa cuantía, sin significación entre tratamientos. El Índice de Ravaz tampoco mostró diferencias notables entre el tratamiento de deshojado y el testigo, dada la ligera reducción causada por el deshojado tanto en la producción de uva como en el peso de madera de poda, con respecto al testigo.

Tabla 3. Madera de poda (kg), N° total de sarmientos, N° de sarmientos francos, N° de chupones, por cepa; Peso de sarmiento (g); Rendimiento en uva (t/ha), N° de racimos por cepa, Peso de racimo (g), Peso de baya (g), N° de bayas por racimo; e Índice de Ravaz, a lo largo del periodo 2017-2019, de los tratamientos T y DH. Nivel de significación estadística: no significativo (-); $p < 0,05$ (*).

	Trat.	Madera Poda	N° Sarm.	N° francos	N° chup.	Peso Sarm.	Rdto.	N° Racimos	Peso Racimo	Peso Baya	N° Bayas	Índice Ravaz
2017	T	0,932	15,7	15,0	0,7	59,4	6,84	20,8	129,2	1,21	107,2	2,89
	DH	0,835	15,2	14,8	0,4	54,9	6,68	21,0	125,1	1,22	96,3	3,13
	Sig.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2018	T	1,348	15,4	14,6	0,8	87,7	9,38	26,1	140,1	1,96	71,9	2,78
	DH	1,301	15,8	14,9	0,9	82,5	9,82	25,4	150,5	1,98	67,7	3,00
	Sig.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2019	T	0,940	15,9	15,4	0,4	59,3	10,08	28,0	140,7	1,42	99,3	4,35
	DH	0,926	15,7	15,2	0,5	59,1	9,16	27,6	141,7	1,48	96,0	3,93
	Sig.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Media (2017-2019)	T	1,073	15,6	15,0	0,6	68,8	8,77	25,0	136,7	1,53	92,8	3,34
	DH	1,021	15,6	14,9	0,6	65,5	8,55	24,6	139,1	1,56	86,7	3,35

Composición de la uva

La concentración de sólidos solubles totales (tabla 4) no se vio modificada notablemente por el deshojado ninguno de los años de estudio, observándose un valor muy similar al del testigo, con apenas una reducción de 0,1 °brix. El pH y la acidez total del mosto fueron muy similares en ambos tratamientos, con diferencia entre valores prácticamente inferior a 1 décima todos los años, favorable al tratamiento deshojado con respecto al testigo en términos de acidez. El ácido tartárico mostró una tendencia similar a la acidez titulable, aunque con diferencias entre tratamientos ligeramente mayores, en torno a 3 décimas, favorables al tratamiento deshojado, que dada su escasa cuantía tampoco resultaron estadísticamente significativas. El ácido málico,



contrariamente, se vio ligeramente reducido a causa del despampanado, en torno a 2 décimas de media interanual, que tampoco fueron suficientes para resultar estadísticamente significativas. El contenido de potasio en uva no mostró diferencia entre tratamientos, con valores medios del deshojado y del testigo casi idénticos.

Tabla 4. Sólidos solubles totales (S.S.T., °brix), pH, acidez titulable (Ac. total, g TH₂/L), ácido tartárico (g/L), ácido málico (g/L) y potasio (ppm), a lo largo del periodo 2017-2019, de los tratamientos T y DH. Nivel de significación estadística: no significativo (-); p<0,05 (*).

		S.S.T.	pH	Ac. total	Ac. tartárico	Ac. málico	Potasio
2017	T	24,0	3,66	4,55	8,31	1,12	1933
	DH	24,0	3,61	4,59	8,66	1,02	1907
	Sig.	-	-	-	-	-	-
2018	T	23,1	3,48	5,09	6,69	2,21	1685
	DH	23,0	3,53	5,25	7,10	1,96	1713
	Sig.	-	-	-	-	-	-
2019	T	22,5	3,29	5,72	7,27	1,48	1338
	DH	22,4	3,26	5,67	7,25	1,28	1338
	Sig.	-	-	-	-	-	-
Media (2017-2019)	T	23,2	3,47	5,12	7,42	1,60	1652
	DH	23,1	3,46	5,17	7,67	1,42	1653

4. Conclusiones

El deshojado aplicado justo antes del envero no produjo una disminución significativa del desarrollo vegetativo, reduciendo apenas un 5% el peso de madera de poda con respecto al testigo, como consecuencia de la reducción del peso del sarmiento.

La producción de uva apenas se vio reducida un 3% por el deshojado con respecto al testigo, sin que dicha reducción resultase significativa ninguno de los años. Ninguno de los componentes del rendimiento se vio apreciablemente afectado por el deshojado, observándose muy poca variación interanual tanto en el número de racimos, que fue el componente que perjudicó ligeramente la producción de uva citada, como en el peso del racimo, que fue algo más favorable al tratamiento de deshojado. El Índice de Ravaz tampoco mostró diferencias notables entre tratamientos, dada la ligera reducción causada por el deshojado tanto en la producción de uva como en el peso de madera de poda, con respecto al testigo.

El deshojado no causó diferencias notables en los parámetros básicos de composición de la uva, mostrando valores muy similares al testigo, con apenas unas décimas de reducción en la concentración de azúcares, el pH y el ácido málico, y apenas unas décimas de aumento en la acidez total y el ácido tartárico, con respecto al testigo, sin modificar la concentración de potasio.

En definitiva, atendiendo a los resultados observados, la aplicación de deshojado alterno a lo largo del pámpano, en época muy próxima al envero, no ha modificado sustancialmente la respuesta agronómica del viñedo, aunque puede haber aliviado parcialmente el estrés hídrico que sufre el viñedo de Verdejo en la fase de maduración y reducido el riesgo de infección por enfermedades fúngicas, por lo que el interés de su utilización dependerá de las condiciones climáticas y del coste de aplicación en cada situación de cultivo.



5. Bibliografía

1. CANDAR S., BAHAR E., KORKUTAL I. 2020. **Impacts of leaf area on the physiological activity and berry maturation of Merlot (*Vitis vinifera* L.)**. Applied ecology and environmental research 18(1): 1523-1538.
2. CANDOLFI-VASCONCELOS M.C., CANDOLFI M.P., KOBLET W. 1994. **Retranslocation of carbon reserves from the woody storage tissues into the fruit as a response to defoliation stress during the ripening period in *Vitis vinifera* L.** Planta 192: 567-573.
3. KELLER M. 2015. **The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology**. Ed. Elsevier. 509 p.
4. KLIEWER W.M., DOKOOZLIAN N.K. 2005. **Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality**. American Journal of Enology and Viticulture 56: 170-181.
5. TAIZ L., ZEIGER E. 2006. **Plant physiology**, 4th ed. Sinauer, Sunderland, M.A. (U.S.A.).
6. WISDOM J.M., CONSIDINE J.A. 2022. **Whole-vine resources modify within-vine relationships between growth parameters and metabolites in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon**. Oeno One 56(3): 205-217.

6. Agradecimientos

La elaboración de este trabajo ha sido posible a través del apoyo de los proyectos RTA2014-00049-C05-01 y PID2019-105039RR-C42 y fondos FEDER de la Junta de Castilla y León, con la colaboración de compañeros de la Estación Enológica del ITACYL.

Secuenciación metagenómica para evaluar el impacto en el funcionamiento del suelo de 20 años de aplicación continuada de residuos orgánicos compostados en un viñedo de Bargota (Navarra)

Lur Epelde^{1*}, Ulas Karaoz², Eoin Brodie², J. Félix Cibriáin³

¹NEIKER-Basque Institute for Agricultural Research and Development. Basque Research and Technology Alliance (BRTA). Parque Científico y Tecnológico de Bizkaia, P812, 48160 Derio, Spain *627976041, lepelde@neiker.eus

²Earth and Environmental Sciences, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, United States

³Sección de Viticultura y Enología - EVENA, Gobierno de Navarra, C/Valle de Orba 34, 31390 Olite - Erriberri, Navarra. vitienol@navarra.es

Resumen

El proyecto ReCROP apuesta por un modelo de agricultura sostenible basado en un aumento de la biodiversidad y funciones del suelo. Se está trabajando en un estudio coordinado por EVENA entre 1998 y 2017 en una viña de Tempranillo ubicada en la localidad de Bargota, municipio navarro adscrito a la D.O.Ca.Rioja. En este estudio se aplicaron cinco tratamientos de fertilización (tres composts, uno mineral y un control). En colaboración con el Lawrence Berkeley National Laboratory se está empleando una aproximación de genomas resueltos por metagenómica e inferencia de *traits* funcionales. Además, se ha realizado una caracterización fisicoquímica y biológica exhaustiva de los suelos y los peciolo.

Así, se han medido aumentos significativos de materia orgánica y contenido en carbono, actividad biológica, diversos micro y macronutrientes y capacidad de retención hídrica en los tratamientos con enmiendas orgánicas en comparación con el control. Los tratamientos de enmiendas orgánicas tuvieron una influencia significativa en la composición estructural de las comunidades microbianas del suelo, y el tratamiento sin fertilización mostró el valor más alto en todos los índices de diversidad calculados. Por otro lado, sólo se obtuvieron 38 genomas representativos a partir de 250 bins de calidad, pudiendo indicar que el suelo del viñedo tenía pocos procariontes abundantes. En estos momentos se está trabajando en la evaluación de la diversidad funcional de los resultados obtenidos.

1. Introducción

La microbiota realiza funciones esenciales en el ecosistema edáfico, como el reciclaje de nutrientes, el almacenaje de carbono y la conservación de la materia orgánica, la filtración y retención de agua, etc. (1). Algunas prácticas de manejo del suelo en viticultura (e.g., el laboreo frecuente y la aplicación de grandes cantidades de productos fitosanitarios) descuidan la calidad y biodiversidad del suelo y contribuyen a su deterioro (2). Es esencial fomentar prácticas agrícolas que contribuyan a la mejora de la biodiversidad del suelo como atributo clave de los sistemas agrícolas sostenibles, especialmente en el actual contexto de crisis climática (3).

Por otro lado, el desarrollo de las llamadas técnicas ómicas, como la metagenómica, proporciona una nueva forma de examinar el mundo microbiano que tiene el potencial de revolucionar la comprensión del ecosistema edáfico. Uno de los retos actuales de estas técnicas es procesar la complejidad de los datos obtenidos y extraer información relevante. Recientemente,



se han desarrollado herramientas informáticas que permiten ensamblar los datos y asignar con precisión fragmentos del genoma a organismos específicos (4). Asimismo, desde una perspectiva funcional, la riqueza de especies *per se* tiene poca importancia; lo fundamental es el repertorio funcional de la biota del suelo. Cada vez se hace más hincapié en los rasgos funcionales o *traits*, que se definen como características fisiológicas, morfológicas y de comportamiento que influyen en el rendimiento o la aptitud de un organismo en unas condiciones ambientales determinadas (5). Estos *traits* son útiles para establecer vínculos mecanicistas entre la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas.

El objetivo principal de este estudio es evaluar el impacto de 20 años de aplicación continuada de residuos orgánicos compostados en un viñedo tipo de la variedad Tempranillo sobre el funcionamiento del suelo. Se trata probablemente del único ensayo a largo plazo de este tipo en condiciones mediterráneas. Para ello, se están analizando los datos metagenómicos del suelo utilizando un enfoque de genomas resueltos y de *traits* funcionales.

2. Material y Métodos

El estudio muestreado fue coordinado por la Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA). Se trata de una parcela plantada de viña en el año 1977, de la variedad Tempranillo con portainjerto 110R. (Ubicación UTM 30N X:557.317 Y: 4.703.740). El diseño experimental del ensayo se plantea en bloques al azar con tres repeticiones. Cada subparcela tiene 108 m² y consta de dos hileras de 18 m de longitud con 15 cepas en cada hilera. Entre 1998 y 2017 se aplicaron cinco tratamientos de fertilización: (i) Abonlir, un compost peletizado elaborado a partir de residuos vegetales, animales y lodos de depuradora producido por Slir S.L. (Pellet); (ii) un compost elaborado a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos de las instalaciones de Cárcar (Urban); (iii) un compost elaborado a partir de estiércol de oveja (Manure); (iv) un tratamiento de fertilización inorgánica aplicado cada dos años (Mineral); y (v) un tratamiento sin fertilización (Unfertilized).



Estiércol de ovino



Abono peletizado



Residuos sólidos urbanos



Abono inorgánico



Momento de aplicación

Fig. 1. Fotografías de los diferentes tratamientos realizados.

A partir del DNA extraído de los suelos muestreados en mayo del 2022, el Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG-CRG) realizó una secuenciación metagenómica mediante Illumina NovaSeq6000; se utilizó una longitud de lectura de 2 x 150 y un protocolo de > 18 Gb por muestra. Además, se realizó una caracterización fisicoquímica y biológica exhaustiva de los suelos y de los peciols de las viñas.

3. Resultados

Aunque a nivel de planta sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido en potasio y azufre, se midieron claras diferencias entre los tratamientos en cuanto a muchas propiedades del suelo. Por ejemplo, se midieron aumentos significativos de materia orgánica y contenido en carbono, actividad biológica, diversos micro y macronutrientes y capacidad de retención hídrica en los tratamientos con enmiendas orgánicas en comparación con los tratamientos control (**Tabla 1**).

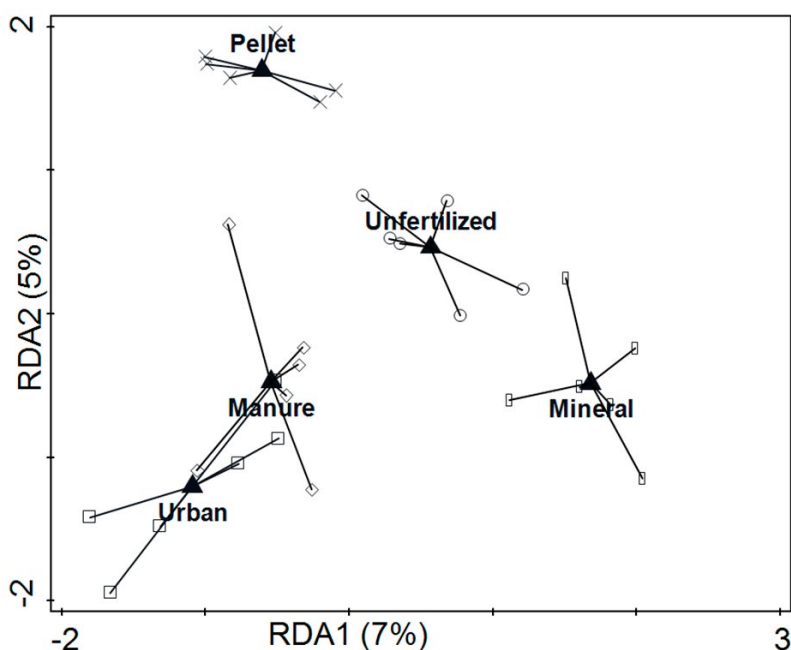
Tabla 1. Algunos resultados de propiedades fisicoquímicas y biológicas de los suelos.

	Pellet	Urban	Manure	Mineral	Unfertilized
Materia orgánica (%)	1.8 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.1 ^b	1.5 ± 0.1 ^b
Carbono total (%)	5.7 ± 0.1 ^a	6.0 ± 0.0 ^b	6.0 ± 0.1 ^b	5.7 ± 0.1 ^a	5.9 ± 0.1 ^{ab}
Respiración (mg C-CO ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)	0.75 ± 0.06 ^{ab}	0.79 ± 0.02 ^a	0.80 ± 0.03 ^a	0.67 ± 0.02 ^{bc}	0.58 ± 0.02 ^c
Potasio soluble (mg kg ⁻¹)	1054 ± 49 ^a	785 ± 22 ^b	817 ± 26 ^b	656 ± 28 ^c	658 ± 55 ^c



Azufre (mg kg⁻¹)	0.64 ± 0.02 ^a	0.69 ± 0.01 ^a	0.67 ± 0.02 ^a	0.56 ± 0.02 ^b	0.57 ± 0.02 ^b
Materia seca (%)	90 ± 0 ^{ab}	90 ± 0 ^{ab}	89 ± 1 ^a	91 ± 0 ^b	91 ± 0 ^b
Capacidad de retención hídrica a 33 kPa (%)	27 ± 0 ^a	28 ± 1 ^a	28 ± 0 ^a	27 ± 1 ^a	25 ± 0 ^b

En cuanto a la biodiversidad estructural analizada a nivel de comunidad con la proteína ribosomal uS3, se obtuvieron 600 grupos de especies (GE). El Tratamiento tuvo una influencia significativa en la composición estructural de las comunidades microbianas del suelo, representando el 18% de la variación (Pseudo-F = 1,4, $p = 0,002$). Como se muestra en el biplot del análisis de redundancia (RDA) de la **Fig. 2**, los tratamientos Unfertilized y Mineral se separaron de los suelos enmendados orgánicamente a lo largo del eje horizontal, mientras que el tratamiento Pellet se separó de Urban y Manure a lo largo del eje vertical. Según el PERMANOVA, el efecto causado por el tratamiento de fertilización sobre la composición de la comunidad microbiana fue estadísticamente significativo ($F = 1,86$, $p = 0,0001$), y varios GE mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En cuanto a los índices de diversidad calculados a partir de los GE, el tratamiento Unfertilized mostró el valor más alto en todos los índices (**Tabla 2**). En cambio, los tratamientos Urban y Mineral mostraron los valores más bajos de riqueza y diversidad de Shannon, mientras que Pellet y Urban mostraron los valores más bajos de los índices de Simpson y Pielou.



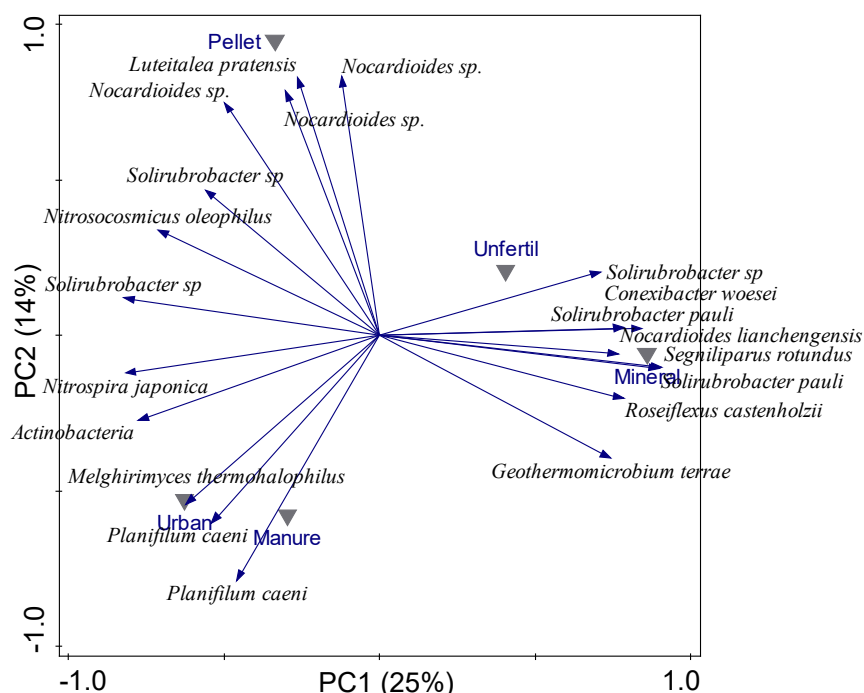


Fig. 2. Biplots de RDA (a) (con el tratamiento como variable explicativa) y PCA (b) (se señalan los 20 grupos de especies con mejor ajuste) con los grupos de especies como variables respuesta.

Tabla 2. Índices de diversidad estructural.

	Richness	Shannon	Simpson	Pielou
Pellet	572 ± 3 ^a	6.021 ± 0.008 ^{ab}	0.99640 ± 0.00011 ^a	0.9482 ± 0.0011 ^a
Urban	554 ± 8 ^b	6.001 ± 0.018 ^a	0.99650 ± 0.00008 ^a	0.9501 ± 0.0010 ^a
Manure	563 ± 7 ^{ab}	6.019 ± 0.018 ^{ab}	0.99662 ± 0.00008 ^{ab}	0.9505 ± 0.0014 ^{ab}
Mineral	556 ± 3 ^b	6.008 ± 0.008 ^a	0.99673 ± 0.00005 ^{bc}	0.9507 ± 0.0013 ^{ab}
Unfertilized	571 ± 2 ^a	6.054 ± 0.009 ^b	0.99685 ± 0.00004 ^c	0.9539 ± 0.0011 ^b

Por otro lado, llama la atención que, a pesar de que la secuenciación fue lo suficientemente profunda y de que se ensambló un alto porcentaje de las lecturas, sólo se obtuvieron 38 genomas representativos a partir de 250 bins de calidad. De estos 38 genomas, 33 correspondían a bacterias y 5 a arqueas, y estaban relacionados con *Nitrososphaera*, *Nitrospira*, *Rubrobacter*, *Solirubobacter*, *Patulibacter* y *Arthrobacter* sp. Esto podría indicar que el suelo del viñedo tenía en general pocos procariontes abundantes.

La salida Distillate de DRAM proporciona una organización centrada en los genes anotados. La Fig. 3a muestra la abundancia relativa de los recuentos de genes en una amplia variedad de rutas metabólicas; no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con respecto a estas categorías. Se observó una tendencia similar en el heatmap de la cobertura de las rutas metabólicas obtenida en la salida Product de DRAM (Fig. 3b); hubo pocas diferencias entre las muestras y los tratamientos no se agruparon entre sí. En estos momentos se está trabajando en la



utilización del pipeline *microTrait* (6) para una evaluación más exhaustiva de la diversidad funcional de los resultados obtenidos, tanto a nivel de assemblies como de genomas resueltos.

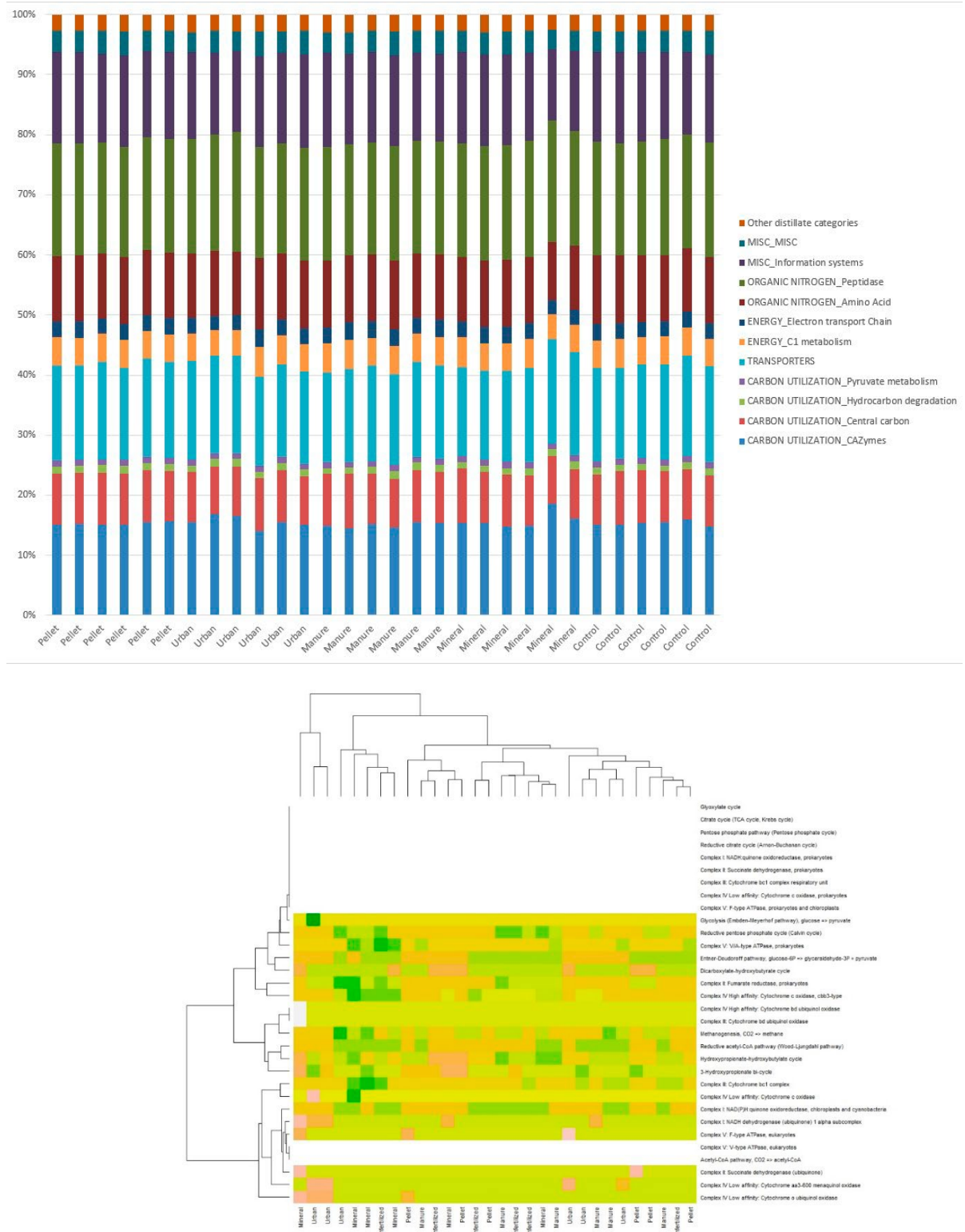


Fig. 3. Recuentos de abundancia relativa en cada categoría de genes en DRAM (a). Heatmap de la cobertura de rutas metabólicas obtenida en DRAM (b).



4. Conclusiones

Consideramos clave entender el efecto de las prácticas de fertilización orgánica en la estructura y función de la biodiversidad edáfica, así como la influencia de la microbiota en los cambios observados a nivel del resto de propiedades de suelo determinadas. Este tipo de prácticas podría ayudar a resistir mejor los fenómenos climáticos extremos y a aumentar la resiliencia del viñedo, al mejorar aspectos como la fertilidad del suelo y la conservación del agua.

5. Bibliografía

1. BARRIOS, E.. 2007. **Soil biota, ecosystem services and land productivity**. Ecol Econ 64 269-285.
2. CALLEJA-CERVANTES, M.E.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.J.; IRIGOYEN, I.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; APARICIO-TEJO, P.M.; MENENDEZ, S.. 2015. **Thirteen years of continued application of composted organic wastes in a vineyard modify soil quality characteristics**. Soil Biol Biochem 90 241-254.
3. WALL, D.; NIELSEN, U.; SIX, J.. 2015. **Soil biodiversity and human health**. Nature 528 69-76.
4. SHARON, I.; BANFIELD, J.F.. 2013. **Genomes from metagenomics**. Science 342 6162.
5. KRAUSE, S.M.B.; BERTILSSON, S.; GROSSART, H.P.; BODELIER, P.L.E.; VAN BODEGOM, P.M.; LENNON, J.T.; PHILIPPOT, L.; LE ROUX, X.. 2022. **Microbial trait-based approaches for agroecosystems**. Adv Agron 175 259-299.
6. KARAOZ, U.; BRODIE, E.L.. 2022. **microTrait: a toolset for a trait-based representation of microbial genomes**. Front Bioinform 2 918853.

6. Agradecimientos

Proyecto PCI2021-121935 de investigación financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/PRTR.

Selección clonal en vid de las variedades Tempranillo y Graciano en el marco del proyecto europeo VITISAD

Luis Rivacoba, Sergio Ibáñez, Javier Portu y Elisa Baroja

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja). Finca La Grajera. Carretera Burgos, km 6. 26071 Logroño (La Rioja). (Apartado Postal N° 1.042 - 26080 Logroño). Tfno. 941 05 30 94; e-mail: lrivacoba@larioja.org

Resumen

Durante las últimas décadas, se está observando un fenómeno de pérdida de diversidad del patrimonio genético en la vid. Este fenómeno, conocido como erosión genética, se produce tanto a nivel varietal, por la disminución del número de variedades cultivadas, como a nivel intravarietal, debido al cultivo de un escaso número de clones de cada variedad. El proceso tiene como consecuencia la pérdida de biotipos que podrían ser de interés ante la aparición de nuevas formas de estrés biótico y abiótico.

En este contexto, el Gobierno de La Rioja ha impulsado la creación de un Banco de Germoplasma, con 1.667 accesiones de las principales variedades de la D.O.Ca. Rioja, así como el desarrollo de una nueva selección clonal de las variedades Tempranillo y Graciano.

Este trabajo presenta los resultados obtenidos en cuanto a parámetros de producción, duración del ciclo, análisis de mosto y de vino y vigor, para cuatro clones preseleccionados de Tempranillo y otros cuatro de Graciano. Los resultados obtenidos muestran la gran variabilidad existente entre los diferentes biotipos, confirmando el potencial que tiene la diversidad intravarietal frente a desafíos como el cambio climático.

1. Introducción

Entre las más de diez mil variedades de uva presentes en el mundo, tan solo dieciséis de ellas ocupan la mitad de la superficie dedicada en la actualidad al cultivo de la vid. Si trasladamos la comparativa a España, nos encontramos con que el 80% de la superficie vitícola está plantada con nueve variedades de las que tan solo dos, Tempranillo y Airén, representan el 43% de la misma. A principios del siglo XX, Nicolás García de los Salmones catalogó casi dos mil quinientas variedades de vid en nuestro país, de las que menos de doscientas se siguen cultivando en mayor o menor medida. Desde entonces, la diversidad del patrimonio genético existente se ha reducido de forma alarmante, corriendo el riesgo de perderse. Este fenómeno, conocido como erosión genética, se está produciendo no solo a nivel varietal sino también a escala intravarietal puesto que, de igual manera, el número de clones empleados en cada variedad resulta escaso.

La erosión de los recursos genéticos produce un aumento de la vulnerabilidad del cultivo ante la aparición de nuevos escenarios. Es por ello que, la diversidad de material vegetal aporta un valor añadido a la singularidad y tipicidad de los terroirs vitícolas y, además, supone una vía de



adaptación del viñedo a condiciones adversas como las que se están derivando del cambio climático.

Por todo ello, resulta fundamental preservar y ampliar la diversidad genética que disponemos en las distintas regiones vitícolas para adecuarnos, entre otros aspectos, a la actual variación del clima. Con este propósito, el proyecto europeo VITISAD, un acrónimo que funde español y francés para focalizar la sostenibilidad (*durabilité*) de la viticultura en un marco de adaptación al cambio climático, ha enfocado uno de sus principales objetivos en la búsqueda, estudio y recuperación de material vegetal con esa capacidad de aclimatación. VITISAD ha contado con la cooperación, durante el periodo 2019-2022, de cinco socios españoles y franceses (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario-NEIKER, Dirección General de Desarrollo Rural, Agricultura y Ganadería del Gobierno de Navarra, Chambre d'Agriculture des Pyrénées-Atlantiques, Institut Français de la Vigne et du Vin-IFV y Dirección General de Agricultura y Ganadería del Gobierno de La Rioja), siendo financiado a través del Programa Interreg V-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2014-2020)

2. Material y Métodos

El trabajo que aquí se presenta está relacionado con la línea de diversidad intravarietal del proyecto VITISAD (*Ibáñez et al.*, 2021), llevada a cabo por el Gobierno de La Rioja (*Baroja et al.*, 2020) y centrada en una selección de clones o accesiones de las variedades Tempranillo y Graciano. Esta selección se ha efectuado sobre la base de estudios previos realizados en campañas anteriores, en los que se ha evaluado la aptitud, frente a un escenario vitícola cambiante, de material procedente del Banco de Germoplasma de la finca institucional La Grajera (Logroño, La Rioja). Este Banco, integrado por 1.667 accesiones de variedades autorizadas en la D.O.Ca. Rioja, de las que 729 están referidas a Tempranillo y 102 a Graciano, tiene su origen en una amplia y exhaustiva prospección y selección de cepas singulares que se ha venido realizando desde el año 1999 por toda la Denominación, recogiendo material de un total de 162 parcelas repartidas por 52 términos municipales que, por sus características de calidad, antigüedad y singularidad, merecía preservarse en una misma plantación. Posteriormente, en 2016 y a partir de los clones que mostraron una aptitud más interesante de cara al contexto vitícola actual y futuro, se planteó una preselección con 30 clones de Tempranillo y otros 13 clones de Graciano que se materializó como parcela comparativa plantada en la finca institucional Valdegón (Agoncillo, La Rioja). En esta parcela, se efectuó la selección final de cuatro clones de cada una de las variedades mencionadas que, en función de los resultados logrados hasta esa fecha, presentaban un interés relevante frente al cambio climático. Con ello, se pretendía disponer de material que ofreciera soluciones a distintos problemas que dicho cambio climático acarrea y que, fundamentalmente, son debidos al incremento de temperaturas asociado al mismo. De este modo, se procuró encontrar clones que, frente al progresivo acortamiento del ciclo de la vid, aproximaran la madurez tecnológica a la madurez fenólica. Ambas se han visto desajustadas por efecto del cambio climático y, de cara a la elaboración de vinos de calidad, resulta fundamental acercar los dos tipos de maduración para asumir con garantías la decisión del momento de vendimia. Igualmente, en este marco climático en transformación, resulta conveniente mantener o incrementar atributos de calidad como la acidez y la carga polifenólica del vino, asegurar una graduación alcohólica equilibrada y controlar o limitar adecuadamente el desarrollo vegetativo y el vigor de la cepa.



En la referida finca Valdegón, se estudiaron cuatro clones de la variedad Tempranillo, numerados como 807, 1078, 1084 y 1371, a los que se añadió el clon comercial RJ-43 como testigo comparativo, además de otros cuatro clones de la variedad Graciano: 942, 954, 955, 1253, aportando como testigo el clon comercial RJ-117. Todos estos clones o accesiones estaban dispuestos en un marco de plantación de 2,80 x 1,15 m, en un sistema de conducción en cordón Royat doble, con orientación norte-sur y se encontraban injertados sobre el patrón Richter 110. El diseño experimental se estableció sobre cuatro bloques, en cada uno de los cuales se incluían todos los clones referidos, a razón de diez cepas por bloque y clon.

Los datos analizados se refieren a las campañas 2020 y 2021 y se han centrado en aspectos relacionados con la fecha de vendimia (número de día del año), la acidez del mosto (pH), el grado alcohólico del vino (%vol), parámetros que caracterizan la carga polifenólica del vino como el índice de polifenoles totales (IPT 280 nm), el contenido en antocianos (mg/l) y la intensidad de color y el desarrollo vegetativo a través del peso medio del sarmiento (g). Las determinaciones del mosto se efectuaron mediante el muestreo de bayas en el momento de vendimia, mientras que las del vino se realizaron, en la bodega experimental del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), a través de microvinificaciones en depósitos de 100 litros, siguiendo el sistema de elaboración tradicional para vinos tintos en la que la uva fue despallada, estrujada y sulfitada, inoculando tras ello levaduras secas activas para lograr una fermentación alcohólica homogénea y eficaz. Posteriormente, se realizó una siembra de bacterias seleccionadas para inducir la fermentación maloláctica. Una vez finalizada esta fermentación, y tras estabilizar en frío y sulfitar el vino, se procedió a analizar los vinos resultantes. Por su parte, el peso medio del sarmiento se obtuvo como cociente entre el peso de la madera de poda de cada cepa estudiada y el número de sarmientos de la misma.

3. Resultados

En la Tabla 1 se recogen los resultados obtenidos para los clones de Tempranillo. Valorando los parámetros que pueden resultar más interesantes desde una prisma de clima cambiante, los cuales aparecen resaltados en **negrita**, se puede indicar globalmente que los dos clones que ofrecen mayores expectativas, en este sentido, son el clon 807, en el que destaca su inclinación hacia fechas de vendimia más tardías así como su buena aptitud en cuanto a la intensidad de color y a la carga polifenólica y, sobre todo, el clon 1371 que, a pesar de presentar una recolección temprana, ha logrado ajustar convenientemente la madurez fenólica y la madurez tecnológica, equilibrando su elevado nivel de acidez con altos índices de antocianos e intensidad de color. Este clon 1371 cuenta con características ampelográficas singulares, distinguiéndose de otros Tempranillos por su peculiar hoja con lóbulos estrechos y senos peciolares amplios tipo “perejil”. Asimismo, el clon 1084 podría resultar adecuado para situaciones en las que se precise controlar el desarrollo vegetativo o el vigor de la cepa.



Tabla 1. Parámetros de caracterización de clones de Tempranillo.

Año	807		1078		1084		1371		RJ43	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Fecha vendimia	24/9	24/9	17/9	14/9	17/9	23/9	11/9	9/9	15/9	9/9
pH mosto	3.68	3.62	3.55	3.70	3.63	3.67	3.43	3.59	3.54	3.65
Grado Alcohólico (%vol)	14.20	12.80	13.50	13.60	12.80	12.60	13.80	14.20	14.90	14.00
Intensidad de Color vino	7.52	6.43	5.99	5.65	3.98	5.27	6.71	6.84	5.58	7.42
IPT vino	49.40	46.40	47.10	44.00	38.40	42.80	46.80	48.90	41.70	45.60
Antocianos vino (mg/l)	424	469	384	460	379	485	479	527	467	522
Peso sarmiento (g)	89.27	139.76	84.49	106.18	54.36	100.30	83.35	113.14	79.33	114.96

De forma análoga a la anterior, observando los datos recogidos en la Tabla 2 correspondiente a la caracterización de los clones de Graciano, cabe resaltar al clon 942 por contar valores altos de acidez acompañados de un grado alcohólico y un vigor más bajos que el resto de los clones analizados. El clon 955 ha sobresalido por su riqueza en polifenoles, antocianos e intensidad de color, mostrando además un buen nivel de acidez, expresada en términos de pH. También debemos considerar la contribución del clon 954 para adecuarse a cosechas tardías sin detrimento de la acidez.

Tabla 2. Parámetros de caracterización de clones de Graciano.

Año	942		954		955		1253		RJ117	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Fecha vendimia	8/10	1/10	5/10	13/10	1/10	6/10	8/10	1/10	5/10	6/10
pH mosto	3.35	3.38	3.37	3.46	3.30	3.45	3.51	3.40	3.34	3.39
Grado Alcohólico (%vol)	12.15	13.04	12.79	13.72	14.11	13.41	13.17	12.75	12.82	12.81
Intensidad de Color vino	12.31	11.75	12.01	10.83	17.38	11.52	12.94	8.83	11.56	9.05
IPT vino	35.30	42.30	38.60	43.20	51.40	44.20	43.20	39.80	38.30	32.20
Antocianos vino (mg/l)	381	563	445	532	529	603	438	483	412	371
Peso sarmiento (g)	61.11	75.94	92.87	104.45	118.05	146.05	98.06	113.22	116.34	121.57

4. Conclusiones

Es interesante resaltar que se ha encontrado gran variabilidad entre los diferentes clones o biotipos estudiados, confirmando el potencial que tiene la diversidad intravarietal frente a desafíos como el cambio climático. A pesar de ello, es necesario ampliar los años y zonas de estudio de esta experiencia para poder establecer conclusiones definitivas.



5. Bibliografía

1. Baroja, E., Portu, J., García-Escudero, E. (2020). Procesos actuales de selección clonal de vid en La Rioja. **Cuaderno de campo**, (63), 28-33.2.
2. Ibáñez, S., Rivacoba, L., García-Escudero, E. (2021). VITISAD: estrategias para la adaptación del viñedo al cambio climático. **Cuaderno de campo**, (64), 28-31.

6. Agradecimientos

El proyecto VITISAD ha sido cofinanciado al 65% por la Unión Europea a través del Programa Interreg VI-A España-Francia-Andorra (POCTEFA 2021-2027). El objetivo del POCTEFA es reforzar la integración económica y social de la zona fronteriza España-Francia-Andorra.

35º REUNIÓN

GRUPO DE TRABAJO
**EXPERIMENTACIÓN EN
VITICULTURA Y ENOLOGÍA**

ENOLOGÍA

Aplicación de la levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* XG3 para la elaboración de vino Treixadura en bodegas de la DOP Ribeiro

Pilar Blanco¹, María Vázquez-Alén², Teresa Garde-Cerdán³, Mar Vilanova³

¹Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-AGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32428, Leiro-Ourense.
E-mail: pilar.blanco.camba@xunta.gal

²Fundación Juana de Vega, Rúa Salvador Allende, 92, 15176 San Pedro de Nós, Oleiros, A Coruña

³Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja). Ctra. de Burgos, Km. 6. 26007 Logroño

Resumen

***Saccharomyces cerevisiae* XG3 es una levadura autóctona aislada en la Denominación de Origen Protegida (DOP) Ribeiro (Galicia). Esta cepa ha sido seleccionada en la Estación de Viticultura e Enología de Galicia (Evega-Agacal) por su potencial enológico. Mostró un buen poder fermentativo y capacidad de implantación y permitió obtener vinos diferenciados a nivel químico y sensorial en bodega experimental. La cepa se ha liofilizado para su aplicación a escala industrial. En este trabajo se presentan los resultados sobre su utilización en bodegas de la DOP Ribeiro para fermentación de mosto Treixadura comparándola con levaduras comerciales de uso en la zona. La cinética fermentativa y la capacidad de implantación fueron satisfactorias en todos los casos. A nivel químico se observaron diferencias en el grado alcohólico y la acidez total de los vinos dependientes de la cepa de levadura comercial utilizada en cada una de las bodegas. A nivel de aroma, los vinos elaborados con XG3 presentaron mayor contenido de alcoholes superiores, ésteres acéticos y ésteres etílicos. Estas diferencias repercutieron en el perfil sensorial de los vinos. Por tanto, el uso de la levadura autóctona *S. cerevisiae* XG3 puede ser una herramienta útil para fomentar la diferenciación de los vinos Treixadura de la DOP Ribeiro.**

1. Introducción

La fermentación del mosto para obtener de vino es posible gracias a la actividad de las levaduras, microorganismos capaces de transformar el azúcar en alcohol, CO₂ y un gran número de compuestos minoritarios, pero cualitativamente importantes que determinan las características químicas y sensoriales del vino (Swiegers y col., 2005).

Las características organolépticas del vino dependen, entre otros factores, de las levaduras que lleven a cabo la fermentación (Blanco y col., 2013; 2014). Por eso, en la mayoría de las bodegas utilizan levaduras comerciales para este proceso. Así, garantizan una correcta fermentación y la calidad de los vinos. Sin embargo, esta práctica también conduce a la homogenización y pérdida de la tipicidad de los vinos. En este sentido, se cree que el uso de levaduras autóctonas, bien adaptadas a las condiciones de los mostos y bodegas, ayudaría a expresar la singularidad de cada variedad y zona. En el mercado existen diversas casas comerciales que ofrecen una amplia gama de levaduras recomendadas para distintos estilos de vino. Estas levaduras proceden de distintas regiones de Francia, Italia, o de algunas comunidades autónomas en España. Sin embargo, por ahora no hay disponible ninguna levadura de origen gallego en el mercado.



En la Estación de Viticultura e Enología de Galicia (Evega-Agacal) se ha trabajado en el aislamiento, identificación genética y caracterización enológica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas a partir de procesos de fermentación espontánea. Fruto de estos estudios se seleccionó la cepa *S. cerevisiae* XG3 que destacaba por su influencia positiva en las características químicas y sensoriales del vino (Blanco y col., 2012, 2013 y 2014). En 2018 se formó un grupo operativo para la aplicación de esta cepa a nivel industrial en bodegas de la DOP Ribeiro. En el grupo operativo, coordinado por la Fundación Juana de Vega, participaron la Evega-Agacal, el CSIC (ICVV) y las bodegas O Ventosela, Priorato de Razamonde y Gandarela. En este trabajo se presentan los resultados más relevantes obtenidos de la aplicación de *S. cerevisiae* XG3 en las bodegas.

2. Material y Métodos

2.1. Liofilización y verificación de las propiedades de la levadura

La liofilización de la levadura *S. cerevisiae* XG3 se llevó a cabo en la empresa Lallemand Bio S.L. donde se le realizaron pruebas para comprobar su unicidad, estabilidad genética y respuesta al proceso de secado.

2.2. Fermentaciones

En los ensayos de aplicación de *S. cerevisiae* XG3 a escala industrial cada bodega siguió su protocolo habitual de vinificación. Se utilizó mosto de la variedad Treixadura que se distribuyó en dos depósitos, en uno de ellos se inóculo la cepa XG3 y en otro una levadura comercial (**Tabla 1**). Los ensayos se realizaron en las campañas de 2019 y 2020.

Tabla 1. Ensayos realizados en las distintas bodegas y campañas.

Bodega (Código)	2019		2020	
	XG3	LSA	XG3	LSA
Priorato de Razamonde (PR)	1000 L	5000 L (LSA1)	1000 L	10000 L (LSA2)
O Ventosela (VT)	5000 L	10000 L (Esp)	10000 L	40000 L (LSA3)
Gandarela (GD)	4000 L	5000 L (LSA4)	2800 L	5000 L (LSA5)

La evolución de las fermentaciones se siguió mediante la medida diaria de la densidad y la temperatura. A partir del mosto y en la fase inicial (Fi), fase tumultuosa (Ft) y final (Ff) del proceso se recogieron muestras para ver la evolución de la población de levaduras y el control de implantación de la cepa inoculada. Una vez terminada la fermentación, los vinos se trasegaron y sulfitaron (50 mg/L), se estabilizaron por frío, y se embotellaron para posteriores análisis.

2.3. Control microbiológico de las fermentaciones

Las muestras de mosto y fermentación se diluyeron de forma adecuada y se sembraron en medio WL Nutrient Agar (Scharlau Microbiology). Las placas se incubaron a 28°C hasta la aparición de colonias visibles, tras lo cual se procedió al recuento de levaduras y al aislamiento de un número representativo de colonias de cada muestra para su posterior identificación. Los



aislados se crecieron en Lysine Medium (Oxoid) para su diferenciación en levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.

Aquellos aislados identificados como *Saccharomyces* se caracterizaron a nivel de cepa mediante la técnica de análisis de los patrones de restricción del mtDNA (mtDNA-RFLPs) según el protocolo descrito por Querol y col. (1992).

2.4. Análisis químicos de los vinos

Para el análisis químico de los mostos y de los vinos se utilizaron los métodos oficiales (OIV, 2018). En mosto se determinaron: grado Brix, azúcares reductores, pH y acidez total. En el vino se determinaron: grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil, pH, glicerol y sulfuroso libre y total.

La identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de los vinos se realizó mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) siguiendo el protocolo descrito por Vilanova y col. (2010).

La valoración de diferencias estadísticamente significativas en los parámetros químicos del vino entre los distintos ensayos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software XLStat-Pro (Addinsoft, Paris, France, 2011).

2.5. Análisis sensorial

La evaluación sensorial de los vinos se llevó a cabo en la sala de catas de la Evega. El panel de jueces estuvo formado por 11 catadores expertos (6 mujeres y 5 hombres con edades comprendidas entre 33 y 60 años). Se realizó una cata descriptiva cuantitativa (QDA) utilizando una ficha de cata que incluía 5 descriptores olfativos y 8 gustativos, además de valorarse la calidad global de los vinos. Cada descriptor se puntuó en una escala de 0 (no presente) a 10 (máxima intensidad). Con los datos obtenidos de intensidad y frecuencia se calculó la Media Geométrica (% GM), que se define como la raíz cuadrada del producto de la intensidad y la frecuencia relativas de cada descriptor. A partir de la media geométrica de los descriptores se elaboró el perfil sensorial de los vinos.

3. Resultados

3.1. Cinética fermentativa y dinámica de la población de levaduras

Los resultados de la actividad fermentativa de XG3 variaron dependiendo de la campaña y la bodega. En la **Fig. 1** se muestra la evolución de las fermentaciones en la bodega Priorato de Razamonde campaña 2020 en donde, a pesar de desarrollarse una fermentación algo más lenta, la levadura autóctona era capaz de finalizar el proceso satisfactoriamente. La utilización de un protector en la fase de rehidratación de la levadura, así como un manejo adecuado de la nutrición durante la fermentación, ambas prácticas de uso habitual en bodega, ayudaron a optimizar la competitividad y eficacia de XG3 en el transcurso de la fermentación.

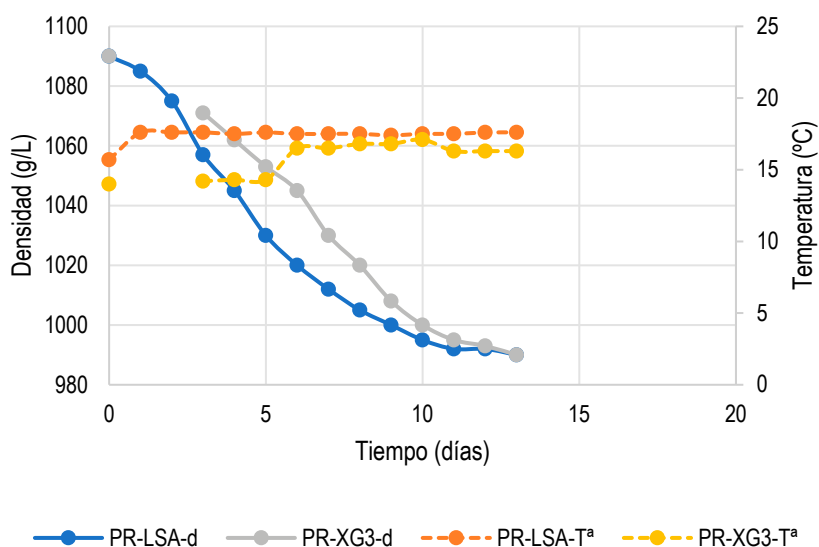


Fig. 1. Evolución de las fermentaciones en la bodega Priorato de Razamonde en 2020.

En cuanto a la dinámica de la población de levadura durante la fermentación en la **Tabla 2**, se observa que el número de levaduras viables en el mosto desfangado osciló entre 3,14 y 4,97 log CFU/mL. Este valor tan bajo en PR en 2020 es debido probablemente a un fuerte desfangado en esa campaña. Tras la inoculación de los depósitos la población de levaduras aumentó hasta el inicio de la fermentación y hasta la fase tumultuosa. En el caso de las bodegas PR e VT, la población se mantuvo en valores altos hasta el final, indicando una buena resiliencia de las cepas a las condiciones de la bodega y del vino. Sin embargo, en la bodega GD las fermentaciones mostraron la típica curva de crecimiento de microorganismos con aumento hasta mediados de fermentación para disminuir al final del proceso.

Tabla 2. Dinámica de la población de levaduras durante la fermentación

2019	PR		VT		GD	
	PR-LSA1	PR-XG3	VT-Esp	VT-XG3	GD-LSA4	GD-XG3
m	4,93	4,93	4,66	4,66	4,93	4,93
Fi	7,39	7,50	6,81	7,08		
Ft	7,68	7,50	7,86	8,07	7,02	7,71
Ff	7,66	7,57	7,96	7,86	5,87	8,17
2020	PR-LSA2	PR-XG3	VT-LSA3	VT-XG3	GD-LSA5	GD-XG3
m	3,14	3,14	4,97	4,97	4,84	4,84
Fi	7,95	7,80		6,59	7,74	7,84
Ft	7,76	7,84	8,26	8,26	7,94	
Ff	7,81	7,93	8,29	8,40	7,35	6,14



3.2. Control de implantación de las levaduras

El análisis genético de las levaduras aisladas en distintas fases de la fermentación confirmó una capacidad de implantación satisfactoria de las distintas cepas de *S. cerevisiae* inoculadas. En la Fig. 2 se puede observar que tanto las cepas comerciales como la cepa XG3 fueron las levaduras predominantes (100 % o > 90 %) en las fermentaciones donde se inocularon tanto en la bodega PR como en GD. Como excepción, en la bodega VT la cepa XG3 se implantó, pero los controles de esta instalación fermentaron de forma espontánea, de tal forma que estaban presentes distintas cepas de *S. cerevisiae* (datos no mostrados).

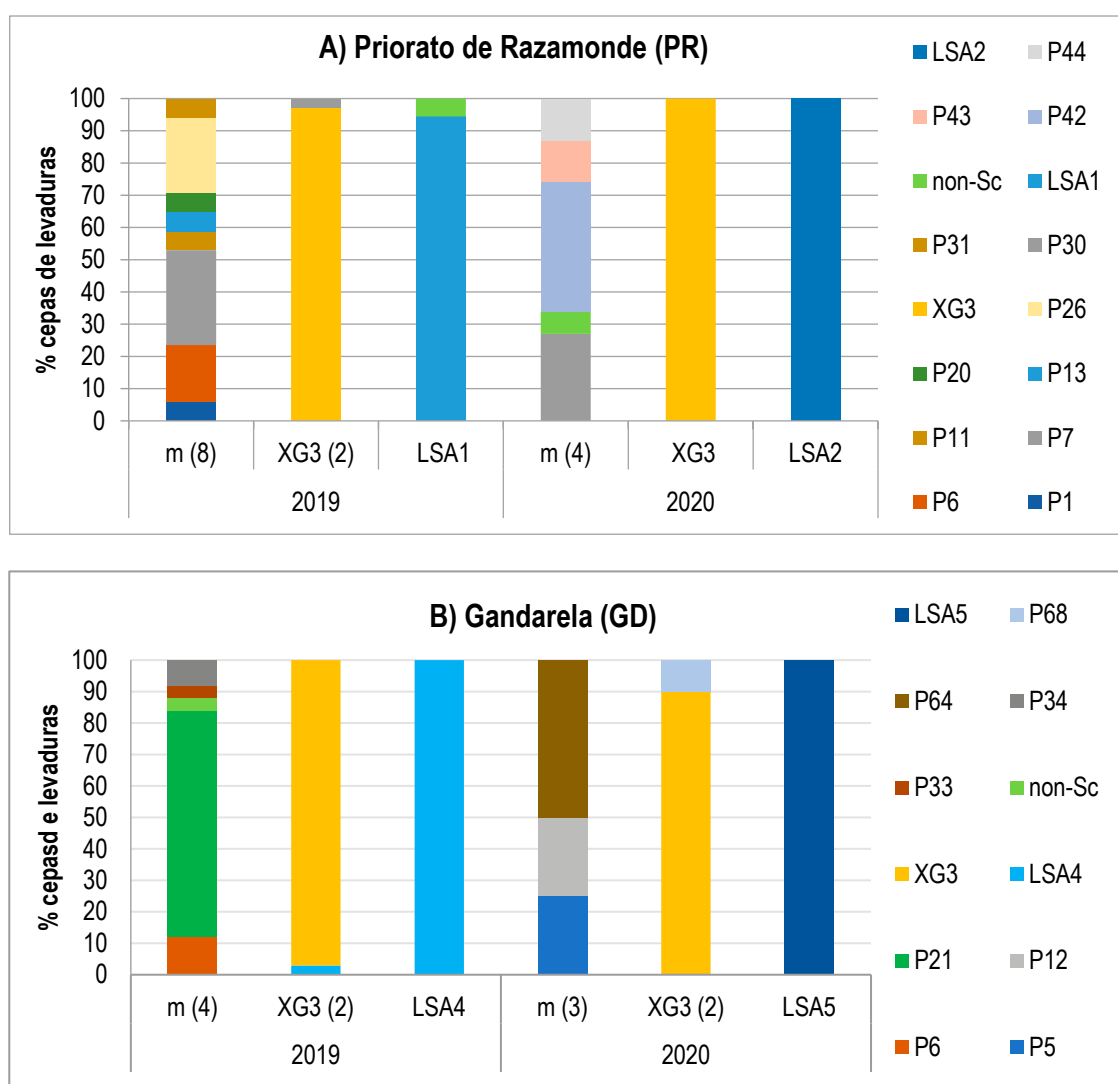


Fig. 2. Control de implantación de las cepas de *S. cerevisiae* en las bodegas Priorato de Razamonde (PR) y Gandarela (GD). P1 a P68, XG3, LSA1, LSA2, LSA4 y LSA 5 son diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Non-Sc son especies no-*Saccharomyces*.



3.3. Composición química de los vinos

Los resultados del análisis de los parámetros básicos de los vinos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Características químicas básicas de los vinos.

Parámetros	Priorato Razamonde				O'Ventesela				Gandarela			
	PR-LSA		PR-XG3		VT-LSA [§]		VT-XG3		GD-LSA		GD-XG3	
	2019	2020	2019	2020	201	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020
AT* (g/L)	6,1	5,5	6,8	6,3	4,5	4,6	4,7	5,5	5,6	4,9	5,9	4,4
AV** (g/L)	0,27	0,30	0,26	0,28	0,25	0,19	0,26	0,18	0,20	0,26	0,16	0,20
Ácido tartárico (g/L)	2,5	2,2	3,3	3,1	1,8	2,8	1,9	2,1	2,6	1,6	2,4	1,4
Glucosa + fructosa (g/L)	3,2	0,2	3,9	0,7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2
Glicerol (g/L)	4,3	5,0	5,0	5,1	4,0	4,8	5,0	5,7	6,3	6,5	6,2	5,5
Alcohol (% v/v)	13,1	13,2	12,8	13,0	13,2	12,8	13,0	12,6	12,2	14,0	12,9	12,9
pH	3,32	3,50	3,24	3,31	3,71	3,54	3,67	3,65	3,67	3,82	3,59	3,84
SO ₂ libre (mg/L)	43	44	42	36	10	10	10	10	12	10	10	12
SO ₂ total (mg/L)	92	125	93	96	69	118	52	83	92	48	69	68

*AT: acidez total expresada como g ácido tartárico /L; **AV: acidez volátil expresada como g ácido acético/L; §: fermentación espontánea en 2019.

Se observó una tendencia de la levadura autóctona XG3 a producir vinos con mayor acidez total y menos alcohol que las cepas comerciales con las que se comparó. Esta tendencia no la habíamos encontrado en estudios preliminares comparativos con otras cepas autóctonas utilizando la variedad Treixadura (Blanco y col., 2012) ni cuando se empleó mosto de las variedades Godello o Albariño (Blanco y col., 2013).

La composición volátil de los vinos incluyó las familias de alcoholes, compuestos C6, acetatos, ésteres etílicos y ácidos volátiles (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración (µg/L) de grupos de compuestos volátiles en los vinos, por bodega y campaña.

Grupo químico	Año	Priorato de Razamonde			O'Ventesela			Gandarela		
		PR-LSA	PR-XG3	Sig.	VT-LSA	VT-XG3	Sig.	GD-LSA	GD-XG3	Sig.
Alcoholes	2019	23947	34727	ns	31145	61864	ns	45665	59500	*
	2020	41824	34218	ns	35865	86599	*	46669	43471	ns
Compuestos C6	2019	537	704	ns	1451	1151	ns	825	1049	**
	2020	734	561	ns	1210	1163	ns	410	706	*
Acetatos	2019	13708	8468	**	6647	19068	**	17913	10106	***
	2020	10860	10150	ns	1693	10595	**	8405	10704	*
Esteres etílicos	2019	2676	2778	ns	5186	3443	ns	3853	2286	***
	2020	4236	4292	ns	3337	4150	ns	3065	4305	**
Ácidos volátiles	2019	17732	17365	ns	20684	15346	ns	22355	13773	***
	2020	15168	15230	ns	9113	11329	ns	14682	15918	ns

Sig: significancia *, **, y *** indican diferencias significativas para esa bodega y campaña a $p \leq 0.05$, 0.01, y 0.001, respectivamente; ns: no significativa.



Las mayores diferencias entre los vinos elaborados con la cepa autóctona y una comercial se encontraron en la bodega Gandarela donde XG3 contribuía a la diferenciación de los vinos en el contenido de acetatos, ésteres y compuestos C6 en ambas campañas. El contenido de acetatos era mayor en los vinos de O' Ventosela elaborados con XG3 y en Priorato de Razamonde en 2019. En 2020 se observó un aumento del contenido de ésteres etílicos y ácidos volátiles en los vinos elaborados con XG3 en todas las bodegas, aunque no siempre esas diferencias fueron significativas. El aumento de estas dos familias de compuestos por acción de la cepa XG3 también se describió previamente en vinos elaborados con las variedades Godello y Albariño (Blanco et al., 2013).

3.3. Evaluación sensorial de los vinos

En la campaña de 2019 los vinos elaborados con levadura comercial (LSA) obtuvieron mejor calificación para la intensidad y calidad aromática, aunque también fueron más herbáceos, sobre todo en la bodega PR. Sin embargo, en 2020 esto solo ocurrió en la bodega GD. En cuanto a los aromas florales y afrutados los vinos obtenidos con XG3 eran mejor valorados en las bodegas PR y VT en la añada 2019, y GD en la añada 2020 (Fig. 3).

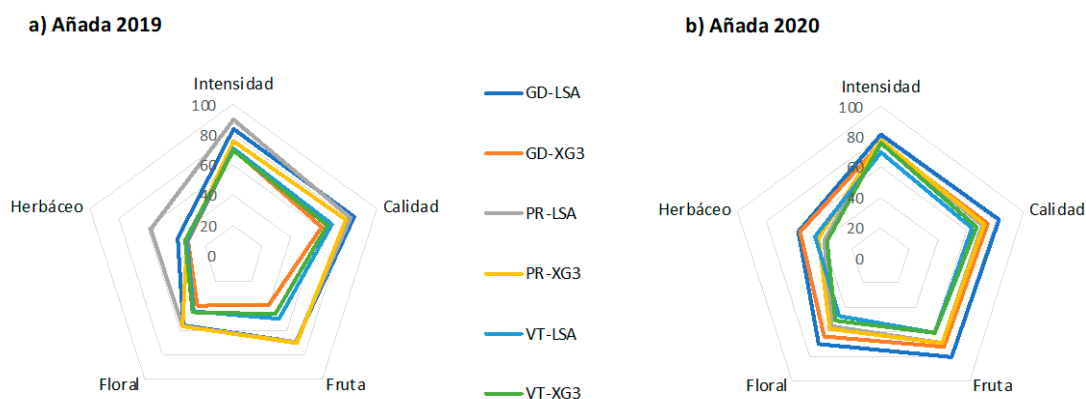


Fig 3. Evaluación sensorial de los vinos de a) 2019 y b) 2020 en las distintas bodegas.

4. Conclusiones

Saccharomyces cerevisiae XG3 es una levadura vínica autóctona, aislada en la DOP Ribeiro, que posee un buen potencial enológico para elaborar vinos de calidad. En formato de levadura seca activa, XG3 fermentó de forma satisfactoria mostos de la variedad Treixadura a escala industrial en varias bodegas, implantándose sobre otras levaduras del mosto. En el vino provocó un ligero aumento de la acidez y una reducción del grado alcohólico, ambas propiedades de interés para mitigar algunas de las consecuencias del cambio climático en enología. A nivel de composición volátil, XG3 incrementó la concentración de algunos compuestos responsables del aroma del vino, dependiendo de la bodega y la añada. Como resultado, los vinos resultantes mostraron perfiles sensoriales claramente diferentes de los elaborados con levaduras comerciales, respetando las características varietales. Por tanto, el uso de la levadura *S. cerevisiae* XG3



fomenta la diversificación de los vinos, y abre la posibilidad para las bodegas de disponer de una levadura de origen gallego en el mercado.

5. Bibliografía

1. BLANCO, P.; MIRÁS-AVALOS, JM.; SUÁREZ, V.; ORRIOLS, I. 2012. **Inoculation of Treixadura musts with autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains: fermentative performance and influence on the wine characteristics.** Food Sci Technol Int **19**:177–186.
2. BLANCO, P.; MIRÁS-AVALOS, JM.; PEREIRA E.; ORRIOLS, I. 2013. **Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains.** J Sci Food Agric. **93**: 2849-2857.
3. BLANCO, P.; MIRÁS-AVALOS, JM.; PEREIRA E.; FORNOS, D.; ORRIOLS, I. 2014. **Modulation of chemical and sensory characteristics of red wine from Mencía by using indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts strains.** J Int Sci Vigne Vin. **48** (1): 63-74.
4. OIV. International Organization of Wine. 2018. **Compendium of international methods of wine and must analysis.** Vol. 1 y 2. Paris.
<http://www.oiv.int>. <http://www.oiv.int/public/medias/4231/compendium-2016-en-vol1.pdf>
5. QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. 1992. **Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains.** Appl Environ Microbiol. **58**: 2948-2953
6. SWIEGERS, JH.; BARTOWSKY, EJ.; HENSCHKE, PA.; PRETORIUS, IS. 2005. **Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor.** Aust J Grape Wine R. **11**, 139-173.
7. VILANOVA, M.; GENISHEVA, Z.; MASA, A.; OLIVEIRA, J.M. 2010. **Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wine.** Microchemical J. **95**, 240-246.

6. Agradecimientos

Este estudio fue financiado a través del grupo operativo FEADER2018/042B con fondos del FEADER, de la Xunta de Galicia y del Ministerio de Agricultura e Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA). Los autores agradecen al Dr. Manuel Marcos (CACTI, Universidad de Vigo) por el servicio de GC-MS.

Aptitud enológica y rendimiento de variedades de vid recuperadas y adaptadas a zonas de alta montaña

Joaquín Montenegro¹, Laura Fraile¹, Raquel Chamorro¹, María Sánchez-Monfort¹, Pilar Gracia², Ernest Guasch², Manuel López-Vicente³, María del Carmen Antolín⁴, Yolanda Gogorcena¹

¹Grupo de Genómica de Frutales y Vid, Estación Experimental de Aula Dei (EEAD-CSIC), Avda de Montañana 1005, 50059 Zaragoza (Zaragoza). Email: aoiz@eead.csic.es

²Bodegas Bal Minuta S.C.P., C/Baja 7, 22637 Barbenuta (Huesca).

³Grupo Aquaterra, CICA, Universidade da Coruña, Campus de Elviña 15071 A Coruña.

⁴Universidad de Navarra-BIOMA, Grupo de Fisiología del Estrés en las Plantas (Unidad Asociada al CSIC; EEAD, Zaragoza), Irunlarrea 1, E-31008, Pamplona, Navarra.

Resumen

En el contexto del cambio climático actual se ha demostrado que las altas temperaturas suponen un adelanto de la fecha de maduración afectando también a las características y propiedades de la uva y a la calidad del vino. En este sentido es importante priorizar los estudios que permitan evaluar la adaptación de las variedades de vid a las distintas zonas de cultivo. En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio con variedades de vid antiguas y comerciales, adaptadas a la alta montaña, en la provincia de Huesca, entre 700 y 1300 m de altitud. Durante el periodo 2016-2020, se tomaron en vendimia los datos de producción y muestras de uvas, así como muestras de los vinos obtenidos de estas variedades. En lo referente a las uvas y el mosto, se han estudiado los parámetros correspondientes a la madurez tecnológica y a la madurez fenólica. En cuanto a los vinos, se han determinado los parámetros básicos tras el proceso de vinificación en todas las variedades, así como los aromas en algunos de ellos. Todos los vinos destacaron por su elevada acidez y aromas alcohólicos. La mezcla de vinos blancos destacó por sus aromas frutales y florales. Algunas de las variedades de uva destacaron por su nivel de producción, madurez fenólica y características del vino, lo que las define como variedades idóneas para su cultivo en estas zonas de estudio.

1. Introducción

En la actualidad, el cambio climático supone un reto necesario de abordar a corto y a largo plazo para mejorar el sector vitivinícola. Entre los principales efectos derivados del cambio climático, nos encontramos con un aumento de la temperatura y una falta de precipitaciones, lo que supone una disminución en la calidad y producción vitivinícola (Resco, 2012; Martínez et al., 2016).

Para finales de siglo se ha estimado un aumento medio de la temperatura global entre 1 y 4°C (IPCC, 2019). Temperaturas extremadamente cálidas pueden afectar negativamente a la vid, produciendo una aceleración de la floración y una madurez inadecuada de la uva. Como consecuencia de todo ello, se obtendrán vinos desequilibrados y de calidad deficiente (Jones et al., 2005).

Con el objetivo de paliar los impactos climatológicos que supone el cambio climático para la vid, es imprescindible estudiar nuevos sistemas de adaptación para el cultivo. El aumento de las



altas temperaturas puede tener menos impacto en los viñedos que se encuentran en las zonas frías como las de alta montaña. Uno de los objetivos de este estudio, ha sido la evaluación agronómica y aptitud enológica de variedades de vid cultivadas en viñedos situados entre 700 y 1300 m de altitud en la provincia de Huesca.

2. Material y Métodos

2.1. Material Vegetal

Se vendimió de manera manual durante las campañas de 2018, 2019 y 2020 en una viña ubicada en la localidad de Barbenuta (Biescas) a 1212 m de altitud y en tres viñas ubicadas a 673 m de altitud situadas en el valle de Hecho, entre las localidades de Javierregay y Embún. En la **Tabla 1** se incluye el nombre de la variedad, tipo de uva, la ubicación y los años de vendimia. De cada una de ellas en vendimia se recogieron 100 bayas para los análisis de uva y mosto.

Tabla 1. Variedades estudiadas, tipo de uva, año de vendimia y ubicación en origen.

Variedades Comerciales			
Variedad	Tipo de uva	Año	Localización
Cabernet Franc	Tinta	2018, 2019, 2020	Barbenuta, Biescas (Huesca)
Chardonnay	Blanca	2018, 2019, 2020	Barbenuta, Biescas (Huesca)
Garnacha Ángel	Tinta	2018, 2019, 2020	Entre Embún y Javierregay (Valle de Hecho, Huesca)
Garnacha Balén	Tinta	2018, 2019, 2020	Entre Embún y Javierregay (Valle de Hecho, Huesca)
Garnacha Sarnés	Tinta	2018, 2019, 2020	Entre Embún y Javierregay (Valle de Hecho, Huesca)
Gewürztraminer	Blanca	2018, 2019, 2020	Barbenuta, Biescas (Huesca)
Pinot Noir	Tinta	2018, 2019, 2020	Barbenuta, Biescas (Huesca)
Riesling	Blanca	2018, 2019, 2020	Barbenuta, Biescas (Huesca)
Variedades Desconocidas			
Variedad	Tipo de uva	Año	Localización
B1 (Oneca)*	Blanca	2018, 2019, 2020	Barbenuta, Biescas (Huesca)
B4	Tinta	2018	Barbenuta, Biescas (Huesca)
C2A	Blanca	2018, 2019	Barbenuta, Biescas (Huesca)

* La caracterización de esta variedad mediante SNPs dió como resultado el genotipo GEN_SNP_4132, y corresponde con la variedad registrada recientemente con el nombre de Oneca.



2.2. Producción

Los datos de producción de las viñas se recogieron en el periodo 2016-2020. Se calculó el rendimiento de las tres viñas de Garnacha en base a los kilogramos de cada variedad recogida y del número de cepas y hectáreas cultivadas.

2.3. Caracterización de la Aptitud Enológica

Análisis de la uva y del mosto

Los análisis de las muestras de uva y del mosto de las vendimias de 2018 y 2019 se realizaron según los métodos descritos en Torres et al., 2016, en la Unidad Asociada al CSIC de la Universidad de Navarra. Las determinaciones de los parámetros de **madurez tecnológica** para cada variedad se hicieron en tres muestras de quince bayas cada una y se midieron los Sólidos Solubles Totales (SST), con un refractómetro digital ABBE, y se expresaron como °Brix, el pH se determinó mediante un pHmetro Crison micropH 2000 y la acidez total (g TA/l) mediante una valoración ácido-base. El contenido de ácido L-málico (g/l) se determinó con el método enzimático, siguiendo las recomendaciones del fabricante *Enzytec L-Malic Acid; R-Biopharm (Darmstadt, Germany)*. Para las determinaciones de **la madurez fenólica** del mosto se tomaron tres repeticiones de veinte bayas de cada variedad. Se determinaron las siguientes características cromáticas: antocianos totales (extracto macerado a pH 1,0), antocianos extractables y el índice de polifenoles totales (IPT) (extracto macerado a pH 3,2).

Caracterización química del vino

La caracterización química del vino de las vendimias 2018, 2019 y 2020 se llevó a cabo según los métodos oficiales establecidos para el análisis vínico en el Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón. Los detalles de la metodología seguida están descritos en Sánchez-Monfort (2019). Se determinaron el grado alcohólico, el pH, contenido en azúcares reductores, extracto seco, acidez, total, ácido málico, ácido láctico, acidez volátil, el índice de polifenoles totales (IPT) y la intensidad de color. Los compuestos mayoritarios del vino se analizaron por cromatografía de gases de forma cuantitativa según el método propuesto por Ortega et al., 2001. Los detalles de la metodología seguida están descritos en Chamarro (2021). Además del estudio de los vinos procedentes de las distintas variedades de uva, se estudiaron las características de un 'Coupage' blanco elaborado a partir de una mezcla de las variedades Chardonnay, Gewürztraminer y Riesling; un 'Coupage' tinto, mezcla de Cabernet Franc, Garnacha Sarnés y Pinot Noir y una mezcla de las tres Garnachas denominada Garnacha tintas.

3. Resultados y Discusión

3.1. Producción

La **Fig. 1** representa los rendimientos medios en kg/cepa y kg/ha en las tres viñas de Garnacha en el periodo de estudio 2016-2020. No se encontraron diferencias significativas del rendimiento entre las 3 viñas en estudio, a pesar de que el manejo fue muy diferente en cada una de ellas. La notable dispersión encontrada en la producción en la viña de Garnacha Sarnés fue debida a efectos climatológicos puntuales (heladas) en alguno de sus años de estudio.

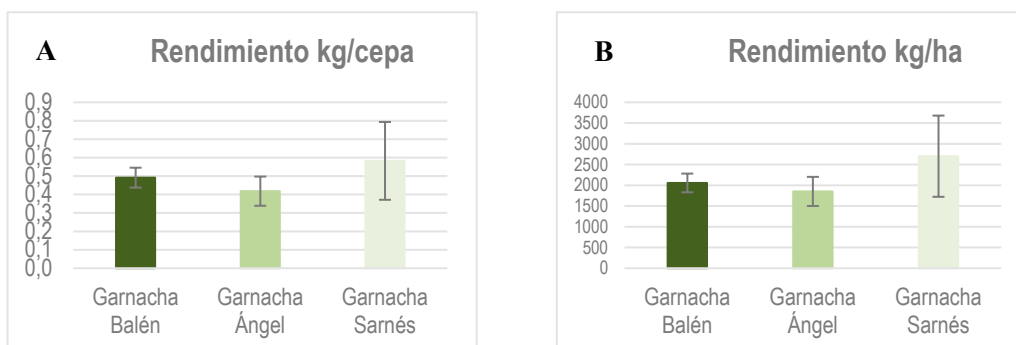


Fig.1. Rendimiento medio de la variedad Garnacha en las tres viñas de estudio en las vendimias del 2016 al 2020. (A) kg/cupa. y (B) kg/ha. Los datos son medias \pm error estándar (n=4-5).

3.2. Caracterización Enológica

3.2.1. Parámetros Analíticos del Mosto

En la **Tabla 2** se muestran los resultados sobre la **madurez tecnológica** de la uva recogida en las vendimias 2018 y 2019. Los datos son la media y el error estándar del peso de 100 bayas, y los °Brix, pH y acidez titulable son media de 3 réplicas de 15 bayas cada una. Se encontraron diferencias significativas entre variedades en todos parámetros de madurez tecnológica estudiados.

Tabla 2. Parámetros analizados para determinar la madurez tecnológica del mosto en las nueve variedades de vid estudiadas en las vendimias 2018 y 2019. Los datos son medias \pm error estándar (n=4-6). Para cada columna, las letras distintas indican diferencias significativas (Test de Duncan con $P \leq 0,05$)

Variedades	Vendimia	Peso 100 Bayas (g)	° Brix	pH	Acidez (g *TA/L)
Tintas					
Carbenet Franc	2018-2019	93.6 \pm 4.6 b	23.1 \pm 0.6 b	3.2 \pm 0.1 c	7.1 \pm 0.3 b
Garnacha Balén	2018-2019	162.8 \pm 4.4 d	25.2 \pm 0.2 d	3.2 \pm 0.1 bc	5.0 \pm 0.4 a
Pinot Noir	2018-2019	106.1 \pm 11.1 c	20.7 \pm 0.5 a	3.3 \pm 0.1 d	5.4 \pm 0.4 ab
Blancas					
B1	2018-2019	106.6 \pm 2.0 c	24.0 \pm 0.8 c	3.1 \pm 0.1 b	7.1 \pm 0.1 b
Chardonnay	2018-2019	103.2 \pm 2.3 bc	22.6 \pm 0.3 b	3.0 \pm 0.1 a	5.7 \pm 0.3 b
Gewürztraminer	2018-2019	63.3 \pm 1.2 a	21.0 \pm 0.2 a	3.3 \pm 0.1 d	4.9 \pm 0.2 a
Riesling	2018-2019	97.0 \pm 5.3 bc	21.1 \pm 0.4 a	3.4 \pm 0.1 d	8.4 \pm 0.3 c

*TA: ácido tartárico

En lo que respecta a los niveles de sólidos solubles totales (°Brix), destacó la variedad Garnacha Balén por su alto contenido (25,2 ° Brix), siendo Riesling, Gewürztraminer y Pinot Noir las variedades que menor contenido presentaron (21,1 ° Brix). En todas las variedades estudiadas se encontraron valores de pH en torno a 3.0, mientras que los valores de acidez total (g TA/L) fueron muy heterogéneos, siendo Riesling la variedad con mayor acidez (8,4 g TA/L), y Garnacha Balén y Gewürztraminer las variedades que menor acidez presentaron (\approx 5.0 g TA/L).



Analizando los parámetros que definen la madurez fenólica en las variedades tintas (Fig. 2), podemos decir que la variedad Cabernet Franc es la que más se diferenció significativamente del resto de variedades estudiadas, presentando mayor contenido en antocianos totales (mg/l), antocianos extractables (mg/l), intensidad de color, % extractabilidad e índice de polifenoles totales (IPT 280). Sin embargo, las variedades Garnacha Balén y Pinot Noir presentaron perfiles similares entre ellas, excepto para la tonalidad.

Nuestros resultados indican que Cabernet Franc presenta una serie de características que le confieren una ventaja adaptativa para su cultivo en alta montaña ya que produce un nivel de antocianos interesante por lo que la hacen recomendable para los Coupages tintos.

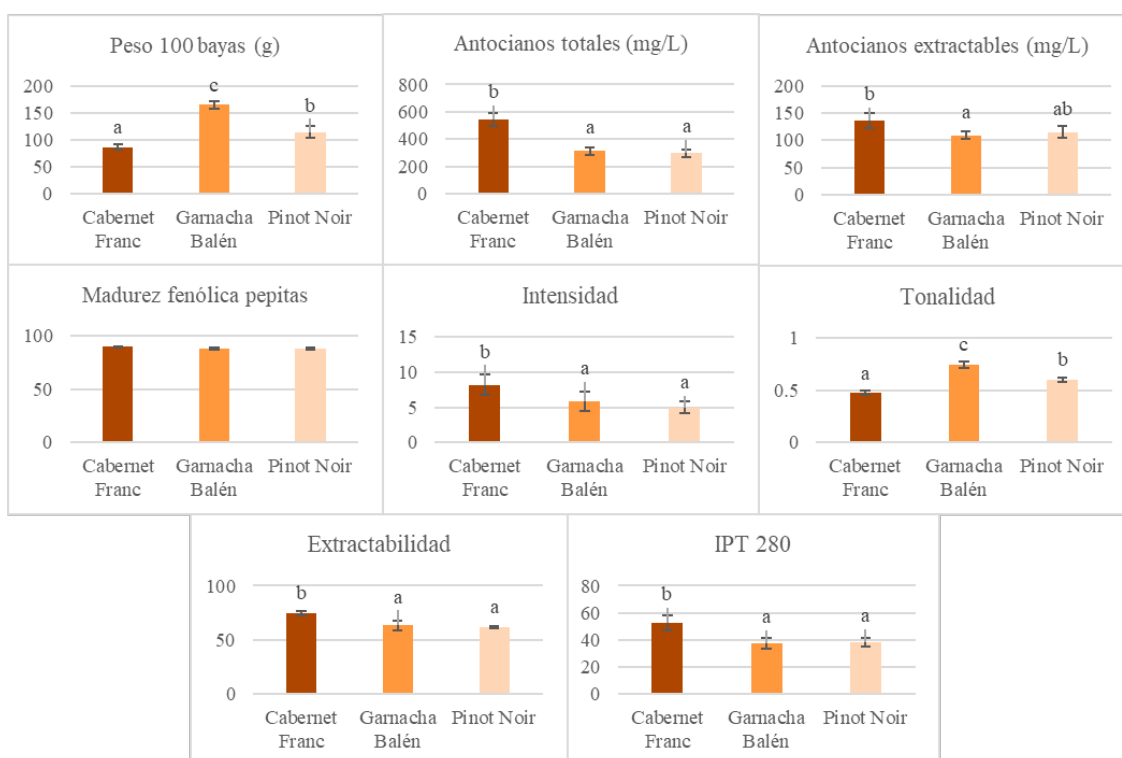


Fig.2. Parámetros analizados para determinar la madurez fenólica del mosto de las tres variedades tintas estudiadas en las vendimias 2018 y 2019. Los datos son medias \pm error estándar (n=6). Para cada barra, las distintas letras indican diferencias significativas (Test de Duncan con $P \leq 0,05$).

3.2.1. Parámetros Analíticos del Vino

Los resultados referentes a las analíticas del vino de las nueve variedades y los tres 'Coupages' estudiados en las vendimias 2018, 2019 y 2020 se encuentran dentro de los rangos establecidos para los tipos de vinos blancos y tintos (datos no mostrados). Los parámetros significativamente distintos fueron más altos en los vinos tintos que en los vinos blancos, a excepción del contenido de azúcares reductores, acidez total y ácido málico. Aunque no se analizaron todos los vinos en los mismos años, los resultados del vino indicaron que todas las variedades presentaron buenas aptitudes enológicas y aptas para ser cultivadas en zonas de alta montaña. Destacaron los vinos de las variedades Garnacha Balén y Cabernet Franc por su elevada intensidad de color y por su alto contenido en polifenoles totales. Por el contrario, la



variedad B4 (una variedad antigua recuperada en la zona de Barbenuta con un perfil genético desconocido) presentó valores de grado alcohólico, acidez, intensidad de color e IPT 280, inferiores al resto de las variedades tintas comerciales. Con todos estos datos se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP) para poder discernir en su conjunto el efecto de los parámetros analíticos del vino en las variedades y Coupage estudiados (Fig.3.). Los dos ejes explican un 72,64 % de la variabilidad total, el 46 % se recoge sobre el eje de abscisas y el 26,4 % sobre el eje de las ordenadas. En la Fig. 3, se observa cómo los vinos obtenidos de las variedades blancas B1, C2A, Riesling, Chardonnay y del Coupage de blancos se asociaron con niveles altos de acidez total y contenido en ácido málico y valores bajos de pH, mientras que los vinos tintos, a excepción de la variedad B4, se asociaron con altos contenidos de extractos secos, azúcares reductores, intensidad de color e IPT 280. Se separan los vinos procedentes de la variedad Gewürztraminer por su alto valor de pH y su bajo contenido de ácido málico y acidez total, y los vinos de la variedad B4 por presentar valores bajos en el contenido de extractos secos, azúcares reductores, intensidad de color e IPT 280.

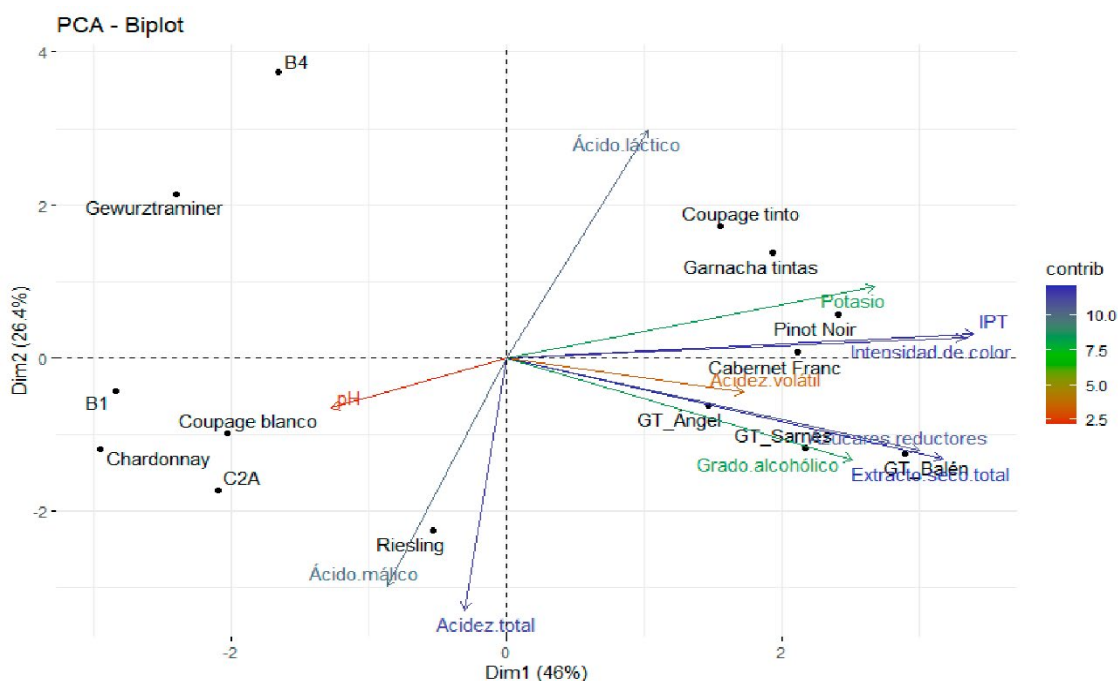


Fig.3. Análisis de Componentes Principales (ACP) de los parámetros analíticos del vino en las 14 muestras estudiadas (Coupage blanco: Chardonnay, Gewürztraminer y Riesling; Coupage tinto: Carbernet Franc, Garnacha Sarnés y Pinot Noir; Garnacha tintas: Coupage de Garnachas).

Se determinaron también los compuestos mayoritarios, pero solo en los vinos de los Coupage blanco, tinto y de mezcla de Garnachas (datos no mostrados). El Coupage blanco y los tintos presentaron perfiles aromáticos distintos entre sí. El Coupage tinto presentó una predominancia de los grupos alcoholes, esteres varios y lactonas, otorgando aromas verdes, alcohol y melocotón, mientras que en el Coupage blanco predominaron los grupos de acetatos y esteres lineales, otorgando aromas frutales, florales y parcialmente disolventes.



4. Conclusiones

1. La caracterización molecular mediante SNPs de la variedad B1, recogida en una viña familiar en Barbenuta (Huesca), resultó ser la misma variedad recuperada en un viñedo de Navarra y recientemente registrada por el Gobierno de Navarra e incluida en el catálogo de variedades comerciales con el nombre de ONECA.

2. Todas las variedades en estudio alcanzaron una óptima madurez tecnológica en alta montaña.

3. Los mostos de las variedades tintas analizadas presentaron valores adecuados de madurez fenólica. Destacó la variedad Cabernet Franc por su alto contenido en antocianos totales, antocianos extractables, intensidad, extractabilidad e IPT 280.

4. Las variedades comerciales, Cabernet Franc y Pinot Noir cultivadas a 1200 m de altitud y las Garnachas cultivadas a 600 m, presentaron aptitudes enológicas adecuadas para su elaboración y crianza.

5. Los Coupage tintos (Coupage de Garnachas y Coupage de Carbernet Franc, Garnacha Sarnés y Pinot Noir) destacaron por los aromas alcohólicos, mientras que en el Coupage blanco (Chardonnay, Gewürztraminer y Riesling) predominaron los aromas a frutales y florales.

6. Todas las variedades evaluadas en este trabajo están bien adaptadas a las zonas de alta montaña, produciendo vinos con buena intensidad de color y menor grado alcohólico, contrarrestando en gran medida las amenazas del cambio climático para el cultivo de vid y la producción de vinos.

5. Bibliografía

1. CHAMORRO, R. 2021. **Aptitud enológicas y rendimiento de variedades de vid recuperadas y adaptadas a zonas de montaña: Interés en el actual contexto del cambio climático.** Trabajo Fin de Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural. Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Diciembre 2021.
2. MARTÍNEZ, A.; ALEIXANDRE TUDÓ, J.L.; ALEIXANDRE BENAVENT, J.L. 2016. **Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos.** *Enovicultura*, 42, pp. 4-26. Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/92945/Enovicultura%20N%c2%ba42%20pags%204_26.pdf?sequence=1&isAllowed=y [Consultado 19-04-2023].
3. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPPC). 2019. **Climate change and land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems**, pp. 77-131. Geneva: IPCC.



4. JONES, G. V.; WHITE, M. A.; COOPER, O. R.; STORCHMANN, K. 2005. **Climate change and global wine quality**. *Climate Change*, 73(3), pp. 319-343. DOI: 10.1007/s10584-005-4704-2.
5. ORTEGA, C.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA, V. 2001. **Fast analysis of important wine volatile compounds development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dichloromethane microextracts**. *Journal of Chromatography, A* 923, 205-214.
6. RESCO, P. 2012. **Impacto del cambio climático en el viñedo en España**. Trabajo de Fin de Grado. Universidad Politécnica de Madrid.
7. SÁNCHEZ-MONFORT, M. **Estudio de la aptitud enológica de variedades de vid adaptadas a zona de montaña**. Trabajo Fin de Grado. Escuela Politécnica Superior de Huesca. Universidad de Zaragoza. Febrero 2019.
8. TORRES, N.; GOICOECHEA N.; MORALES F.; ANTOLÍN M.C. 2016. **Berry quality and antioxidant properties in *Vitis vinifera* cv. Tempranillo as affected by clonal variability, mycorrhizal inoculation and temperature**. *Crop and Pasture Science*, 67, 961-977.

6. Agradecimientos

Este trabajo se ha llevado a cabo en el marco del proyecto “Vinos de Altura” **GCP-2018-998-00** co-financiado por el Programa de Desarrollo Rural de Aragón sub-medida 16.2 (2014-2020) y FEADER. Se agradece la coordinación al Ayuntamiento de Biescas, y a los socios participantes. Agradecemos la asistencia técnica de Mónica Oyarzun y Héctor Santesteban del Grupo de Fisiología del Estrés en Plantas, Unidad Asociada al CSIC de la Universidad de Navarra (EEAD-ICVV-UNAV), de Antonio López, Yolanda Andreu y personal de la Unidad Técnica de Alimentación, Área de Uvas, Vinos derivados del Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón, de Carlos Lahoz de la Unidad Técnica de Plantas de Vivero del Centro de Sanidad y Certificación Vegetal del Gobierno de Aragón, de Javier Ibáñez del Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV-CSIC) y de Jose Felix Cibriáin de EVENA, Gobierno de Navarra.

Caracterización de vinos elaborados por Maceración Carbónica

Pilar Santamaría, Patrocinio Garijo, Beatriz Larreina, Javier Portu, Lucía González-Arenzana, Isabel López-Alfaro, Susana Sanz, Ana Rosa Gutiérrez

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja, CSIC). Finca La Grajera, Ctra. LO-20- salida 13, 26071, Logroño, España. +34941894980. ana-rosa.gutierrez@unirioja.es

Resumen

A pesar de que los vinos de Maceración Carbónica (MC) son considerados como vinos de alta calidad, los trabajos científicos que describan sus características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales son muy escasos. Por ello en este trabajo se ha pretendido caracterizarlos desde distintos puntos de vista mediante diferentes ensayos experimentales y análisis de vinos del mercado.

De los resultados obtenidos se puede concluir que, desde un punto de vista microbiológico, la vinificación por MC es más compleja que la elaboración por despalillado, debido a una presencia mayor de microorganismos en todas las etapas del proceso. Por otra parte, en la vinificación por MC se obtienen distintas fracciones de vino con características organolépticas y composición fisicoquímica muy distinta, siendo el vino de prensa el de mayor calidad sensorial. Sin embargo, el vino de lágrima tiene unas características fisicoquímicas similares en muchos parámetros a los elaborados mediante despalillado, pero con diferencias importantes en el grado alcohólico y la acidez. Por ello, esta técnica podría utilizarse como herramienta para combatir algunos efectos del cambio climático. La comercialización independiente de las distintas fracciones de vino permitiría a las bodegas responder a diferentes demandas del mercado a partir de la misma elaboración, por lo que esta técnica podría considerarse económicamente muy atractiva para la diversificación de los vinos.

1. Introducción

La vinificación Maceración Carbónica consiste en someter las uvas a condiciones anaeróbicas (Flanzy, 2003). Así, los racimos de uva intactos, sin despalillar ni estrujar, se introducen en depósitos y se mantienen bajo una atmósfera de dióxido de carbono. En estas condiciones anaeróbicas, se produce una fermentación intracelular (FI) en el interior de las uvas enteras que desencadena la producción de alcohol, la degradación del ácido málico, fenómenos pectolíticos y proteolíticos, la formación de compuestos volátiles y la difusión de compuestos fenólicos de la piel a la pulpa (Tesniere & Flanzy, 2011). Sin embargo, algunas de las uvas se rompen con el llenado de los depósitos y liberan su zumo en el fondo del depósito, donde fermenta por acción de las levaduras. Por lo tanto, la FI de las uvas enteras y la fermentación alcohólica (FA) por las levaduras del mosto se producen simultáneamente en el depósito. Tras esta primera fase, se procede al descube del depósito, obteniendo un vino parcialmente fermentado denominado "lágrima" (LMC). Por otra parte, la fracción sólida formada por las uvas que han permanecido enteras se prensa, dando lugar al vino de prensa (PMC). A continuación, comienza una segunda fase en la que ambos vinos, mezclados o separados, completan su FA por levaduras



y la fermentación maloláctica (FML) por bacterias lácticas (BL). Los vinos MC son muy diferentes de los producidos por el método tradicional mediante despalillado y estrujado (DE). Se describen como vinos tintos ligeros con bajo contenido en taninos, más aromáticos, con menor intensidad de color y sabores frutales más intensos; tienen una vida más corta y deben consumirse pronto (Castillo-Sánchez et al., 2006; Etaio et al., 2009).

En este trabajo se ha caracterizado la vinificación por MC describiendo las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales de los vinos obtenidos mediante diferentes ensayos experimentales y análisis de vinos del mercado.

2. Material y Métodos

Se llevaron a cabo diferentes vinificaciones en bodega experimental durante las campañas de 2019, 2020 y 2021. En todas ellas se realizaron elaboraciones por MC separando las fracciones lágrima y prensa, y teniendo como testigo un vino elaborado por despalillado y estrujado a partir de la misma partida de uva. Todas las elaboraciones se realizaron por triplicado.

Los vinos elaborados se analizaron fisicoquímicamente según los métodos oficiales de la Comunidad Europea (ECC, 1990) y con autoanalizador por métodos enzimáticos. El análisis de los compuestos aromáticos fermentativos se realizó siguiendo el método descrito por Ortega et al. (2001), con pequeñas modificaciones. Los análisis sensoriales se realizaron una vez finalizada la FML. Las muestras se evaluaron de acuerdo con una categorización verbal de la diferencia entre cada una de ellas y la muestra de control elaborada por despalillado (ninguna diferencia, diferencia leve, moderada y grande).

La población microbiana presente (levaduras y bacterias) se analizó en cuatro de las fases del proceso de vinificación: 24 h después del encubado (M1), en fermentación tumultuosa (M2), al final de la FA (M3) y al final de la FML (M4). Para ello, se sembraron diluciones seriadas de las muestras en diferentes medios de cultivo (GYP para levaduras, MRS para bacterias lácticas y Manitol para bacterias acéticas) y se encubaron en las condiciones adecuadas para cada microorganismo. Al final de los periodos de incubación, se procedió al recuento (ufc/mL) en las placas con 30-300 colonias. Se aislaron 10 colonias al azar por placa para su posterior identificación a nivel de especie mediante el sistema MALDI-TOF.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para todos los resultados analíticos determinados para los distintos vinos con el programa IBM® SPSS® Statistic versión 26. En el análisis sensorial, cada veredicto de la escala se convirtió al número correspondiente según Meilgaard et al. (2016). Se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y se establecieron diferencias significativas mediante la prueba U de Mann-Whitney ($p < 0,05-0,01$).

3. Resultados

En la campaña de 2019 se optimizaron las condiciones de elaboración por MC a pequeña escala (Santamaría et al., 2021 a y b). En las siguientes campañas se llevaron a cabo las vinificaciones en diferentes condiciones, lo que nos permitió caracterizar tanto los vinos elaborados, como los microorganismos presentes durante el proceso.



En lo referente a las poblaciones de **levaduras** presentes durante las elaboraciones, se observaron recuentos similares a lo largo de la fermentación en los tres tipos de vinos (elaboración tradicional, y lágrima y prensa procedentes de la MC), mientras que sólo se detectaron diferencias entre ellas en el muestreo realizado después de la FML (Fig. 1). Las dos fracciones obtenidas por MC contenían una mayor población residual de levaduras en los vinos acabados, lo que podría comprometer su estabilidad durante el almacenamiento (Etiévant et al., 1989). En las primeras fases de la fermentación alcohólica, las diferentes condiciones de vinificación de los vinos MC parecen favorecer la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* (datos no mostrados).

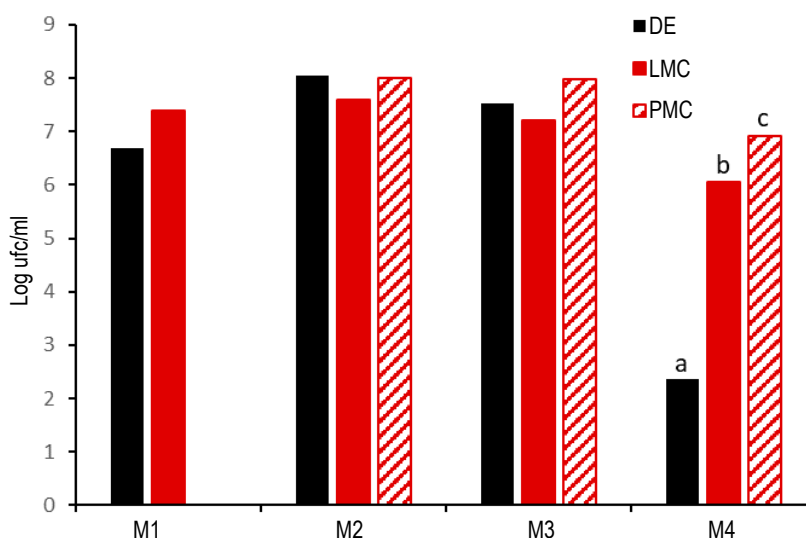


Fig. 1. Recuento de levaduras en cuatro momentos de la elaboración: 24 h después del encubado (M1), en fermentación tumultuosa (M2), al final de la FA (M3) y al final de la FML (M4). Elaboración con despalillado y estrujado (DE), y vinos de lágrima (LCM) y de prensa (PMC) procedentes de maceración carbónica.

Con respecto a las **bacterias lácticas** presentes en los depósitos durante el encubado, los vinos MC presentaban niveles claramente superiores a los vinos DE (Fig. 2), lo que justificaría su FML más rápida, pero también podría comprometer su conservación (Viridis et al., 2021). *Oenococcus oeni* fue la única especie detectada al final de la FML en los vinos elaborados por MC, mientras que en DE también se detectaron especies de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* en ese momento (datos no mostrados).

La población de **bacterias acéticas** presentes a lo largo de las fermentaciones disminuyó en todos los casos debido a las condiciones anaeróbicas de los tanques de vinificación, ya que las bacterias acéticas son microorganismos aerobios. Después de la FML, estas bacterias se detectaron en los vinos MC, pero no en los vinos DE. Al igual que en el caso de levaduras y BL, esta mayor presencia de microorganismos en los vinos terminados de MC podría amenazar su conservación, si las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas (Bartowsky and Henschke, 2008).

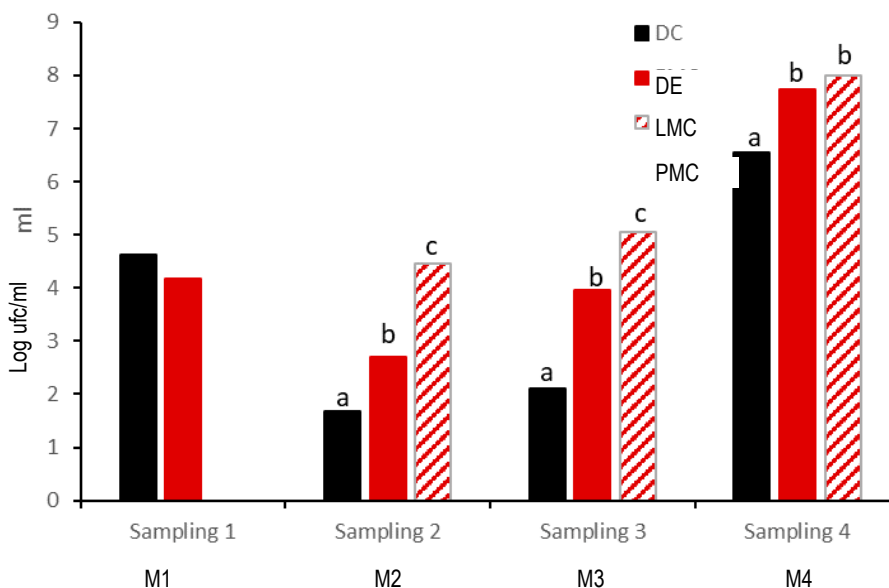


Fig. 2. Recuento de bacterias lácticas en cuatro momentos de la elaboración: 24 h después del encubado (M1), en fermentación tumultuosa (M2), al final de la FA (M3) y al final de la FML (M4). Elaboración con despalillado y estrujado (DE), y vinos de lágrima (LCM) y de prensa (PMC) procedentes de maceración carbónica.

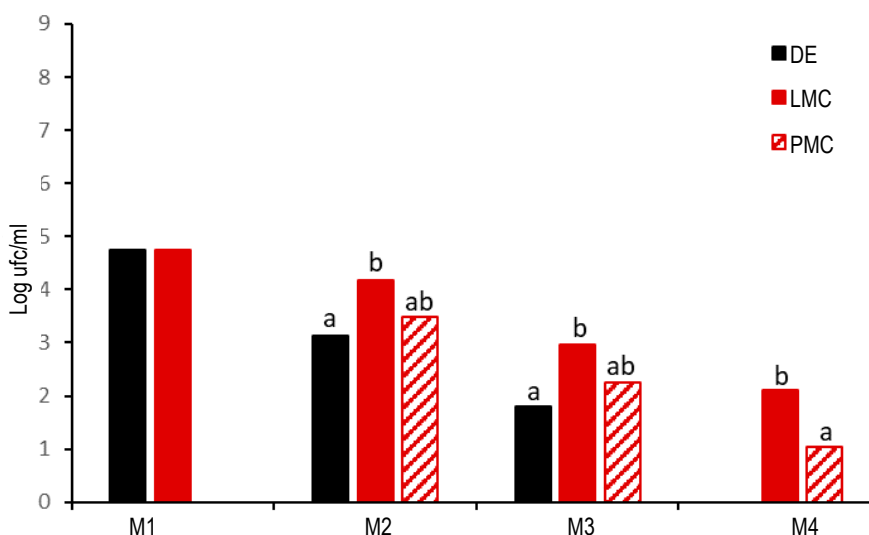


Fig. 3. Recuento de bacterias acéticas en cuatro momentos de la elaboración: 24 h después del encubado (M1), en fermentación tumultuosa (M2), al final de la FA (M3) y al final de la FML (M4). Elaboración con despalillado y estrujado (DE), y vinos de lágrima (LCM) y de prensa (PMC) procedentes de maceración carbónica.

También hubo diferencias significativas en los valores de los parámetros químicos de los tres tipos de vinos (datos no mostrados). La composición fisicoquímica de los vinos DE era similar a la de la fracción LCM, mientras que la de los vinos PMC era muy diferente. Además, los vinos



LMC presentaban concentraciones menores de compuestos aromáticos (alcoholes superiores, ésteres y ácidos). En la caracterización organoléptica, los vinos PMC fueron considerados como los mejores, tanto para los parámetros olfativos como gustativos.

El hecho más sorprendente fue la baja graduación alcohólica de los vinos LMC. Flanzly (2003) describió que, durante el encubado de uvas enteras se produce una evaporación del etanol generado por la fermentación del mosto (LMC), que es absorbido por las uvas enteras y que dará lugar posteriormente al vino de prensa. Este hecho justificaría las diferencias de grado alcohólico de las dos fracciones, y también que el grado alcohólico del vino de prensa sea superior al del DE. Pero si consideramos los rendimientos vínicos de las dos fracciones, PMC y LMC, su mezcla daría lugar a un grado alcohólico final similar al obtenido en los vinos DE. Esto justificaría el hecho de que los vinos comerciales de MC tengan una graduación similar a los de DE (González-Arenzana et al., 2020), ya que las bodegas no suelen separar ambas fracciones. Estas diferencias en el grado alcohólico de ambas fracciones obtenidas por MC se han observado repetidamente en todos los ensayos realizados durante los tres años (datos no mostrados). Estos resultados indican que podrían obtenerse vinos con contenido alcohólico reducido de forma sencilla, utilizando únicamente la fracción LMC. El menor contenido alcohólico de la fracción LMC también provocó que estos vinos tuvieran una mayor cantidad de ácido tartárico en solución y, por tanto, una mayor acidez total. Por lo tanto, este método de vinificación podría ser una alternativa para combatir el aumento de grado y la pérdida de acidez que se producen como consecuencia del cambio climático en una parte del vino obtenido.

4. Conclusiones

La vinificación por MC se lleva a cabo en condiciones muy diferentes a la elaboración por despalillado y estrujado. Esta situación provoca diferencias tanto en los microorganismos que conducen las fermentaciones como en la población residual de los vinos terminados. La FI, proceso exclusivo de la vinificación por MC, y probablemente también las diferencias microbiológicas, conducen a la obtención de vinos con características fisicoquímicas y organolépticas muy diferentes. La separación de diferentes fracciones de vino en las elaboraciones por MC, permite obtener vinos con características muy diferentes, especialmente en el grado alcohólico. La comercialización independiente de las distintas fracciones de vino permitiría a las bodegas responder a diferentes demandas del mercado a partir de la misma elaboración.

5. Bibliografía

1. BARTOWSKY, E.; HENSCHKE, P.A. 2008. **Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review**. Int J Food Microbiol 125 60-70.
2. CASTILLO-SÁNCHEZ, J.J.; MEJUTO, J.C.; GARRIDO, J.; GARCÍA-FALCÓN, S. 2006. **Influence of wine-making protocol and fining agents on the evolution of the anthocyanin content, colour and general organoleptic quality of Vinhao wines**. Food Chem 97 130-136.
3. ETAIO, I.; ELORTONDO, F.J.P.; ALBISU, M.; GASTON, E.; OJEDA, M.; SCHICH, P. 2008. **Sensory attribute evolution in bottled young red wines from Rioja Alavesa**. Eur Food Res Tech 228 695-705.



4. ETIÉVANT, P.; ISSANCHOU, S.; MAERIE, S.; DUCRUET, V.; FLANZY, C.S. 1989. **Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma: influence of carbonic maceration and time storage.** *Sci Aliments* 9 19-33.
5. EUROPEAN COMMUNITY (1990). **Commission Regulation Vo. 2676/90 concerning the establishment of common analytical methods in the sector of wine.** *Off J Eur Communities* L272, 1-192.
6. FLANZY, C. 2003. **Vinificación por maceración carbónica.** In: **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos.** A. Madrid Vicente Ediciones. ISBN 84-8476-074-X 84-89922-74-8.
7. GONZÁLEZ-ARENZANA, L.; SANTAMARÍA, R.; ESCRIBANO-VIANA, R.; PORTU, J.; GARIJO, P.; LÓPEZ-ALFARO, I.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P.; GUTIÉRREZ, A.R. 2020. **Influence of the carbonic maceration winemaking method on the physicochemical, colour, aromatic and microbiological features of tempranillo red wines.** *Food Chem* 319 126569.
8. MEILGAARD, M.C.; CIVILLE G.V.; CARR, B.T. 2016. **Sensory Evaluation Techniques** (5th ed.). CRC Press.
9. ORTEGA, C.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA, V. 2001. **Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichlorometane microextracts.** *J Chromatography A* 923, 205-214.
10. SANTAMARÍA, P.; GONZÁLEZ-ARENZANA, L.; ESCRIBANO-VIANA, R.; GARIJO, P.; LÓPEZ, R.; SANZ, S.; GUTIÉRREZ, A.R. 2022a. **Difficulties associated with small-scale production of carbonic maceration wines.** *Fermentation* 8 27.
11. SANTAMARÍA, P.; GONZÁLEZ-ARENZANA, L.; ESCRIBANO-VIANA, R.; GARIJO, P.; SANZ, S.; GUTIÉRREZ, A.R. 2022b. **Influence of the temperature and the origin of CO₂ (anaerobiosis methodology) on the intracellular fermentation of wines made by carbonic maceration.** *J Sci Food Agr* 102 6163-6168.
12. TESNIERE, C.; FLANZY, C. 2011. **Carbonic maceration wines: characteristics and winemaking process.** In: **Advances in Food Nutrition Research.** Jackson RS (Burlington, Academic Press Elsevier). ISBN 978-0128150894.
13. VIRDIS, C.; SUMBY, K.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. 2021. **Lactic acid bacteria in wine: technological advances and evaluation of their functional role.** *Front Microbiol* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.612118>

6. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por la Agencia Española de Investigación MCIN/AEI 10.13039/501100011033, Proyecto RTI2018-096051.

Fermentación aeróbica para reducir el grado alcohólico

Pilar Morales, Andrea M. Guindal, Laura López-Berges, Cristina Juez, Jordi Tronchoni, Alda J. Rodrigues, Jose Antonio Curiel, Ramón González

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Gobierno de la Rioja, Universidad de La Rioja), Finca La Grajera, Carretera de Burgos km 6, 26007 Logroño, La Rioja, España. 941894984. pilar.morales@icvv.es

Resumen

Uno de los problemas que afronta la industria vitivinícola de los últimos años es el incremento del grado alcohólico de los vinos. En 2013, nuestro grupo de investigación propuso un proceso alternativo de fermentación para la reducción de grado. El objetivo es que las levaduras respiren parte de los azúcares, para lo que se debe proporcionar aire activamente durante bastante tiempo. Tras una caracterización de cepas de levaduras no-*Saccharomyces*, se establecieron el rendimiento en etanol, la producción de acético, y la cantidad de azúcares consumida durante la aireación como criterios de selección. En un ensayo de prueba de concepto obtuvimos una bajada de 3,6% de etanol (v/v), mayor que las conseguidas con estas levaduras en un proceso tradicional, en fermentaciones aeróbicas coinoculadas con *Saccharomyces cerevisiae* y *Metschnikowia pulcherrima*. Además, observamos que las cepas de *S. cerevisiae* también permitían bajar el grado alcohólico en condiciones aeróbicas, pero producían un incremento de ácido acético que impedía su utilización. Para poder utilizar *S. cerevisiae* en solitario, haciendo el proceso más sencillo y fácil de controlar, hemos recurrido a la mejora genética por evolución dirigida. También hemos explorado la diversidad natural, para identificar cepas de *S. cerevisiae* que no produzcan un incremento de acético en condiciones aeróbicas. Recientemente hemos patentado la utilización de una cepa de *S. cerevisiae* en condiciones de aireación definidas. El uso de *M. pulcherrima* con esta cepa de *S. cerevisiae* facilita la gestión de la aireación.

1. Introducción

Aunque el vino forma parte de la dieta mediterránea, paradigma de dieta saludable, y se ha mostrado un efecto beneficioso de la ingesta moderada de vino para prevenir ciertas enfermedades, lo cierto es que no existe consenso sobre una dosis beneficiosa de manera general. Por el contrario, la organización mundial de la salud alerta sobre los efectos nocivos del alcohol en la salud, y también sobre el fomento de conductas violentas o peligrosas. Por otra parte, debido al cambio climático, pero también a las tendencias actuales de mercado, el contenido en alcohol de los vinos está incrementando desde hace unas décadas. Esto agrava las connotaciones negativas sobre el consumo de vino, y aumenta su precio en muchos mercados debido a impuestos y tasas asociados al contenido alcohólico. El sector está buscando soluciones a esta amenaza en todas las etapas del proceso, desde el material vegetal y el manejo del cultivo, hasta el proceso fermentativo y la desalcoholización parcial del producto final. Desde una perspectiva microbiológica, la estrategia principal para reducir el grado alcohólico pasa por reducir el rendimiento en la conversión del azúcar del mosto en etanol.



Saccharomyces cerevisiae es la principal especie responsable de la fermentación alcohólica. Aunque esta especie es minoritaria en el mosto, se impone rápidamente sobre las otras especies, siendo claramente dominante desde las fases intermedias del proceso. Por ese motivo es también la especie que se utiliza como cultivo iniciador para garantizar la calidad de los vinos y la fiabilidad de la fermentación. Todo esto la convierte en la principal especie en la que fijarse para reducir el rendimiento alcohólico. Sin embargo, la variabilidad natural de este carácter es muy baja (Palacios et al 2007), por lo que hasta ahora no se han identificado cepas naturales de *S. cerevisiae* que permitan reducir el contenido en etanol de manera relevante (Palacios et al 2007). Algunos investigadores han tratado de modificar mediante ingeniería genética el metabolismo de esta especie, para convertir parte de los azúcares en productos distintos al etanol, como ácido láctico o glicerol. Sin embargo, además de los problemas comerciales y costes de puesta en el mercado a los que se enfrentaría un vino elaborado con levaduras modificadas genéticamente, los resultados de laboratorio con las cepas modificadas nunca han sido totalmente satisfactorios, generalmente por la producción de otros metabolitos distintos al deseado. Una alternativa más viable comercialmente para la mejora genética de *S. cerevisiae* es la evolución dirigida, ya que las levaduras mejoradas por esta metodología no son consideradas OMGs.

También es interesante la variabilidad en el rendimiento en etanol de levaduras no-*Saccharomyces*, por lo que han sido objeto de estudio para producir vinos con un menor grado alcohólico. Hay que tener en cuenta que, en general, estas levaduras no son capaces de terminar la fermentación alcohólica, por lo que se utilizan en combinación con *S. cerevisiae*. En la última década se ha empezado a considerar el uso de estas levaduras para producir vinos con un menor grado alcohólico. Aunque ya se cuenta con cepas en el mercado para este propósito, son muy pocos los casos en que la bajada de grado supera el 1%, y en la mayor parte de ellos no se ha estudiado el impacto sensorial. Para aprovechar su potencial tecnológico, estas levaduras deben cumplir otros requisitos para ser realmente útiles en aplicaciones enológicas (Gonzalez et al 2021).

Propuesta del Grupo Microwine: Uso de levaduras no-*Saccharomyces* en condiciones aeróbicas.

Si se quiere disminuir la producción de etanol sin recurrir a una parada de fermentación, el azúcar tendrá que ser dirigido a la producción de otro u otros metabolitos. El glicerol se ha considerado repetidamente como un buen candidato, debido a su contribución positiva a la calidad sensorial. Sin embargo, para bajar 1 grado alcohólico, se incrementaría en 17 g la concentración de glicerol en el vino. Reducciones de grado más importantes supondrían la elaboración de vinos muy alejados de lo esperable en cuanto a contenido en glicerol. En cambio, con la respiración, todo el azúcar es convertido en CO₂ y agua. Así, nuestra propuesta para reducir el grado alcohólico consiste en permitir a la levadura respirar durante las primeras horas del proceso, proporcionándole el oxígeno necesario, de manera que al menos parte de los azúcares consumidos en ese período sean respirados en lugar de fermentados. Posteriormente, dejaría de suministrarse oxígeno, para continuar con el proceso convencional de fermentación (González et al., 2013).

Puesto que *S. cerevisiae* es una levadura Crabtree positiva (a altas concentraciones de azúcar desarrolla un metabolismo casi exclusivamente fermentativo aunque se le proporcione oxígeno), se propuso el uso de levaduras no-*Saccharomyces*, entre las cuales hay especies con mayor capacidad para respirar que *S. cerevisiae*. Como la mayoría de estas especies no pueden



terminar la fermentación se necesitaría la participación de *S. cerevisiae*, que se podría adicionar en coinoculación, o tras terminar la fase aeróbica. En la Figura 1 se muestra el proceso propuesto.

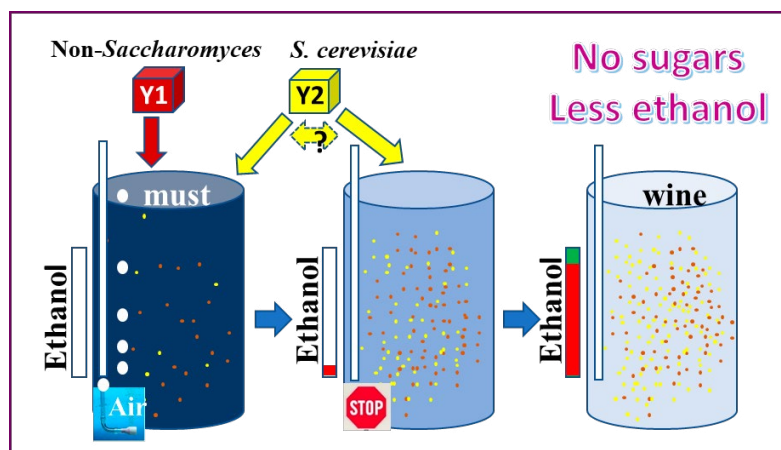


Fig. 1. Proceso de fermentación aeróbica para bajada de grado alcohólico propuesto por González et al. (2013). Y1 e Y2 representan los inóculos de no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* respectivamente. El mismo código de color aplica a las células de levadura representadas dentro del tanque. En la escala del etanol el rojo indica el alcohol producido, el verde la diferencia con el alcohol esperable en un proceso estándar.

Resultados de la primera fase. Prueba de concepto.

El primer objetivo fue la selección de cepas de no-*Saccharomyces* adecuadas para el proceso, es decir, capaces de respirar a altas concentraciones de azúcar (Quirós et al 2014). Se determinó el cociente respiratorio (RQ) de 65 cepas de levadura pertenecientes a 28 especies, incluyendo 4 cepas de *S. cerevisiae* como control. El rendimiento en etanol de las cepas de *S. cerevisiae*, a pesar del efecto Crabtree, mostraba valores inferiores a los valores de condiciones estándar, pero estas cepas presentaron una elevada producción de ácido acético, que invalidaba su uso en estas condiciones. Se establecieron como criterios de selección el rendimiento en etanol, la producción de acético, y la cantidad de azúcares consumida durante el tiempo de aireación. Las cepas más destacables para el proceso pertenecían a las especies *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida sake*, y al género *Kluyveromyces*.

Posteriormente, se realizó una prueba de concepto a escala de laboratorio con una cepa seleccionada de *M. pulcherrima* en condiciones de coinoculación con *S. cerevisiae* (Morales et al 2015). Se obtuvo una bajada de hasta 3,6% v/v de etanol con el co-cultivo con las máximas condiciones de aireación ensayadas. Esta bajada en la producción de etanol es mucho más importante que la conseguida con levaduras no-*Saccharomyces* en condiciones estándar. La cepa de *S. cerevisiae* en solitario, en esas mismas condiciones de aireación, produce 1,8% v/v menos de etanol, pero una gran cantidad de acético.

Uno de los requisitos de este proyecto es trabajar en condiciones de aireación durante un tiempo limitado. Como el oxígeno puede afectar negativamente a la calidad del vino, se consideró fundamental el ajuste de las condiciones de aireación al mínimo necesario para cumplir con el objetivo propuesto. Además, hay otros factores, como la disponibilidad de nitrógeno y la temperatura, que pueden afectar al crecimiento de las levaduras. Por ello se estudió en un diseño ortogonal el efecto de estos 3 parámetros sobre 4 especies de levadura, *C. sake*, *Kluyveromyces*



lactis, *M. pulcherrima*, y *S. cerevisiae* (Rodrigues et al 2016). Los resultados se muestran en la Figura 2. Como se observa, el rendimiento en etanol, sean cuales sean las condiciones, es mayor para *S. cerevisiae* que para las otras especies estudiadas. También destaca la baja producción de acético de *C. sake* y *M. pulcherrima*, y la elevada producción de glicerol de *M. pulcherrima*. La disponibilidad de oxígeno tiene un efecto negativo sobre el rendimiento en etanol para las 4 especies, pero la dependencia es muy diferente según la cepa. La producción de ácido acético es mayor cuanto más oxígeno se proporciona. También la temperatura y el nitrógeno disponible tienen un impacto importante sobre el metabolismo de las levaduras y sobre la reducción del grado.

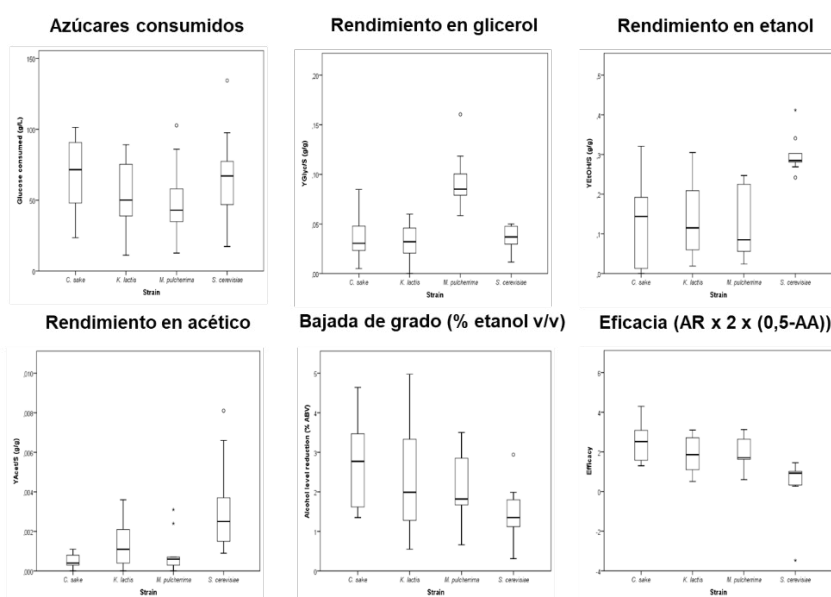


Fig. 2. Boxplot de los parámetros de fermentación para las cepas estudiadas en distintas condiciones de aireación, temperatura y nitrógeno disponible (adaptado de Rodrigues et al. 2016).

Finalmente, se realizó una prueba de escalado a 20 L con dos cepas de no-*Saccharomyces* en inoculación secuencial con *Saccharomyces* (Tronchoni et al 2018). Se puso a punto la preparación de los inóculos de no-*Saccharomyces* para facilitar su implantación en el mosto natural no estéril. También en este trabajo se determinó que el perfil de compuestos volátiles en condiciones de aireación es un factor importante para la selección de cepas para este proceso.

Segunda fase. Proceso de fermentación aeróbica con *S. cerevisiae* en solitario.

El uso de levaduras no-*Saccharomyces* requiere un control preciso del proceso que dificulta su implementación en la industria. Puesto que *S. cerevisiae* en condiciones aeróbicas es capaz de bajar el grado de manera importante, nos planteamos que cepas de *S. cerevisiae* que no incrementasen la acidez volátil podrían utilizarse en el proceso aeróbico, simplificándolo considerablemente. Por ello se abordó un trabajo de caracterización de aislados naturales de *S. cerevisiae* que se pudiesen utilizar en condiciones aeróbicas (Tronchoni et al 2022). Los resultados mostraron una escasa variabilidad en la producción de etanol de esta especie (como ya habían observado otros autores para condiciones anaeróbicas), pero también una gran variabilidad en la producción aeróbica de ácido acético (Figura 3). Tras una segunda fase de caracterización con las cepas con menor producción de acético, en que se realizó un análisis de compuestos volátiles, se seleccionó una cepa, y se puso a punto el proceso a escala de laboratorio. Se observó que la cepa



seleccionada producía muy poco acético durante la fase de aireación, pero al pasar a condiciones anaeróbicas, los niveles de ácido acético subían desproporcionadamente. Este problema se resolvió incorporando al proceso una disminución progresiva de la aireación (en lugar de interrumpirla en un solo paso).

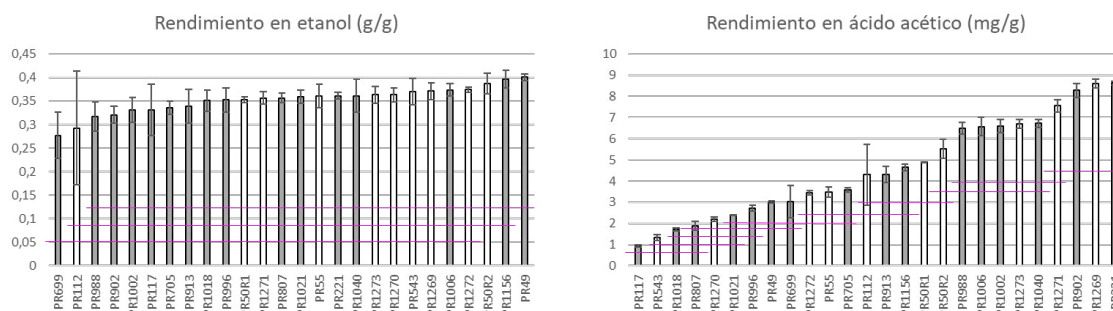


Fig. 3. Rendimiento en etanol y en ácido acético de 25 cepas de *S. cerevisiae* tras 4 días de crecimiento en mosto natural en condiciones aeróbicas (adaptado de Tronchoni et al. 2022). Las líneas moradas unen valores que no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Se solicitó una patente para el uso de esta cepa en las condiciones definidas, y con una empresa se ha realizado el escalado a nivel industrial hasta tanques de 2000 L. Se obtuvo una bajada de 2,5% grados, y el vino fue considerado apto para consumo. Estamos trabajando sobre el escalado a tanques de 20000 L.

Por otra parte, y también con el objetivo de utilizar cepas de *S. cerevisiae* en condiciones aeróbicas, se ha abordado la obtención de cepas mejoradas por evolución dirigida. El medio para la evolución se diseñó basándonos en una observación de un trabajo anterior en que un mutante *reg1*, aliviado en represión por catabolito, y capaz de crecer sobre galactosa en presencia de desoxiglucosa, producía muy poco acético en condiciones aeróbicas (Curiel et al 2016). Se utilizaron 3 cepas de *S. cerevisiae*, y se crecieron en el medio de evolución (galactosa como fuente de carbono y concentraciones crecientes de desoxiglucosa) durante 140 generaciones. Al cabo de este tiempo, se realizó una fermentación en condiciones aeróbicas con la población evolucionada, y se analizaron los metabolitos al cabo de cuatro días. Como se observa en la Figura 4, todas las poblaciones evolucionadas tenían un rendimiento en acético inferior al parental, aunque algunas tenían un consumo de azúcares también inferior.

Se aislaron clones tanto de la población evolucionada, como de la fermentación realizada con la fermentación, y solamente algunos clones de una de las cepas parentales, EC1118, tenían un rendimiento en acético inferior. Cuando se realizó el escalado a fermentador con estos clones, todos ellos produjeron una elevada cantidad de acético, antes incluso del paso a condiciones anaeróbicas, por lo que no fue posible mejorar este proceso mediante evolución experimental (Guindal et al 2023).

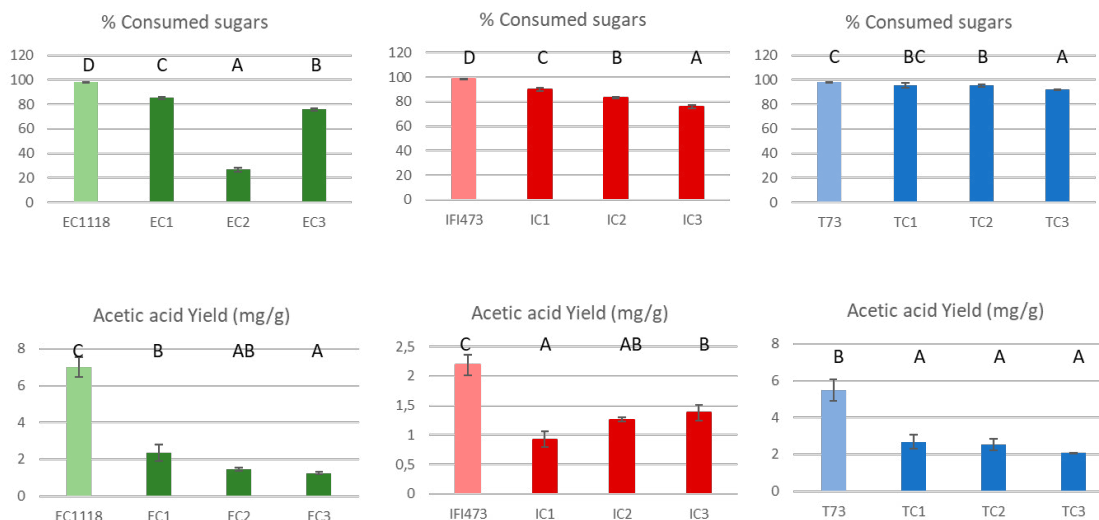


Fig. 4. Consumo de azúcar y rendimiento en acético de las poblaciones evolucionadas tras 4 días de crecimiento en mosto natural estéril (200 g/L de azúcar), en condiciones aeróbicas. En cada gráfica el valor más a la izquierda corresponde a la cepa original y las otras tres representan poblaciones evolucionadas independientemente.

Tercera fase. Nueva selección de cepas y uso en combinación con *S. cerevisiae* seleccionada.

Se caracterizó una selección de aislados de la colección del laboratorio, más de 100 entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, basada en el comportamiento en 4 días de fermentación aeróbica en mosto natural. Atendiendo a la cantidad de azúcares consumidos y al acético producido, se seleccionaron 15 cepas pertenecientes a las especies *S. cerevisiae* (4), *Saccharomyces uvarum* (2), *Candida zemplinina* (2), *Lachancea thermotolerans* (2), *M. pulcherrima* (2), *Pichia kluyveri* (1) y *Torulaspota delbrueckii* (2), para una caracterización en biorreactor. Los fermentadores se mantuvieron con aireación los 4 días iniciales, y se tomó la muestra final a los 7 días. De las cepas de *S. cerevisiae*, solamente resultó interesante la cepa que ya había sido seleccionada, pero varias cepas de no-*Saccharomyces* tenían un rendimiento en acético muy bajo al final de la fase de aireación. Se ha tratado de ajustar el proceso a escala de laboratorio con cepas de *S. uvarum*, *L. thermotolerans* y de *M. pulcherrima*.

Con *S. uvarum* se probó a realizar fermentaciones en solitario. La bajada de grado era muy importante, y la producción de acético muy baja, pero ambas cepas parecen tener un techo en la concentración de etanol permisiva, de manera que cuando se alcanza 8,5% etanol, dejan de consumir azúcares. Por tanto, se probaron en coinoculación con la cepa de *S. cerevisiae* seleccionada en el laboratorio. En estas condiciones, se terminan los azúcares, la producción de acético al final de la fase aeróbica (día 3) es baja, y aceptable al final de la fermentación, aunque sería conveniente tratar de ajustar la bajada de aireación para mejorarlo. No se continuó porque aún en coinoculación con *S. cerevisiae* el final de la fermentación se ralentiza en exceso.

Con las cepas de *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans* se ensayó mezcla de cultivos aeróbicos con otro de *S. cerevisiae* anaeróbico. Tras mezclar ambos fermentadores, se continuaba en condiciones anaeróbicas. En el caso de *L. thermotolerans*, los resultados no fueron positivos, o bien la producción de acético era muy elevada, o bien la bajada de grado era muy baja. En



cambio, con *Metschnikowia*, los resultados eran prometedores, y se continuó la puesta a punto del proceso para una cepa de esta especie (Mp734).

Para la optimización del proceso con Mp734 y la cepa seleccionada de *S. cerevisiae* se optó por la coinoculación, para facilitar la implementación del proceso. Los parámetros que se ajustaron fueron la proporción de inóculo de *S. cerevisiae*, el volumen de aireación, y la adición de suplementos nitrogenados. La aireación se mantuvo durante 3 días y se interrumpió en un solo paso para facilitar el proceso (por oposición a la reducción gradual utilizada con *S. cerevisiae* como única cepa inoculada). Como se observa en la Figura 5, con cualquiera de las condiciones ensayadas se consigue bajar el grado más de 2% respecto del control de *S. cerevisiae* anaerobio, manteniéndose el acético en niveles totalmente aceptables en la mayoría de las condiciones de aireación ensayadas. No se observan diferencias en el color de los vinos, pero sí en los compuestos volátiles.

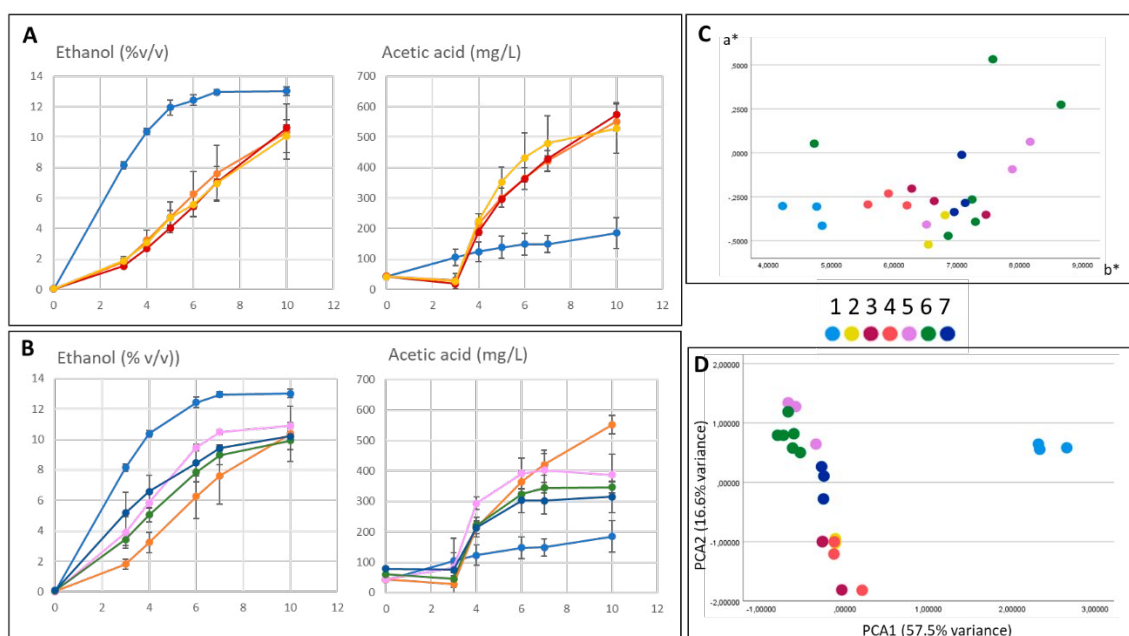


Fig. 5. Puesta a punto del proceso para Mp734 con Sc1018. A: Distintos inóculos de *S. cerevisiae*; B: Aireación y Nitrógeno; C: PCA basado en color; D: PCA compuestos volátiles. Condiciones: 1, control (Sc anaerobio); 2, Sc 0.02 10 VVH; 3, Sc 0.05 10 VVH; 4, Sc 0.1 10 VVH; 5, Sc 0.1 5 VVH YAN; 6, Sc 0.1 5 VVH; 7, Sc 0.1 2.5 VVH.

Conclusiones

El proceso de fermentación aeróbica puede proporcionar una importante bajada de grado alcohólico en comparación con el proceso convencional, pero requiere de un control exhaustivo del proceso, tanto de la inoculación como de la oxigenación. Disponemos de una cepa de *S. cerevisiae* que puede ser utilizada en solitario, realizando una bajada gradual de la aireación para evitar el incremento de acético. La coinoculación de una cepa seleccionada de *M. pulcherrima* con esta misma cepa de *S. cerevisiae* permite una bajada importante de grado, y facilita el paso a condiciones anaeróbicas, sin necesidad de recurrir a dispositivos sofisticados de control.



Bibliografía

1. PALACIOS, A.; RAGINEL, F.; ORTIZ-JULIEN, A. 2007. **Can the selection *Saccharomyces cerevisiae* yeast lead to variations in the final alcohol degree of wines?**. Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak. 527, 71-75.
2. GONZALEZ, R.; GUINDAL, A.M.; TRONCHONI, J.; MORALES, P. 2021. **Biotechnological approaches to lowering the ethanol yield during wine fermentation**. Biomolecules 11, 1569. DOI: 10.3390/biom11111569
3. GONZALEZ, R.; QUIRÓS, M.; MORALES, P. 2013. **Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines**. Trends Food Sci Technol 29, 55-61. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.06.015
4. QUIRÓS, M.; ROJAS, V.; GONZALEZ, R.; MORALES, P. 2014. **Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration**. Int. J. Food Microbiol. 181, 85-91. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024.
5. MORALES, P.; ROJAS, V., QUIRÓS, M.; GONZALEZ, R. 2015. **The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 3993-4003. DOI: 10.1007/s00253-014-6321-3.
6. RODRIGUES, A. J.; RAIMBOURG, T.; GONZALEZ, R.; MORALES, P. (2016). **Environmental factors influencing the efficacy of different yeast strains for alcohol level reduction in wine by respiration**. LWT-Food Sci Technol, 65, 1038-1043. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.09.046
7. TRONCHONI, J.; CURIEL, J. A.; SÁENZ-NAVAJAS, M. P.; MORALES, P.; DE-LA-FUENTE-BLANCO, A.; FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; FERREIRA, V.; GONZALEZ, R. (2018). **Aroma profiling of an aerated fermentation of natural grape must with selected yeast strains at pilot scale**. Food Microbiol, 70, 214-223. DOI: 10.1016/j.fm.2017.10.008
8. TRONCHONI, J.; GONZALEZ, R., GUINDAL, A. M.; CALLEJA, E.; MORALES, P. (2022). **Exploring the suitability of *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking under aerobic conditions**. Food Microbiol, 101, 103893. DOI:10.1016/j.fm.2021.103893
9. CURIEL, J. A.; SALVADÓ, Z.; TRONCHONI, J.; MORALES, P.; RODRIGUES, A. J.; QUIRÓS, M.; GONZALEZ, R. (2016). **Identification of target genes to control acetate yield during aerobic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae***. Microbial Cell Factories, 15, 156. DOI: 10.1186/s12934-016-0555-y
10. GUINDAL, A.M.; GONZALEZ, R.; TRONCHONI, J.; ROODINK, J.S.; MORALES, P. (2023) **Directed evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for low volatile acidity during winemaking under aerobic conditions**. Food Microbiol DOI: 10.1016/j.fm.2023.104282

Agradecimientos

El trabajo realizado por el grupo ha sido financiado por los proyectos AGL2015-63629-R (co-financiado con fondos FEDER), PCI2018-092949 (co-financiado por ERA-CoBioTech), YeSVitE (EU project, 7FP-IRSES-GA no. 612441), MINECO AGL2012-32064, INIA RM2012-00007-00-00, y un contrato con AZ3Oeno.

Impacto de la aplicación de ácido monosilícico a la vid en la composición química de vinos tintos jóvenes de Mencía

Manuel Maximino Losada^a, Lurdes Hernández-Apaolaza^b, Antonio Morata^a, Eugenio Revilla^b

a Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain b Departamento de Química Agrícola y Bromatología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28040 Madrid, Spain. 699321934. manuelmaximino.losada@upm.es

Resumen

Se examinó el impacto de la aplicación de ácido monosilícico en la vid durante la maduración sobre la composición química de los vinos tintos de Mencía. La aplicación foliar de ácido monosilícico a la vid condujo a unos vinos menos oxidados, con niveles más bajos de ácido acético, acetaldehído, acetato de etilo, diacetilo, ácido glucónico y glicerol, así como contenidos más altos de fenoles totales, antocianinas y taninos. Además, los contenidos de varios alcoholes de cadena media fueron mayores ($p < 0,05$) en vinos elaborados con las uvas tratadas con silicio.

1 . Introducción

En la fase líquida del suelo, el silicio se presenta principalmente como ácido monosilícico (H_4SiO_4). En las plantas, el Si se acumula en la epidermis de diferentes órganos. Está ampliamente descrito que el Si puede ser un elemento benéfico para el crecimiento de diversos cultivos, limitando los efectos de estreses bióticos y abióticos en las plantas aliviando los efectos de enfermedades de las plantas (Rodrigues y Datnoff, 2015), toxicidades de metales (Wu *et al.* . . , 2013), estrés por sal y sequía (Zhu y Gong, 2014), o deficiencias de micronutrientes (Martín-Esquinas y Hernández-Apaolaza, 2021). En cualquier caso, el efecto beneficioso del Si es muy variable en función de la especie vegetal, pero es especialmente notable en plantas que acumulan gran cantidad de silicio en sus brotes, como el arroz (Martín-Esquinas, A., & Hernández-Apaolaza, 2021).

El uso de Si en Viticultura está especialmente relacionado con la Viticultura biodinámica (preparado 501). Se ha informado que el manejo biodinámico de las vides condujo a un aumento en las actividades de varias enzimas típicamente correlacionadas con la resistencia inducida de la planta al estrés biótico y abiótico (Botelho *et al.*, 2016). La aplicación por aspersión de metasilicato de sodio en uvas Sauvignon Blanc aumentaron la acidez titulable y los niveles de varios flavanoles, flavonoles , ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico en los vinos, y disminuyeron la acidez volátil (Gomes *et al.*, 2020), y el uso de la aplicación foliar de Si coloidal en uvas Grüner Veltliner como alternativa a los fungicidas convencionales para el tratamiento de enfermedades fúngicas aumentó las concentraciones totales de silicio en las hojas, el rendimiento y el peso del racimo, y los vinos producidos a partir de uvas tratadas con Si obtuvieron una mejor clasificación en las evaluaciones sensoriales (Schabl *et al.*, 2020) .



La Denominación de Origen Protegida Valdeorras con muchos viñedos, próximos al río Sil, y humedad relativa elevada, incluso en verano, propicia unas condiciones favorables para el desarrollo de *B. cinerea*, así como otras enfermedades fúngicas. El uso en enología de uvas infectadas con *B. cinerea* conduce a vinos menos valiosos, ya que la infección por este hongo provoca la proliferación de bacterias del ácido acético en los vinos, lo que lleva a la formación de ácido acético y acetato de etilo y también aumenta la tasa de oxidación de polifenoles debido a enzimas como lacasa y tirosinasa (Thakur et al., 2018); además, estos vinos contienen cantidades más altas de ciertos compuestos, como el glicerol y el ácido glucónico, que durante mucho tiempo han sido considerados como marcadores de *B. Cinérea* en uvas. Por estos motivos, hemos estudiado cómo la aplicación de ácido monosilícico a la vid puede afectar a la composición química de los vinos tintos elaborados con uvas de Mencía en la zona de Valdeorras en comparación con los vinos control, para evaluar el efecto del Si sobre las características de los vinos elaborados.

2. Materiales y métodos

El experimento de campo se ha realizado en un viñedo de 18 años, situado en la Denominación de Origen Protegida Valdeorras, a unos 400 m snm, y próximo al río Sil, en un ambiente caracterizado por una alta humedad relativa (alrededor del 80%) durante el mes de septiembre. Las plantas del cv. Mencía, injertadas en 110 Richter, en espaldera y podadas en Cordon Royat, están dispuestas de E a O en una pendiente < 5%, con una distancia entre cepas de 2,30 m × 1,20 m. Se seleccionaron seis filas contiguas para el experimento. En tres de estas filas (las filas impares), se aplicó una solución acuosa de ácido monosilícico (preparado en la facultad de químicas de la Universidad Autónoma de Madrid), que contenía 1,5 mmol/L de Si, con un rociador de mochila a seis plantas diferentes contiguas tres veces (24 de julio, 13 de agosto y 1 de septiembre de 2019). Se aplicaron a cada planta alrededor de 100 mL de esa solución (alrededor de 4,20 mg de Si). Las otras tres filas (las filas pares) no se trataron con ácido monosilícico. Durante el ciclo vegetativo de la vid se realizaron los tratamientos habituales: dos con fungicidas sistémicos y otros dos con fungicidas de contacto contra el mildium, y dos tratamientos con fungicidas sistémicos y otro con fungicidas de contacto contra el oidio, y dos tratamientos con fungicidas sistémicos contra la podredumbre gris, en todo el viñedo.

La vendimia tuvo lugar el 29 de septiembre de 2019, una vez que el mosto superó un grado alcohólico probable de 11,5. Las uvas fueron cosechadas a mano, colocadas en canastos plásticos de 20 kg y transportadas a la bodega de la E.T.S.I.A.A.B.; se recolectó una canasta en cada fila. En las líneas tratadas con ácido monosilícico, cada cesto se completaba con toda la uva cosechada en tres plantas, pero eran necesarias cuatro plantas para completar un cesto en hileras control; claramente, el rendimiento fue mayor en las hileras tratadas con ácido monosilícico (alrededor de 6,3 kg/planta) que en las hileras de control (alrededor de 5,1 kg/planta). Las uvas fueron transportadas a Madrid en una furgoneta frigorífica, la temperatura se mantuvo entre 15 y 20 °C; y se almacenaron durante la noche bajo tierra en esa camioneta, a unos 20 °C. La vinificación comenzó el 30 de septiembre de 2019.

Las uvas fueron estrujadas y despalilladas; se adicionó disulfito de potasio (120 mg L⁻¹). Para la vinificación se utilizaron seis tanques de acero inoxidable de 25 L. En los seis depósitos se realizó una vinificación tradicional. Los tanques se inocularon con 40 g/100 L de levadura Fermivin TS28; y la fermentación alcohólica se realizó en cámara frigorífica a 26 °C, realizándose bazuqueo dos veces al día. Después de seis días, las pieles y las semillas se retiraron mediante una suave decantación de los vinos. Al final de la fermentación alcohólica, los vinos fueron



inoculados con Uvaferm Bacterias. Finalmente, los vinos (alrededor de 14 L) fueron trasegados y luego transferidos a botellas de vidrio de 750 mL, y luego de agregar solución de disulfuro de potasio, se ajustó el anhídrido sulfuroso a 30 mg L⁻¹, permaneciendo en dichas botellas hasta su análisis. Así, se elaboraron tres vinos de control (C) y tres vinos elaborados con uvas tratadas con ácido monosilícico (Si).

El contenido de azúcar, el pH y la acidez total de los mostos se analizaron siguiendo los métodos de la OIV (2010). Grado alcohólico, pH, acidez total, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, glucosa+fructosa, azúcares reductores, extracto seco, densidad relativa, anhídrido sulfuroso total, anhídrido sulfuroso libre, glicerina y ácido glucónico en vinos, después de dos meses de estancia en botella a 15 °C en cámara, se determinaron por métodos de la OIV (2010).

El índice de fenoles totales, las antocianinas coloreadas y el índice de edad química se midieron utilizando los procedimientos descritos por Zoecklein et al. (1995), a partir de los propuestos por Somers y Evans (1977). La intensidad del color y la tonalidad se determinaron siguiendo el procedimiento de Glories (1984). Los antocianos totales se analizaron mediante el procedimiento de Niketic-Aleksic y Hrazdina (1972). Los taninos totales se midieron después de su precipitación con metilcelulosa, utilizando el procedimiento de Sarneckis et al. (2006). Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro UV-VIS Boeco S-22. Las muestras se analizaron por duplicado.

Las antocianinas y piranoantocianinas se identificaron y caracterizaron por HPLC con detección de matriz de diodos e ionización por electropulverización acoplada a espectrometría de masas (DAD-ESI/MS), según lo descrito por Escott et al (2018).

Los compuestos volátiles se determinaron por cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID), siguiendo el procedimiento descrito por Escott et al. (2018). La contribución de cada compuesto volátil al aroma del vino se evaluó mediante el cálculo de su valor activo de olor (OAV), es decir, la relación entre su concentración en el vino y su umbral de percepción (Bouzas-Cid et al., 2018)).

Para comparar los datos obtenidos para los vinos con uvas tratadas con Si y los vinos testigo, se realizó la prueba t de muestras independientes con SPSS para Windows (v. 26.0).

3 . Resultados y discusión

3.1 . Análisis de mostos y general de vinos.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para el análisis general de los vinos. El vino testigo, mostró mayor densidad relativa y mayor contenido de ácido acético, ácido glucónico y glicerina que el vino elaborado con uvas obtenidas de plantas que fueron tratadas con ácido monosilícico. Estas diferencias fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$). Dichos parámetros son más elevados en vinos elaborados con uvas infectadas con *B. cinerea*, tal como se ha descrito durante mucho tiempo en la literatura enológica (Kallitsounakis & Catarino, 2020). Ciertamente, los racimos recolectados de plantas tratadas con ácido monosilícico contenían menos uvas con síntomas de ataque de *B. cinerea* que los racimos recolectados de plantas de control. El mayor contenido de ácido glucónico y glicerol en el vino testigo condujo a un mayor extracto seco,



como era de esperar, a pesar de que no se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el extracto seco entre los vinos testigo y los vinos tratados con Si. Además, los vinos de uvas tratadas con Si son ligeramente más alcohólico y más ácidos que los vinos testigo, pero estos parámetros no fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), y contenían una mayor concentración de ácido tartárico ($p < 0,05$) que los vinos testigo, pero menor concentración de ácido L-láctico ($p < 0,05$). Estos hechos han sido expuestos por Gómez et al. (2020) en vinos Sauvignon blanc elaborados con uvas después de la aplicación foliar de metasilicato de sodio. Los niveles de ácido málico en ambos vinos estuvieron por debajo de $0,2 \text{ g L}^{-1}$, lo que demuestra que el ácido málico se degradó durante la fermentación maloláctica. Así, el mayor contenido de ácido L-láctico en los vinos testigo puede estar relacionado con la acumulación de ácido cítrico en uvas infectadas por *B. cinerea*, dando lugar a vinos enriquecidos en ácido L-láctico (Kallitsounakis y Catarino, 2020).

Tabla 1 . Valores medios y desviaciones típicas de los parámetros analíticos relacionados con el análisis del mosto y la composición general de los vinos. Los valores medios en la misma fila seguidos de una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Mostos	Parámetro	Valor medio y desviación estándar	
		Uvas no tratadas con Si	Uvas tratadas con Si
Mostos	Contenido de azúcar, °Brix	21,7 ± 0,6a	22,1 ± 1,1a
	Acidez total, g L ⁻¹ , TAE*	5,03 ± 0,42a	5,70 ± 0,64a
	pH	3,81 ± 0,02a	3,79 ± 0,03a
Vinos	Grado alcohólico, 20 °C, % vol.	12,03 ± 0,55a	12,26 ± 0,47a
	Extracto seco, g L ⁻¹	29,8 ± 2,5a	26,4 ± 1,07a
	Densidad relativa 20/20	0,99570 ± 0,00039a	0,99411 ± 0,00013b
	Acidez total, g L ⁻¹ , TAE*	4,67 ± 0,18a	4,93 ± 0,40a
	pH	3,84 ± 0,14a	3,82 ± 0,26a
	Ácido acético, g L ⁻¹	0,94 ± 0,14a	0,64 ± 0,09b
	Dióxido de azufre libre, mg L ⁻¹	12 ± 2a	13 ± 2a
	Dióxido de azufre total, mg L ⁻¹	34 ± 3a	29 ± 5a
	D-Ácido glucónico, g L ⁻¹	1,80 ± 0,23a	0,97 ± 0,06b
	L-Ácido tartárico, g L ⁻¹	1,85 ± 0,08a	2,05 ± 0,07b
	L-Ácido láctico, g L ⁻¹	2,28 ± 0,12a	1,84 ± 0,06b
Glicerol, g L ⁻¹	10,94 ± 1,06a	8,38 ± 0,58b	

*TAE: equivalentes de ácido tartárico

3.2 . Color y composición fenólica general de los vinos

El vino Si contenía mayores cantidades de fenoles totales, antocianos totales (pigmentos rojos totales, incluidas las antocianinas, derivados de las antocianinas, como piranoantocianinas y polímeros rojos formados por condensación de antocianinas con favan-3-oles), antocianinas totales y taninos totales que el vino C (Tablas 2,3 y 4); los contenidos de antocianos totales y antocianinas totales fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ky et al. (2012) para vinos tintos Merlot elaborados con diferente proporción de uvas botritizadas. Además, como es bien sabido (Jackson, 2020), la extracción de antocianinas y taninos condensados (proantocianidinas) de la piel de la uva está relacionada con la fractura de las paredes celulares durante el estrujado de la uva antes de la fermentación alcohólica, y la



intensidad de esa fractura está relacionada con la rigidez de las paredes celulares; se puede suponer que la integración de Si en las paredes de las células debe aumentar la rigidez, favoreciendo su fractura durante la trituración. Esta hipótesis puede explicar el mayor contenido de antocianos totales y antocianinas totales en el vino de Si. A pesar de que el contenido de fenoles totales y taninos totales es mayor en el vino Si, no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) al compararlo con el vino C; este hecho puede explicarse porque los taninos condensados también se extraen de las semillas de la uva, y porque la pulpa de la uva es la fuente de derivados de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el vino.

Tabla 2 . Valores medios y desviaciones típicas de los parámetros analíticos relacionados con el color y la composición fenólica general. Los valores medios en la misma fila seguidos de una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Parámetro	Valor medio y desviación estándar	
	Uvas no tratadas con Si	Uvas tratadas con Si
Índice de fenoles totales	27,32 ± 2,99a	28,07 ± 1,78a
Intensidad de color (Glorias)	5.353 ± 0.470a	5,027 ± 0,281a
Absorbancia del vino a 420 nm (%) ¹	36,51 ± 0,99a	33,21 ± 0,50b
Absorbancia del vino a 520 nm (%) ¹	48,74 ± 0,39a	53,64 ± 2,64b
Absorbancia del vino a 620 nm (%) ¹	12,13 ± 1,14a	10,98 ± 2,32a
Matiz o tono	0,749 ± 0,020a	0,620 ± 0,034b
Antocianos totales, mg L ⁻¹	384 ± 33a	442 ± 20b
Antocianinas totales, mg L ⁻¹	326 ± 27a	385 ± 20b
Antocianinas coloreadas, mg L ⁻¹	14 ± 1a	17 ± 2a
Índice de edad química	0,091 ± 0,006a	0,077 ± 0,006b
Taninos totales, mg L ⁻¹	1174 ± 153a	1413 ± 263a

Los resultados anteriores deberían causar una mayor intensidad de color en el vino Si en relación con el vino C. Sin embargo, el vino Si es ligeramente menos coloreado que el vino C, pero los resultados no son estadísticamente significativos ($p < 0,05$); esto puede explicarse porque la oxidación de catequinas en vinos oxidados (como el vino C) puede aumentar la intensidad del color (Fregoni et al., 1986). Por otro lado, el vino C, a pesar de ser un vino joven, es un vino más evolucionado que el vino Si, como lo demuestran otros dos parámetros: la tonalidad y el índice de edad química. Ambos son más altos en vino C que en vino Si ($p < 0,05$). Índice de edad química, descrito por Somers y Evans (1977), es un parámetro que indica el grado de polimerización de antocianinas con favan-3-oles en un vino. Teóricamente, su rango numérico varía de 0 (falta de polimerización) a 1 (polimerización completa). Para los vinos producidos en un año determinado en una región determinada, la edad química de un vino puede permitir estimar el efecto de una práctica vitícola o enológica sobre la evolución de un vino en relación con un control.

3.3 . Antocianinas y piranoantocianinas

Se han determinado diez antocianinas diferentes por HPLC-DAD. El contenido de estos pigmentos (Tabla 3), suelen ser mayores en los vinos procedentes de uvas tratadas, excepto Pn-Gl. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Ky et al. (2012) para vinos tintos Merlot elaborados con diferente proporción de uvas botritizadas.



Las piranoantocianinas se forman durante el envejecimiento del vino por varios mecanismos diferentes (He et al., 2012). La mayoría de ellos han sido detectados y cuantificados (tres vitisina tipo A, una vitisina tipo B y cuatro hidroxifenil-piranoantocianinas). La mayoría de ellas son más abundantes en los vinos testigo (vinos más evolucionados), pero dos de ellos (vitisina A y su derivado acetilado) son más abundantes en el vino Si (Tabla 4). Las diferencias entre vinos son significativamente distintas ($p < 0,05$), excepto para la vitisina B, la vitisina A acetilada y el Mv-AcGl-vinilfenol.

Tabla 3. Valores medios y desviaciones típicas de las antocianinas. Los valores medios en la misma fila seguidos de una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Antocianinas	Valor medio y desviación estándar	
	Uvas no tratadas con Si	Uvas tratadas con Si
Dp-Gl	15,9 ± 1,2a	21,9 ± 2,3b
Pt-Gl	22,9 ± 1,0a	32,4 ± 2,5b
Pn-Gl	39,8 ± 0,4a	35,3 ± 5,1a
Mv-Gl	386,5 ± 17,9a	458,9 ± 21,5b
Pt-AcGl	6,7 ± 0,2a	7,9 ± 0,4b
Mv-AcGl	99,2 ± 5,2a	113,4 ± 5,2b
Dp-CmGl	7,5 ± 0,3a	8,0 ± 0,2b
Pt-CmGl	4,9 ± 0,2a	5,4 ± 0,3b
Mv-cisCmGl	4,7 ± 0,3a	5,7 ± 0,2b
Mv-transCmGl	51,3 ± 6,6a	64,8 ± 3,1b

Tabla 4. Valores medios y desviaciones típicas de los derivados de antocianinas. Los valores medios en la misma fila seguidos de una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Derivado de antocianina	Valor medio y desviación estándar	
	Uvas no tratadas con Si	Uvas tratadas con Si
Pn-Gl-piruvato	3,6 ± 0,1a	3,3 ± 0,1b
Vitisina B	4,1 ± 0,2a	3,9 ± 0,1a
Vitisina A	11,2 ± 0,2a	13,1 ± 0,9b
Vitisina A acetilada	4,6 ± 0,2a	4,8 ± 0,1a
Mv-Gl-vinilcatecol	3,7 ± 0,1a	3,4 ± 0,1b
Mv-Gl-vinilfenol	6,0 ± 0,4a	5,2 ± 0,0b
Mv-Gl-vinilguayacol	3,9 ± 0,1a	3,7 ± 0,1b
Mv-AcGl-vinilfenol	3,7 ± 0,1a	3,5 ± 0,2a

3.4. Compuestos volátiles

Varios compuestos volátiles, en su mayoría formados durante la fermentación alcohólica, fueron detectados y cuantificados. Los datos sobre su contenido se muestran en la Tabla 5. Entre ellos, el más abundante fue el 2,3-butanodiol, siendo su contenido bastante similar en ambos vinos.



Las concentraciones de acetaldehído y 1-propanol fueron significativamente más altas ($p < 0,05$) en los vinos testigo. El acetaldehído es un marcador bien conocido de la oxidación del vino (Jackson, 2020), lo que indica que la oxidación ha sido más intensa en el vino testigo; esto se ha reflejado también en los niveles de ácido acético (Tabla 1), acetato de etilo y diacetilo.

Por otro lado, los contenidos de varios alcoholes de cadena media (1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol y 2-feniletanol) fueron mayores ($p < 0,05$) en los vinos tratados. Estos alcoholes se forman principalmente durante la fermentación alcohólica por desaminación de aminoácidos; los aminoácidos de cadena ramificada, como L -valina, L -leucina y L -isoleucina, se transforman en alcoholes de cadena ramificada a través de la vía metabólica de Ehrlich, así como los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) originan el 2-feniletanol (Styger et al. , 2011). El desarrollo de *B. cinerea* en uva conduce a la disminución de los niveles de nitrógeno fácilmente asimilable (Hazelwood et al., 2008 , Ugliano and Henschke, 2009 , Styger et al., 2011) y, por tanto, limita la formación de varios alcoholes de cadena media en los vinos y la producción de acetato de isoamilo , que está ausente en el vino testigo.

Tabla 5 . Valores medios y desviaciones típicas de los compuestos aromáticos. Los valores medios en la misma fila seguidos de una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Compuesto aromático		Valor medio y desviación estándar	
		Uvas no tratadas con Si	Uvas tratadas con Si
Alcoholes	metanol	137,2 ± 16,1a	118,9 ± 18,5a
	1-propanol	62,0 ± 5,7a	43,6 ± 3,7b
	1-butanol	1,4 ± 2,4a	4,2 ± 0,2b
	2-metil-1-butanol	149,7 ± 18,0a	187,5 ± 13,5b
	isobutanol	72,9 ± 9,2a	66,4 ± 3,3a
	3-metil-1-butanol	36,4 ± 5,8a	47,8 ± 5,0b
	4-metil-2-pentanol	50,0 ± 0,0a	50,0 ± 0,0a
	1-hexanol	4,6 ± 0,3a	4,7 ± 0,3a
	2-feniletanol	32,0 ± 4,5a	43,8 ± 1,7b
	2-3 butanodiol	1000,5 ± 293,4a	988,8 ± 125,1a
Ésteres	Acetato de etilo	63,5 ± 3,5a	55,1 ± 4,3a
	lactato de etilo	39,7 ± 9,9a	33,7 ± 9,2a
	Acetato de 2-feniletilo	5,2 ± 0,1a	5,1 ± 0,1a
	Acetato de isoamilo	Dakota del Norte	2,1 ± 0,2
Compuestos de carbonilo	acetaldehído	18,2 ± 8,2a	8,0 ± 0,3b
	diacetilo	11,2 ± 1,1a	10,4 ± 1,3a
	acetoína	9,7 ± 5,6a	15,8 ± 6,5a

Nueve compuestos volátiles presentaron OAV > 1 en los vinos testigo (Tabla 6) y once en los vinos tratados. En los vinos de Si, varios volátiles que se consideran negativos para la apreciación sensorial de los vinos (acetato de etilo, acetaldehído, diacetilo) presentaron un OAV más bajo que en el vino testigo. Por lo tanto, el menor contenido de estos tres odorantes en el vino tratado debe considerarse positivo desde el punto de vista sensorial. Entre las sustancias que han presentado un OAV alto, el valor más alto corresponde al acetato de isoamilo, con un aroma característico a plátano; además, este olor no se ha detectado en el vino testigo, probablemente porque el acetato de isoamilo es menos abundante en los vinos elaborados con uvas botritizadas



(Thakur et al., 2018), y este hecho puede conducir a una apreciación sensorial diferencial de ambos vinos.

Tabla 6. Umbrales de percepción ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y OAV's para los diferentes compuestos volátiles. Los OAV se calcularon considerando los valores medios.

Compuesto volátil	Umbral de percepción ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	OAV, vino testigo	OAV, vino tratado con silicio
metanol	668	0.21	0.18
1-propanol	306	0.20	0.14
1-butanol	150	0.01	0.02
1-hexanol	1.1	4.18	4.30
isobutanol	40	1.82	1.66
2-metil-1-butanol	40	0.91	1.19
3-metil-1-butanol	50	2.99	3.75
2-feniletanol	14	2.28	3.13
2.3-butanodiol	150	6.67	6.59
Acetato de etilo	12	5.29	4.54
lactato de etilo	155	0.26	0.22
Acetato de 2-feniletilo	0.25	20.93	20.53
Acetato de isoamilo	0.03	–	71.67
acetaldehído	0,5	36.47	15.93
diacetilo	0,9	12.48	11.52
acetoína	150	0.06	0.11

4. Conclusiones

El estudio realizado ha permitido obtener información sobre el efecto de la aplicación foliar de ácido monosilícico durante la maduración de la uva en un viñedo del cv. Mencía en la zona demarcada de Valdeorras.

El tratamiento de plantas de vid con Si durante la maduración permitió que el vino obtenido estuviera menos oxidado que el vino testigo, con menores niveles de ácido acético, acetaldehído, acetato de etilo y diacetilo, lo que es considerado como positivo desde un punto de vista sensorial. Además, la aplicación de Si dio lugar a unos vinos con menores niveles de sustancias características de los vinos elaborados con uva botritizada, como ácido glucónico y glicerina, y también con mayor contenido de fenoles totales, antocianos totales, taninos totales y varias antocianinas, que también disminuyen en los vinos testigo.

5. Bibliografía

Artículo Food Chemistry 378 (2022) 132140

Influencia del tiempo de criomaceración sobre la composición y calidad sensorial de los vinos de Tempranillo Blanco

Juana Martínez, Laura Alti

*Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja. CSIC. Universidad de La Rioja).
Servicio de Investigación Agraria y Sanidad Vegetal. Finca La Grajera Ctra Burgos Km. 6. 26071 Logroño (La Rioja).
Tfno: 941894980. e-mail: jmartinezg@larioja.org*

1. Introducción

La maceración prefermentativa en frío es una técnica aplicada con frecuencia en la elaboración de los vinos blancos. Consiste en mantener el mosto en contacto con los hollejos después del estrujado y despalillado de la uva, antes de iniciarse la fermentación alcohólica. Este proceso favorece la liberación de los aromas varietales del hollejo, y también de otros compuestos (aminoácidos, glutatión, polifenoles...), por lo que aumenta la complejidad de los vinos y se modifica su perfil sensorial, permitiendo la elaboración de vinos con estilos diferentes. En los últimos años la maceración prefermentativa en frío, también denominada criomaceración, se realiza con el empleo de hielo seco (CO₂ sólido), lo que produce un choque térmico que provoca la rotura de las células del hollejo y se favorecen los procesos de extracción de los compuestos de la uva (Lukić et al., 2017). La adición de hielo seco (denominado también nieve carbónica) durante este proceso permite mantener la temperatura baja y una atmósfera en condiciones reductoras que minimiza las reacciones de oxidación (Cai et al., 2014).

Los resultados obtenidos en numerosos estudios desarrollados sobre esta práctica son muy variables dependiendo de las características de la uva (variedad, grado de madurez...), de las condiciones de maceración (duración y temperatura) y del método de enfriamiento (congelación de uva, nitrógeno líquido, hielo seco, intercambiadores de calor...) (Esti y Tamborra, 2006; Moreno-Pérez et al., 2013; Peng et al., 2013). Este tipo de elaboración puede favorecer el incremento del carácter varietal en los vinos, por lo que su estudio en nuevas variedades se considera de gran interés para potenciar sus características diferenciales (Baiano et al., 2017; Cai et al., 2014; Lukic et al., 2017).

Uno de los factores más estudiados ha sido la duración de la maceración. Singleton et al. (1975) observaron que más de 12 horas de maceración eran un riesgo para la calidad de los vinos blancos por su elevado contenido fenólico. Por el contrario, Arnold y Noble (1979) recomendaron una maceración de 15 horas para la variedad Chardonnay. Por otra parte, Selli et al. (2006) observaron en vinos de Muscat mayor calidad aromática con 6 horas de maceración a 15°C que con 12 h. En los últimos años, la prolongación de la maceración con hollejos durante la fermentación ha sido objeto de numerosos estudios. La duración del tiempo de contacto con los hollejos puede modificar la complejidad del vino, con la aparición de nuevos atributos sensoriales e incrementar su potencial de envejecimiento (Aleixandre-Tudó et al. 2015).

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la influencia del tiempo de maceración prefermentativa en frío con hielo seco sobre la composición y calidad sensorial de los vinos elaborados con la variedad Tempranillo Blanco.



2. Material y Métodos

El estudio se llevó a cabo durante la campaña 2019 con uva de la variedad Tempranillo Blanco. La vendimia se realizó de forma manual con un nivel de madurez óptimo y buen estado sanitario. Aproximadamente, un total de 800 kg de uva fueron recogidos y divididos en cuatro lotes de 200 kg cada uno. Uno de los lotes fue destinado a la vinificación control, sin maceración con los hollejos. Una vez estrujada la uva se prensó en una prensa neumática (3 bar), se adicionaron 60 mg /L de anhídrido sulfuroso y enzimas pectolíticas (1 g/HI, Lafazym CL, Laffort S.L.). El desfangado del mosto se efectuó en cámara frigorífica a 10 °C durante 15 h. En los otros tres lotes de uva, después del estrujado y despalillado se efectuó una maceración prefermentativa del mosto con los hollejos a baja temperatura, mediante la aplicación de hielo seco (CO₂ sólido). Se adicionaron 10 kg de hielo seco en forma de pellets de 16 mm a cada lote de 200 kg de uva, con el fin de alcanzar una temperatura de maceración entre 10-12°C. La adición se efectuó paralelamente a la introducción de la uva despalillada en los depósitos. Se estudiaron tres tiempos diferentes de maceración: 4, 6 y 8 horas. La separación del mosto y los hollejos se efectuó mediante prensado en una prensa neumática. Los mostos obtenidos se sulfitaron, se adicionaron enzimas pectolíticas y se desfangaron en las mismas condiciones que la vinificación control.

Posteriormente, los mostos clarificados, con un nivel de turbidez entre 70-80 NTU, se trasegaron a otros depósitos para llevar a cabo la fermentación alcohólica mediante inoculación de levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore X16, Laffort S.L.). Los ensayos se efectuaron por triplicado en depósitos de 30 L., que se mantuvieron en una cámara frigorífica a 18-20 °C. Una vez concluida la fermentación alcohólica, los vinos se sulfitaron y se conservaron en frío durante un mes antes de su embotellado, posteriormente se analizó su composición química y se efectuó la valoración sensorial.

En los mostos desfangados se analizó el contenido nitrogenado (aminoácidos y glutatión) por HPLC (Garde-Cerdán et al., 2014 y Martínez et al., 2014). En los vinos resultantes se determinó la composición físico-química general (grado alcohólico, pH, acidez total, ácido tartárico, ácido málico y potasio), los parámetros colorimétricos (D.O. 420 nm y coordenadas CIELab) y la composición fenólica: polifenoles totales (IPT 280 nm), ácidos hidroxicinámicos (D.O. 320 nm), flavonoles (D.O. 365 nm), taninos y catequinas. Asimismo, se analizó el contenido de aromas fermentativos mediante C. Gases (Ortega et al., 2001) y el de polifenoles de bajo peso molecular por HPLC. El análisis organoléptico fue efectuado por un panel de cata que valoró las diferentes fases con puntuaciones decrecientes al aumentar la calidad, y los descriptores aromáticos y gustativos mediante una escala estructurada de 10 puntos. Por otra parte, se realizaron pruebas de cata triangulares, consideradas las más adecuadas para discriminar entre muestras, conforme a la Norma UNE-EN ISO 4120:2022 (AENOR, 2022). El estudio estadístico de los resultados se realizó mediante el análisis de varianza ANOVA y en caso de existir diferencias significativas, $p < 0.05$, se utilizó el test de Tukey para la separación de medias (programa estadístico SPSS versión 20.0).

3. Resultados

3.2. Composición nitrogenada de los mostos

La composición nitrogenada de los mostos se incrementó paralelamente al aumento del tiempo de criomaceración (Tabla 1).



Tabla 1. Influencia del tiempo de criomaceración sobre la composición nitrogenada de los mostos

Compuestos	Testigo	Criomaceración		
		4 h	6 h	8 h
Ácido aspártico	30,37 b	30,79 b	31,64 b	39,75 a
Ácido glutámico	88,41	94,88	91,20	90,63
Aspargina	6,82	6,81	7,01	7,13
Serina	46,45 b	52,25 a	55,13 a	55,12 a
Glutamina	205,09	199,21	208,15	229,82
Histidina	58,87	58,07	64,96	63,89
Glicina	4,70	4,40	4,80	4,52
Treonina	43,22 b	49,96 a	53,18 a	53,49 a
Citrulina	12,65 b	13,93 a	13,95 a	14,95 a
Arginina	541,10	565,06	604,81	606,23
Alanina	79,93 b	97,11 a	106,12 a	94,53 a
GABA	44,45 b	56,94 a	64,82 a	59,55 a
Tirosina	17,16 c	19,48 b	21,26 a	20,46 ab
Cistina	15,05	14,47	14,98	14,57
Valina	18,83 b	18,61 b	19,98 a	19,62 ab
Metionina	11,34	12,90	12,64	12,14
Triptófano	38,21 b	43,45 a	45,43 a	42,86 a
Fenilalanina	13,14 c	14,44 b	15,60 a	14,69 ab
Isoleucina	5,25 bc	5,22 c	5,67 a	5,47 ab
Ornitina	2,28 b	4,85 a	5,48 a	6,01 a
Leucina	7,94 c	8,43 bc	9,51 a	9,05 ab
Lisina	4,67	4,39	4,37	4,11
Prolina	402,24 b	497,60 a	527,15 a	500,58 a
∑ Aminoácidos	1760,51 b	1954,30 ab	2064,81 a	2043,47 a
Glutatión	62,25 b	80,92 a	76,86 a	74,18 a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Tukey $p < 0.05$

Algunos aminoácidos (serina, treonina, citrulina, alanina, γ -aminobutírico, triptófano, ornitina y prolina) aumentaron su contenido a partir de 4 horas de contacto con los hollejos, y no mostraron diferencias al prolongar la duración de la maceración. Otros compuestos (valina, fenilalanina, isoleucina y leucina) alcanzaron la mayor concentración con 6 horas de maceración. Únicamente el ácido aspártico se incrementó hasta 8 horas de maceración. El contenido total de aminoácidos en los mostos criomacerados fue significativamente superior a los testigos a partir de 6 horas de maceración, y similar al alcanzado con 8 horas. El aminoácido mayoritario en los mostos de Tempranillo Blanco fue la arginina, seguido de la prolina, este compuesto no es metabolizado por las levaduras durante la fermentación. Estos resultados coinciden con lo indicado por Hernández-Orte et al. (1998), que obtuvieron el mayor contenido de aminoácidos después de 6 horas de maceración en las variedades Chardonnay y Macabeo.



La concentración de glutatión reducido (GSH) se vio incrementada de forma notable en los mostos criomacerados, aumentando un 23 % después de 4 horas de criomaceración y sin mostrar diferencias significativas entre los diferentes tiempos empleados (Tabla 1). Los valores de GSH obtenidos en los mostos de Tempranillo Blanco fueron muy elevados, se encontraron en un rango entre 62-81 mg/l, corroborando los indicados en otros estudios sobre esta variedad. Di Lecce et al. (2013) observaron un nivel de GSH del 38- 77% superior en mostos macerados al final de la fermentación alcohólica en la variedad Verdicchio. Pons et al. (2015) describieron un aumento del contenido de glutatión, entre 2-55%, en las primeras 4 horas de maceración.

3.1. Composición de los vinos

La criomaceración afectó de forma significativa a la composición de los vinos (Tabla 2), disminuyendo la acidez total e incrementado los valores de pH, potasio y polifenoles totales.

Tabla 2. Influencia del tiempo de criomaceración sobre la composición de los vinos

Parámetros	Testigo	Criomaceración		
		4 h	6 h	8 h
Grado alc.(% v/v)	13.88	13.92	13.95	14.13
pH	3.46 d	3.57 c	3.64 b	3.69 a
Ac. Total (g/l)	6.70 a	6.06 b	5.85 bc	5.81 c
Ac. Tartárico (g/l)	2.40 a	2.07 b	1.77 c	1.83 c
Ac. Málico (g/l)	2.05 b	2.25 a	2.31 a	2.34 a
Potasio (mg/l)	713 d	820 c	846 b	893 a
D.O. 420 nm	0,075 a	0,063 b	0,069 ab	0,067 b
D.O. 320 nm	7.77 c	9.00 c	10.60 b	12.10 a
D.O. 365 nm	1,63 c	2,46 bc	3,70 b	5,16 a
IPT 280 nm	9.40 b	10.77 b	13.03 a	14.60 a
CIELab a*	-0,44 a	-0,69 b	-0,67 b	-0,71 b
CIELab b*	4,98 a	4,19 b	4,66 a	4,62 ab
CIELab L*	97,74 b	99,06 a	98,69 a	98,83 a
CIELab C*	5,00 a	4,25 b	4,71 a	4,68 ab
CIELab H*	95,09 b	99,34 a	98,29 a	98,78 a
Taninos (g/l)	0,167 a	0,113 b	0,149 a	0,162 a
Catequinas (mg/l)	35,19 a	24,94 b	26,33 b	25,00 b

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Tukey $p < 0.05$

Este proceso dio lugar a una mayor extracción de potasio, que aumentó con el tiempo de maceración y precipitó como bitartrato potásico, por lo que el contenido de ácido tartárico y la acidez total disminuyeron. La concentración de ácido málico fue ligeramente superior en los vinos criomacerados frente a los testigos. El contenido de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles se incrementó paralelamente al aumento del tiempo de criomaceración; y el índice de polifenoles totales alcanzó los valores más altos con 6 y 8 horas de maceración. La concentración de taninos apenas se vio influenciada por el empleo de esta práctica, mientras que la de catequinas disminuyó con independencia de su duración. El color CIELab de todos los vinos fue amarillo/verdoso, observándose un aumento en los valores de las coordenadas CIELab L* (claridad) y CIELab H* (tono) en los vinos criomacerados frente a los testigos; y una disminución de la coordenada CIELab a* (rojo/verde). En otros trabajos también se observó un efecto variable de esta práctica enológica



en función del tiempo y de la temperatura empleados. Wang et al. (2016) estudiaron el efecto de diferentes técnicas de maceración en frío sobre los vinos de la variedad Chenin Blanc, observando que únicamente la fermentación en contacto con los hollejos incrementó significativamente el contenido de etanol, pH, color y compuestos fenólicos, y disminuyó la acidez total.

La composición aromática de los vinos se modificó como consecuencia de la criomaceración (Tabla 3).

Tabla 3. Composición aromática de los vinos

Compuestos	Testigo	Criomaceración		
		4 h	6 h	8 h
1-Propanol	32.22	31.24	33.21	31.28
Isobutanol	0.348 b	0.359 ab	0.416 a	0.376 ab
1-Butanol	33.89	31.76	34.24	32.89
Alcoholes amílicos	258	247	265	247
2-fenil-etanol	43.15 a	36.08 b	37.95 ab	34.69 b
1-Hexanol	0.336	0.319	0.289	0.295
Alcohol bencílico	0.068	0.101	0.095	0.071
Metionol	1.86 a	1.29 b	1.19 b	1.19 b
cis 3-hexenol	0.442	0.244 c	0.246 c	0.296 b
3-etoxi-1-propanol	0.433 b	0.535 a	0.527 a	0.510 a
Σ Alcoholes	371	349	373	348
Acetato isoamilo	7.00 b	9.07 ab	10.07 a	10.05 a
Acetato hexilo	0.087	0.106	0.097	0.104
Acetato 2-feniletilo	0.717 c	0.851 bc	1.044 a	0.969 ab
Σ Acetatos	7.80 b	10.02 ab	11.21 a	11.13 a
Propionato etilo	0.227 a	0.104 b	0.111 b	0.094 b
Etil-3-hidroxitirato	0.579	0.603	0.674	0.622
Isobutirato etilo	0.016 a	0.011 b	0.012 ab	0.013 ab
Butirato etilo	0.271	0.256	0.254	0.239
Hexanoato etilo	0.550	0.579	0.623	0.579
Octanoato etilo	0.541	0.665	0.617	0.562
Decanoato etilo	0.061	0.062	0.064	0.060
Σ Esteres	2.25	2.28	2.36	2.17
Acido isobutírico	2.35 a	1.66 b	1.99 ab	1.71 b
Acido isovalérico	3.20	2.60	2.50	2.55
Acido hexanoico	2.04 b	410 a	3.47 a	3.42 a
Acido octanoico.	1.52 b	2.58 a	2.69 a	2.71 a
Acido dodecanoico	0.154	0.302	0.337	0.319
Σ Acidos	9.26 b	11.24 a	10.99 ab	10.72 ab
Lactato etilo	1.60 a	1.12 b	1.12 b	1.03 b
Succinato dietilo	0.273 b	0.277 b	0.421 a	0.369 a
Acetoína	0.576 bc	0.519 c	0.847 ab	1.035 a

Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Tukey $p < 0.05$



Se observó un incremento significativo en la concentración de acetatos (acetato de isoamilo y de 2-feniletilo), que alcanzó su valor máximo con 6 horas de maceración. Estos compuestos manifiestan un alto impacto sensorial en el aroma de los vinos aportando notas características (plátano, rosas, floral...). Otros compuestos volátiles (3-etoxi-1-propanol, ácido hexanoico, ácido octanoico y acetoína) también aumentaron en los vinos criomacerados y algunos disminuyeron respecto a los vinos testigo (2-fenil etanol, metionol, cis-3-hexenol, propionato, ácido isobutírico y lactato de etilo). La concentración total de acetatos y ácidos en los vinos criomacerados aumentó respecto a los testigos. Los acetatos fueron superiores en los vinos criomacerados durante 6 y 8 horas, aunque sin diferencias significativas respecto a 4 horas. Los ácidos fueron mayores en los vinos criomacerados, aunque las únicas diferencias respecto a la elaboración testigo se observaron con 4 horas de maceración. El contenido total de ésteres no se vio influenciado por el tipo de elaboración ni por la duración de la criomaceración.

En otros trabajos los efectos de esta práctica fueron variables en función del tiempo y la temperatura empleados. Alti-Palacios et al. (2023) observaron que el tratamiento de criomaceración durante 6 horas mejoró la concentración relativa total de alcoholes, ésteres y ácidos en diferentes variedades blancas, pero no influyó significativamente sobre los terpenos. Pen et al. (2013) indicaron que la criomaceración incrementó el contenido de compuestos volátiles paralelamente al descenso de la temperatura, mejorando la intensidad aromática y complejidad de los vinos de la variedad Meili. Otros autores (Rodríguez-Bencomo et al., 2008) no apreciaron mejora sensorial en los vinos elaborados con maceración prefermentativa, ni diferencias en el contenido de volátiles libres.

La extracción de numerosos compuestos fenólicos de la uva (ácidos cinámicos, flavanoles y flavonoles) se vio favorecida por la criomaceración y su duración, aunque algunos no mostraron diferencias significativas entre 6 y 8 horas (Figura 1). Los polifenoles son responsables del color y características gustativas de los vinos, así como de su potencial de envejecimiento, y debido a su actividad antioxidante pueden ejercer efectos positivos sobre la salud. Su concentración está muy influenciada por la variedad y los métodos de vinificación que incrementan el contacto entre el mosto y los hollejos (Baiano et al., 2017; Lukic et al., 2017). Gomez-Minguez et al. (2007) señalaron que el control de las condiciones de maceración (tiempo y temperatura) es muy importante para reducir el pardeamiento en vinos blancos.

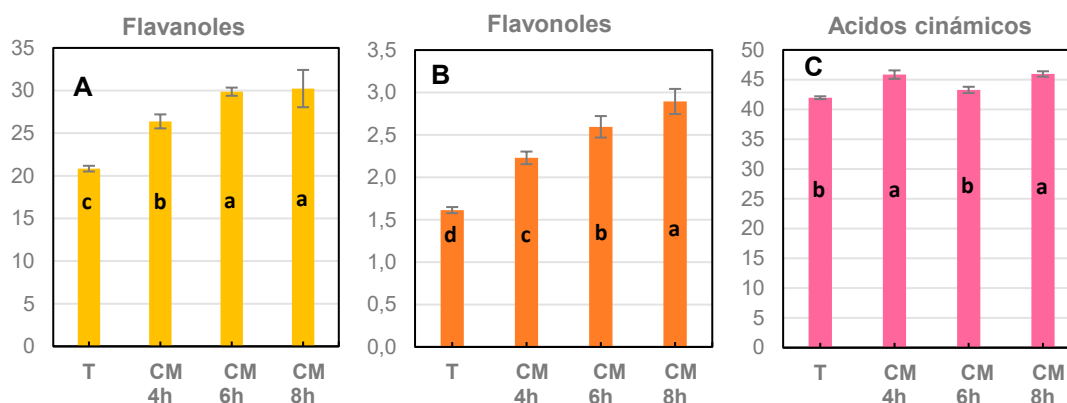


Figura 1. Influencia del tiempo de criomaceración sobre la composición fenólica (mg/l) de los vinos: (A) flavanoles, (B) flavonoles y (C) ácidos cinámicos

Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey $p < 0.05$



Los efectos de la criomaceración sobre la calidad organoléptica de los vinos de Tempranillo Blanco fueron positivos, sin diferencias relacionadas con su duración. Los vinos testigo tuvieron una mayor puntuación, y por tanto menor calidad según la ficha de cata empleada (Figura 2A). En los vinos elaborados mediante maceración en frío aumentaron los aromas florales y afrutados y el carácter varietal, y la estructura, persistencia y equilibrio gustativo (Figura 2B). Los resultados de las pruebas triangulares únicamente permitieron diferenciar de forma significativa los vinos testigo y los criomacerados durante 8 horas.

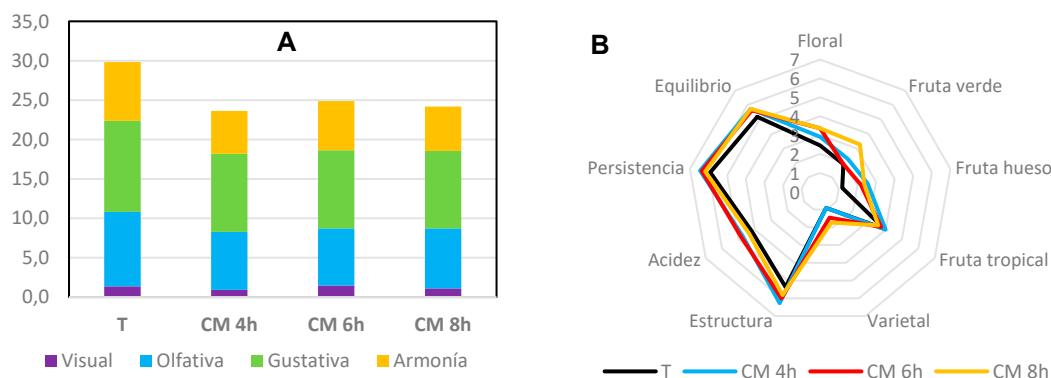


Figura 2. Valoración organoléptica de los vinos elaborados con diferentes tiempos de maceración prefermentativa (A) y descriptores sensoriales (B)

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto la influencia del tiempo de maceración prefermentativa en frío con aplicación de hielo seco sobre la composición química y la calidad sensorial de los vinos de Tempranillo Blanco. Esta práctica puede ser una alternativa para diversificar el estilo de vinos elaborados con esta variedad, para la que se puede estimar una duración óptima de 6 horas.

5. Bibliografía

1. ALEIXANDRE-TUDO, J. L.; WEIGHTMAN, C.; PANZERI, V.; NIEUWOUDT, H. H.; DU TOIT, W. J. 2015. Effect of skin contact before and during alcoholic fermentation on the chemical and sensory profile of South African Chenin blanc white wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 366-377.
2. ALTI-PALACIOS, L.; MARTINEZ, J.; TEIXEIRA, J.A.C.; CÂMARA, J.S.; PERESTRELO, R. 2023. Influence of cold pre-fermentation maceration on the volatilomic pattern and aroma of wines. *Foods*, 12 (6), 1135.
3. ARNOLD, R. A.; NOBLE, A. C. 1979. Effect of pomace contact on the flavor of Chardonnay wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(3), 179-181.
4. BAIANO, A.; MENTANA, A.; VARVA, G.; QUINTO, M. 2017. Effects of different vinification procedures and aging containers on phenolic and volatile composition of Greco white wines. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1667-1680.
5. CAI, J.; ZHU, B.Q.; WANG, Y.; LIU, L.; LAN, Y. B.; REEVES, M. J.; DUAN, C. Q. 2014. Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet



- Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chemistry*, 154, 217-229.
6. DI LECCE, G.; BOSELLI, E.; D'IGNAZI, G.; FREGA, N. 2013. Evolution of phenolics and glutathione in Verdicchio wine obtained with maceration under reductive conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 54-60.
 7. ESTI, M.; TAMBORRA, P. 2006. Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Analytica Chimica Acta*, 563, 173-179.
 8. GOMEZ-MINGUEZ, M. J.; GONZALEZ-MIRET, M. L.; ZERNANZ, D.; FERNANDEZ, M. A.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. 2007. Effects of prefermentative skin contact conditions on colour and phenolic content of white wines. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 238-245.
 9. HERNANDEZ-ORTE, P.; GUITART, A.; FERREIRA, V.; GRACIA, J.; CACHO, J. 1998. Effect of maceration time and the addition of enzymes on the amino acid composition of musts and wines and its influence on wine aroma. *Food Science and Technology International*, 4(6), 407-418.
 10. LUKIC, I.; LOTTI, C.; VRHOYSEK, U. 2017. Evolution of free and bound volatile aroma compounds and phenols during fermentation of Muscat blanc grape juice with and without skins. *Food chemistry*, 232, 25-35.
 11. MORENO-PEREZ, A.; VILA-LOPEZ, R.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, J.I.; MARTINEZ-CUTILLAS, A.; GIL-MUÑOZ, R. 2013. Influence of cold pre-fermentation treatments on the major volatile compounds of three wine varieties. *Food Chemistry*, 139(1-4), 770-6.
 12. PENG, C. T.; WEN, Y.; TAO, Y. S.; LAN, Y. 2013. Modulating the formation of Meili wine aroma by prefermentative freezing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(7), 1542-1553.
 13. PONS, A.; LAGVIGNE, V.; DARRIET, P.; DUBOURDIEU, D. 2015. Glutathione preservation during winemaking with vitis vinifera white varieties: example of Sauvignon blanc grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 66 (2), 187-194.
 14. RODRIGUEZ-BENCOMO, J.J.; MENDEZ-SILVERIO, J.J.; PEREZ-TRUJILLO, J.P.; CACHO, J. 2008. Effects of skin contact on bound aroma and free volatiles of Listan blanco wine. *J. Agric Food Chem*, 110, 214-225.
 15. SELLI, S.; CANBAS, A.; CABAROGLU, T.; ERTEN, H.; LEPOUTRE, J. P.; GUNATA, Z. 2006. Effect of skin contact on the free and bound aroma compounds of the white wine of Vitis vinifera L. cv Narince. *Food Control*, 17, 75-82.
 16. SINGLETON, V. L.; SIEBERHAGEN, H. A.; DE WET, P.; VAN WYK, C. J. 1975. Composition and sensory qualities of wines prepared from white grapes by fermentation with and without grape solids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26(2), 62-69.
 17. WANG, J.; HUO, S.; ZHANG, Y.; FAN, W. 2016. Impact of various maceration techniques on the phenolic and volatile composition of Chenin Blanc wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(11), 2360-2366.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado mediante un proyecto de investigación financiado por el Gobierno de La Rioja y cofinanciado al 50% con Fondos FEDER durante 2019 (Programa Operativo FEDER de La Rioja 2014-2020).

La aplicación foliar de jasmonato de metilo mejora la composición aromática, fenólica y nitrogenada de la variedad Tempranillo Blanco en la D.O.Ca. Rioja

I. Sáenz de Urturi, F.M. Ribeiro-Gomes, S. Marín-San Román, R. Murillo-Peña, L.L. Torres-Díaz, M. González-Lázaro, E.P. Pérez-Álvarez, T. Garde-Cerdán

Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja), Ctra. de Burgos Km. 6, 26007 Logroño (La Rioja). Teléfono de contacto: 941 05 30 58. Dirección de correo electrónico: teresa.garde.cerdan@csic.es

Resumen

El jasmonato de metilo (MeJ) es un elicitor que cuando se aplica en el viñedo puede mejorar la calidad de la uva. Aunque hay varios estudios sobre la influencia del MeJ en la composición de variedades de uva tinta, hasta donde sabemos, hay poca información sobre variedades de uva blanca, específicamente Tempranillo Blanco. Por ello, en este trabajo se estudió, por primera vez, el efecto de la aplicación foliar de MeJ en el viñedo, realizada en dos estados fenológicos, envero y post-envero, sobre la composición aromática, fenólica y nitrogenada de la uva de la variedad Tempranillo Blanco. Los resultados mostraron que el contenido de compuestos volátiles de la uva aumentó después de la aplicación de MeJ, especialmente terpenoides, C₁₃ norisoprenoides, bencenoides y alcoholes y, en general, principalmente cuando el elicitor se aplicó en post-envero. En cuanto a los compuestos fenólicos y nitrogenados, su concentración mejoró después de los tratamientos con MeJ, independientemente del tiempo de aplicación. En consecuencia, el tratamiento con MeJ mejoró la composición volátil, fenólica y nitrogenada de la uva, siendo más efectivo en post-envero. Consecuentemente, la aplicación foliar de MeJ en el viñedo de Tempranillo Blanco es una buena herramienta para mejorar la calidad de las uvas.

1. Introducción

La variedad Tempranillo Blanco es una mutación de la variedad Tempranillo encontrada en Murillo de Río Leza (La Rioja) en 1988 [1]. Esta variedad fue autorizada en la D.O.Ca. Rioja en 2008 y actualmente es una de las variedades de uva blanca con mayor superficie cultivada. Esta variedad tiene similitudes con Tempranillo, las características morfológicas, el comportamiento de adaptación a las condiciones de cultivo en La Rioja o la respuesta a enfermedades y plagas [2].

Debido a los efectos del cambio climático, la fisiología y fenología de la vid están cambiando, provocando un desajuste entre la madurez fenólica y la tecnológica [3], lo que está condicionando la calidad de la uva y del vino, aumentando la concentración de azúcares en la baya y provocando una disminución de la acidez, sin alcanzar la madurez fenólica óptima. En este sentido, existe un interés creciente en el uso de elicitores en viñedo, ya que son moléculas capaces de activar los mecanismos de defensa de las plantas, contribuyendo a su resistencia frente a diversas condiciones de estrés biótico y abiótico. Estudios preliminares han demostrado que la aplicación foliar de jasmonato de metilo (MeJ) puede afectar a la composición de la uva, principalmente modificando los compuestos fenólicos [4], nitrogenados [5] y aromáticos [6]. Todos estos estudios se han realizado con variedades de uva tinta. Solo dos trabajos han abordado el estudio de tratar foliarmente con MeJ variedades blancas, uno centrado en el efecto sobre el contenido de terpenos [7] y el otro en la influencia en la composición fenólica [8]. La aplicación



foliar de MeJ es una práctica vitícola interesante y de fácil manejo para mejorar la composición aromática, fenólica y nitrogenada de la uva. Además, este trabajo nos puede permitir evaluar el comportamiento de una variedad de uva blanca tan importante en la D.O.Ca. Rioja y tan poco estudiada como es la variedad Tempranillo Blanco.

2. Material y Métodos

Los tratamientos se realizaron en 2020 en un viñedo experimental de Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) situado en la Finca de La Grajera (Logroño). Para realizar las aplicaciones foliares se prepararon disoluciones acuosas con una concentración de 10 mM de MeJ (Sigma-Aldrich, Madrid, España), utilizando como agente humectante Tween 80 (Sigma-Aldrich) (1 mL/L) según trabajos previos [6, 9]. Las plantas control se trataron con una solución acuosa conteniendo únicamente Tween 80. Todos los tratamientos se aplicaron dos veces, en enero (MeJ-Env) o post-enero (MeJ-Post), y una semana después de cada uno de estos dos estados fenológicos. Para cada aplicación, se rociaron sobre las hojas 200 mL/planta. Los tratamientos se realizaron por triplicado y se dispusieron en un diseño de bloques al azar, con tres plantas por cada tratamiento y repetición. Cuando las uvas alcanzaron su momento óptimo de madurez tecnológica, grado alcohólico probable de 13% (v/v), se recolectó un conjunto aleatorio de 140 bayas por réplica y tratamiento, que se congelaron a -20 °C hasta realizar los análisis de composición volátil, fenólica y nitrogenada.

La determinación de compuestos volátiles en los mostos se realizó mediante microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) y posterior análisis por cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS), según el método descrito por Garde-Cerdán et al. [10]. Para analizar los compuestos fenólicos de las uvas, en primer lugar, se llevó a cabo su extracción, según el método de Portu et al. [4]. Posteriormente, para determinar los antocianos se llevó a cabo una inyección directa del extracto en el cromatógrafo líquido (HPLC) (Agilent, Palo Alto, EE. UU.), estando las condiciones cromatográficas recogidas en Sáenz de Urturi et al. [11]. Mientras que para el análisis del resto de familias de compuestos fenólicos (flavanoles, flavonoles, ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y estilbenos) fue necesaria una etapa de extracción en fase sólida (SPE) y posterior determinación cromatográfica, según Garde-Cerdán et al. [9]. El análisis de aminoácidos de los mostos se llevó a cabo mediante HPLC, con derivatización previa, por el método descrito por Garde-Cerdán et al. [5].

Dado que los tratamientos se realizaron por triplicado, los resultados de compuestos volátiles, fenólicos y nitrogenados se expresan como la media de 3 repeticiones ($n = 3$). El estudio estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS (Chicago, EE. UU.). Los datos de parámetros compuestos volátiles, fenólicos y nitrogenados se procesaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados del contenido de aromas primarios del mosto control y de las muestras procedentes de los tratamientos en el viñedo con MeJ en enero (MeJ-Env) y post-enero (MeJ-Post). Para todos los terpenoides se observó un aumento en su concentración en las muestras tratadas con MeJ, a excepción del linalool para MeJ-Env (Figura



1a). En el caso de citronelol y *p*-cimeno, este aumento fue significativo independientemente del momento de la aplicación (Figuras 1b y d). En cuanto a geraniol y geraniol acetona (Figuras 1c y e), así como para los terpenoides totales (Figura 2a), la mayor concentración se observó en las muestras tratadas después del envero (MeJ-Post).

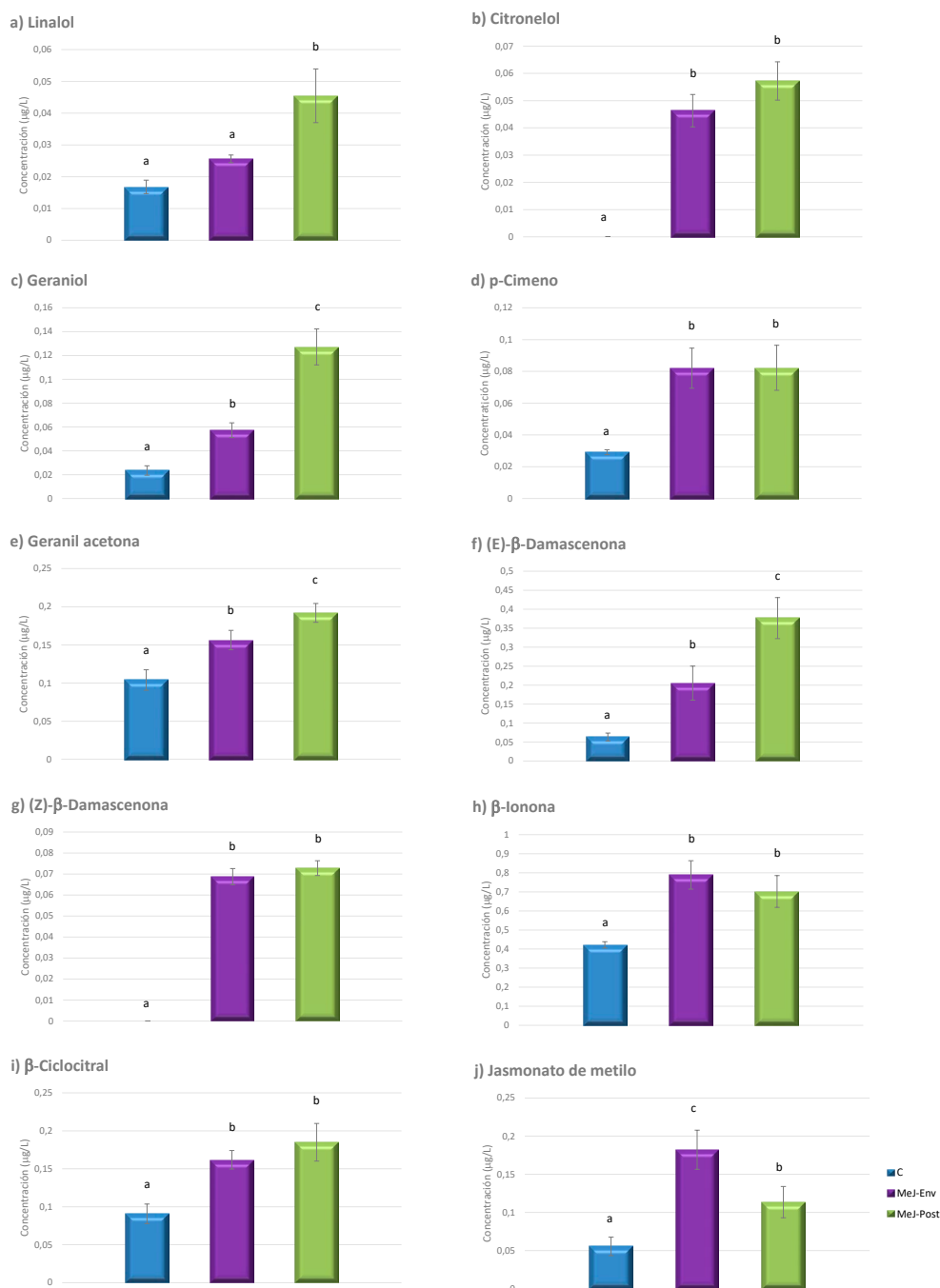


Figura 1. Concentración de terpenoides, C₁₃ norisoprenoides y jasmonato de metilo (µg/L) en los mostos control y en los procedentes de los tratamientos con MeJ en envero (MeJ-Env) y post-envero (MeJ-Post). Todos los parámetros se muestran con su desviación estándar (n = 3). Para cada compuesto, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras (p ≤ 0,05).



Este aumento descrito en el contenido de terpenos al aplicar MeJ, tanto individualmente (Figuras 1a-e) como en forma total (Figura 2a), es muy importante desde el punto de vista de la calidad organoléptica, ya que estos compuestos tienen umbrales bajos de percepción olfativa y contribuyen decisivamente al aroma afrutado y floral [12]. En el grupo de C₁₃ norisoprenoides y jasmonato de metilo, se observó un aumento en su concentración con la aplicación foliar de MeJ, independientemente del momento de aplicación (Figuras 1g-i y 2b). Sin embargo, para (E)- β -damascenona y jasmonato de metilo (Figuras 1f y j), el efecto del elicitor fue diferente según el momento de aplicación; en el caso del jasmonato de metilo (Figura 1j), la mayor concentración se encontró en el envero (MeJ-Env), mientras que, para (E)- β -damascenona, la mayor concentración se observó en las muestras MeJ-Post (Figura 1f). Como se ha mencionado para los terpenos, los C₁₃ norisoprenoides también son de gran importancia para el aroma, debido a sus bajos umbrales de percepción, aportando notas florales [13]. Además de terpenos y C₁₃ norisoprenoides, se encontraron en los mostos compuestos bencénicos, alcoholes, compuestos carbonílicos y compuestos C₆ [11], pero por falta de espacio solo vamos a comentar los resultados de los totales por familias (Figura 2). Para los compuestos bencénicos y los alcoholes se observó que el tratamiento foliar con MeJ incrementó su contenido, en mayor medida cuando se aplicó en post-envero (Figuras 2c y d). Sin embargo, para los compuestos carbonílicos, solo la aplicación de MeJ-Post mostró influencia en su contenido (Figura 2e). De manera contraria, al aplicar MeJ-Env se observó un incremento en los compuestos C₆ (Figura 2f), compuestos que en altas concentraciones pueden ser negativos para la calidad.

En la Tabla 1 y en la Figura 2 se muestran los resultados de la composición fenólica del control y de las muestras procedentes de los tratamientos MeJ-Env y MeJ-Post. Los compuestos fenólicos encontrados para la variedad Tempranillo Blanco fueron: cinco flavonoles, dos flavanoles, un ácido hidroxibenzoico, cinco ácidos hidroxicinámicos y dos estilbenos (Tabla 1). Dentro del grupo de flavonoles, solo la concentración de kaempferol-3-gal e isoramnetina-3-glc en las uvas aumentó después de la aplicación foliar de MeJ, independientemente del momento de aplicación (Tabla 1). En cuanto al contenido de flavonoles totales (Figura 2g), el tratamiento con MeJ en post-envero incrementó su concentración en las uvas. Quercetina-3-glc y quercetina-3-glcU fueron los compuestos fenólicos más abundantes en Tempranillo Blanco, tal como encontraron otros autores en variedades de uva blanca [14]. Los flavonoles son pigmentos amarillos que contribuyen al color de las variedades blancas y presentan efectos positivos para la salud humana, debido a su actividad antioxidante [14]. Con respecto a los flavanoles, solo se encontraron catequina y epicatequina en las muestras de Tempranillo Blanco (Tabla 1). Se observó un aumento significativo de su concentración en las muestras tratadas, independientemente del momento de aplicación. Los resultados de flavanoles totales (Figura 2h) confirman que el tratamiento foliar con MeJ produjo un incremento en su concentración, siendo este efecto independiente del momento de aplicación. Estos compuestos afectan a la calidad de la uva y del vino, ya que son responsables de atributos sensoriales como la astringencia, estando además involucrados en la estabilidad del color a través de reacciones de co-pigmentación.

En el grupo de los ácidos hidroxibenzoicos, solo se identificó el ácido gálico (Tabla 1), obteniendo una mayor concentración en las muestras tratadas con MeJ. El ácido gálico tiene actividades antioxidantes y antifúngicas. En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos *trans*-caftárico y *trans*+*cis*-cutárico fueron los ácidos hidroxicinámicos más abundantes en las muestras de uva; estos compuestos aumentaron su concentración después de la aplicación de MeJ en post-envero (Tabla 1). Sin embargo, el contenido de ácido cafeico no se vio afectado por ninguno de los dos tratamientos con MeJ. El ácido *p*-cumárico aumentó su concentración después de la



aplicación de MeJ, independientemente del momento de aplicación. Por su parte, el contenido de ácido *trans*-ferráico aumentó con la aplicación foliar de MeJ, obteniéndose la mayor concentración de este ácido para MeJ-Post. La concentración total de ácidos hidroxicinámicos aumentó con ambos tratamientos (Figura 2i.) Los ácidos hidroxicinámicos pueden actuar como precursores de los vinilfenoles durante el envejecimiento del vino en barricas de roble y, por lo tanto, pueden ser responsables de la depreciación de las características sensoriales del vino.

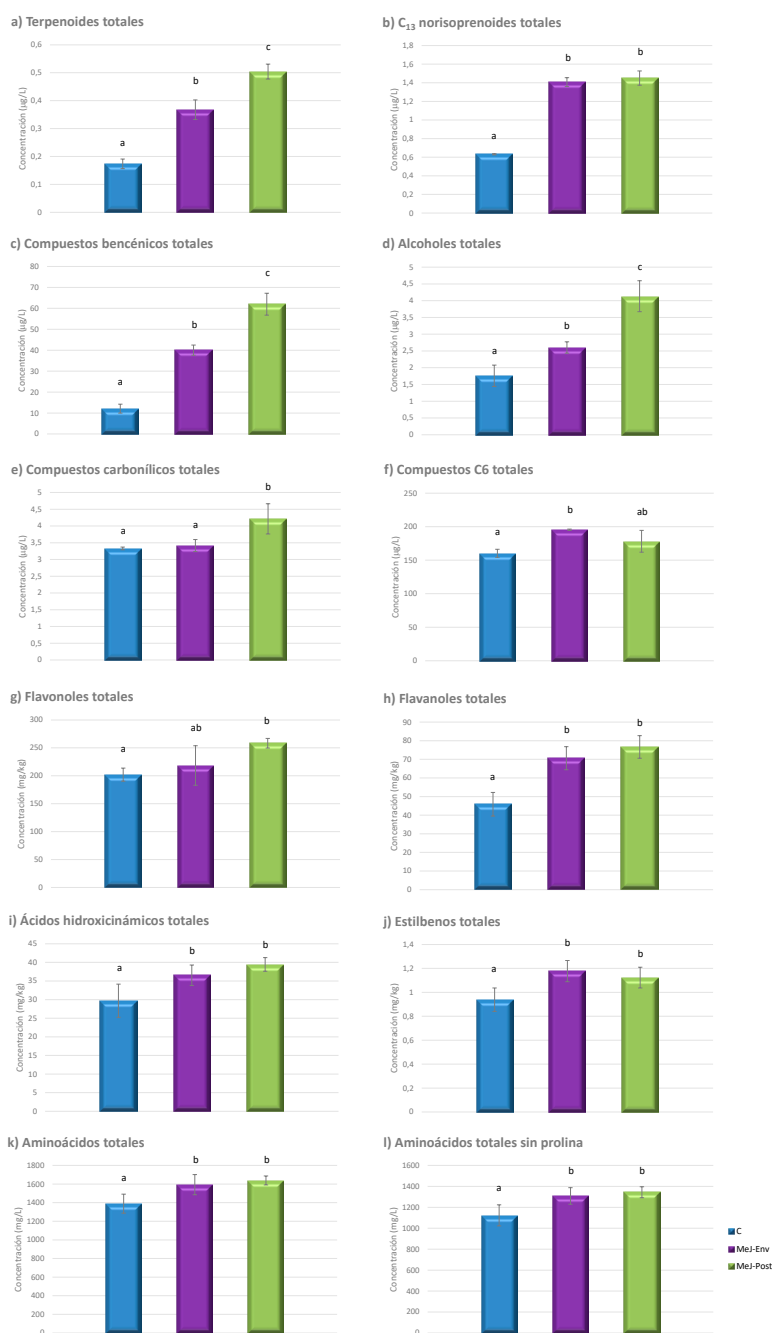


Figura 2. Concentración total de las familias de compuestos aromáticos ($\mu\text{g/L}$), fenólicos (mg/kg) y nitrogenados (mg/L) en los mostos control y en los procedentes de los tratamientos MeJ-Env y MeJ-Post. Todos los parámetros se muestran con su desviación estándar ($n = 3$). Para cada compuesto, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,05$).



Finalmente, para los estilbenos no se observaron diferencias significativas en su concentración después de la aplicación foliar de MeJ (Tabla 1). Sin embargo, se observa que la concentración total de estilbenos fue mayor después de la aplicación de MeJ (Figura 2j), independientemente del momento de la aplicación. Las uvas y los vinos se encuentran entre las principales fuentes dietéticas de estilbenos para la nutrición humana. Estos compuestos fenólicos poseen una gran variedad de actividades biológicas potencialmente beneficiosas para la salud humana [15].

Tabla 1. Concentración de compuestos fenólicos (mg/kg) en las uvas control y en las procedentes de los tratamientos con MeJ en enero (MeJ-Env) y post-enero (MeJ-Post)

	Control	MeJ-Env	MeJ-Post
Flavonoles			
Quercetina-3-glcU	71.79 ± 2.23 a	76.98 ± 15.88 a	94.42 ± 0.11 a
Quercetina-3-glc	98.58 ± 9.03 a	102.13 ± 18.80 a	122.94 ± 10.39 a
Kaempferol-3-gal	4.84 ± 0.24 a	6.05 ± 0.20 b	5.95 ± 0.21 b
Kaempferol-3-glc	17.07 ± 3.89 a	18.37 ± 0.11 a	18.04 ± 0.22 a
Isoramnetina-3-glc	9.67 ± 1.28 a	14.85 ± 1.89 b	16.98 ± 2.47 b
Flavanoles			
Catequina	23.45 ± 4.29 a	37.01 ± 3.23 b	36.82 ± 1.59 b
Epicatequina	22.40 ± 2.89 a	33.62 ± 3.24 b	39.85 ± 6.41 b
Ácido hidroxibenzoico			
Ácido gálico	11.04 ± 0.95 a	15.66 ± 1.32 b	17.12 ± 1.36 b
Ácidos hidroxicinámicos			
Ácido <i>trans</i> -caftárico	17.17 ± 2.55 a	20.96 ± 2.16 ab	22.39 ± 1.44 b
Ácidos <i>trans</i> + <i>cis</i> -cutárico	11.28 ± 1.92 a	14.11 ± 0.56 ab	15.52 ± 1.07 b
Ácido cafeico	0.11 ± 0.02 a	0.10 ± 0.02 a	0.09 ± 0.01 a
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.21 ± 0.04 a	0.34 ± 0.02 b	0.32 ± 0.03 b
Ácido <i>trans</i> -fertárico	0.93 ± 0.01 a	1.03 ± 0.03 b	1.14 ± 0.03 c
Estilbenos			
<i>trans</i> -Piceido	0.37 ± 0.07 a	0.61 ± 0.13 a	0.55 ± 0.09 a
<i>trans</i> -Resveratrol	0.56 ± 0.14 a	0.57 ± 0.01 a	0.57 ± 0.03 a

Nomenclatura: gal, galactósido; glcU, glucurónido; glc, glucósido. Todos los parámetros se muestran con su desviación estándar (n = 3). Para cada compuesto fenólico, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,05$).

La Tabla 2 y la Figura 2 muestran los resultados del contenido de aminoácidos en los mostos control y tras los tratamientos con MeJ (MeJ-Env y MeJ-Post). El aminoácido más abundante fue la arginina (Arg), que junto con la prolina (Pro) y el Gaba, representan aproximadamente el 76 % del total de aminoácidos. Además, la variedad Tempranillo Blanco es una variedad acumuladora de arginina, debido a que la relación Pro/Arg fue inferior a 1. La aplicación foliar de MeJ favoreció la síntesis de ácido aspártico, ácido glutámico, valina, triptófano, fenilalanina, isoleucina y leucina en el mosto, aumentando su concentración en las muestras,



independientemente del momento de la aplicación (Tabla 2). Cabe señalar que estos aminoácidos son precursores de alcoholes superiores y ésteres; por tanto, son las fuentes de nitrógeno que más influyen en el aroma fermentativo del vino [15]. El contenido de asparagina e histidina también aumentó con la aplicación de MeJ, mayoritariamente, cuando se aplicó en envero o post-envero, respectivamente; mientras que la concentración de alanina solo se vio afectada por el tratamiento MeJ realizado en envero (Tabla 2). El contenido del resto de aminoácidos no se modificó con la aplicación de MeJ. Además, el tratamiento foliar con MeJ incrementó significativamente el contenido de aminoácidos totales, con y sin prolina, independientemente del momento de aplicación (Figuras 2 k y l), lo que podría ser de especial interés para mostos pobres en nitrógeno.

Tabla 2. Concentración de aminoácidos (mg/L) en los mostos control y en los procedentes de los tratamientos con MeJ en envero (MeJ-Env) y post-envero (MeJ-Post)

	Control	MeJ-Env	MeJ-Post
Ácido aspártico (Asp)	8.69 ± 1.83 a	15.01 ± 2.96 b	18.36 ± 1.57 b
Ácido glutámico (Glu)	19.77 ± 1.34 a	29.03 ± 5.03 b	28.75 ± 3.00 b
Asparagina (Asn)	3.29 ± 0.02 a	7.62 ± 0.40 c	4.84 ± 0.72 b
Serina (Ser)	45.04 ± 4.12 a	51.47 ± 5.77 a	49.78 ± 2.69 a
Histidina (His)	7.63 ± 0.72 a	11.74 ± 1.45 b	17.47 ± 1.15 c
Glicina (Gly)	13.18 ± 2.91 a	12.88 ± 1.24 a	11.39 ± 1.08 a
Treonina (Thr)	49.11 ± 6.37 a	57.45 ± 4.48 a	58.26 ± 0.66 a
Citrullina (Cit)	10.46 ± 0.43 a	14.95 ± 2.86 a	13.99 ± 1.07 a
Arginina (Arg)	674.83 ± 67.56 a	751.42 ± 51.14 a	793.42 ± 63.75 a
Alanina (Ala)	53.13 ± 6.91 a	70.39 ± 7.61 b	61.81 ± 6.17 ab
Ácido γ-aminobutírico (Gaba)	123.14 ± 11.37 a	121.39 ± 10.13 a	117.60 ± 13.98 a
Tirosina (Tyr)	1.25 ± 0.26 a	1.57 ± 0.07 a	1.59 ± 0.31 a
Cisteina (Cys)	4.34 ± 0.73 a	5.36 ± 0.63 a	4.55 ± 0.41 a
Valina (Val)	26.46 ± 4.03 a	35.07 ± 3.23 b	39.62 ± 2.44 b
Metionina (Met)	6.08 ± 1.29 a	9.06 ± 0.06 a	8.81 ± 1.42 a
Triptófano (Trp)	29.31 ± 4.01 a	35.59 ± 1.56 b	37.73 ± 0.66 b
Fenilalanina (Phe)	20.94 ± 2.01 a	39.00 ± 1.61 b	39.64 ± 3.49 b
Isoleucina (Ile)	12.14 ± 2.33 a	17.63 ± 1.39 b	19.35 ± 1.33 b
Ornitina (Orn)	5.65 ± 0.92 a	7.14 ± 1.77 a	5.81 ± 1.12 a
Leucina (Leu)	15.61 ± 2.06 a	28.22 ± 2.23 b	27.85 ± 2.68 b
Lisina (Lys)	1.63 ± 0.27 a	1.69 ± 0.12 a	1.94 ± 0.32 a
Prolina (Pro)	257.22 ± 11.49 a	269.96 ± 26.55 a	276.81 ± 8.45 a

Todos los parámetros se muestran con su desviación estándar (n = 3). Para cada compuesto fenólico, letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras (p ≤ 0,05).



4. Conclusiones

Este trabajo presenta un estudio pionero sobre el efecto de la aplicación foliar de MeJ en el viñedo, realizada en dos estados fenológicos, envero y post-envero, sobre la composición fenólica, aromática y nitrogenada de la variedad Tempranillo Blanco. Los resultados mostraron que, tanto la aplicación foliar de MeJ en envero como en post-envero, incrementó el contenido en las uvas de diferentes compuestos aromáticos, fenólicos y nitrogenados, siendo algo mejores cuando el tratamiento se realizó en post-envero. Por lo tanto, la aplicación foliar de MeJ en viñedos de Tempranillo Blanco puede ser una buena herramienta para mejorar la calidad de las uvas.

5. Bibliografía

1. GARDE-CERDÁN, T.; DA COSTA, N.L.; RUBIO-BRETÓN, P.; BARBOSA, R.; BAROJA E.; MARTÍNEZ-VIDAURRE, J.M.; MARÍN-SAN ROMÁN, S.; SÁENZ DE URTURI, I.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E.P. 2021. **The most important parameters to differentiate Tempranillo and Tempranillo Blanco grapes and wines through machine learning.** Food Anal. Methods, 14, 2221–2236.
2. CARBONELL-BEJERANO, P.; IBAÑEZ, J.; ROYO, C.; BAROJA, E.; MARTÍNEZ, J.; GARCÍA-ESCUADERO, E.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M. 2018. **Tempranillo Blanco: origen, presente y futuro.** Cuaderno de Campo, 61, 36–39.
3. MIRA DE ORDUÑA, R. 2010. **Climate change associated effects on grape and wine quality and production.** Food Res. Int., 43, 1844–1855.
4. PORTU, J.; LÓPEZ, R.; BAROJA, E.; SANTAMARÍA, P.; GARDE-CERDÁN, T. 2016. **Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract.** Food Chem., 201, 213–221.
5. GARDE-CERDÁN, T.; PORTU, J.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P. 2016. **Effect of methyl jasmonate application to grapevine leaves on grape amino acid content.** Food Chem., 203, 536–539.
6. GARDE-CERDÁN, T.; GUTIÉRREZ-GAMBOA, G.; BAROJA, E.; RUBIO-BRETÓN, P.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E.P. 2018. **Influence of methyl jasmonate foliar application to vineyard on grape volatile composition over three consecutive vintages.** Food Res. Int., 112, 274–283.
7. WANG, J.; VANDERWEIDE, J.; YAN, Y.; TINDJAU, R.; PICO, J.; DELUC, L.; ZANDBERG, W.F.; CASTELLARIN, S.D. 2022. **Impact of hormone applications on ripening-related metabolites in Gewürztraminer grapes (*Vitis vinifera* L.): The key role of jasmonates in terpene modulation.** Food Chem., 388, 132948.
8. RANJBARAN, E.; GHOLAMI, M.; JENSEN, M. 2022. **Near-harvest application of methyl jasmonate affected phenolic content and antioxidant properties in “Thompson Seedless” grape.** Food Sci. Nutr., 10, 477–486.
9. GARDE-CERDÁN, T.; SÁENZ DE URTURI, I.; RUBIO-BRETÓN, P.; MARÍN-SAN ROMÁN, S.; BAROJA, E.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, G.; DELGADO-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E.P. 2022. **Foliar application of methyl jasmonate and methyl jasmonate supported on nanoparticles: Incidence on grape phenolic composition over two seasons.** Food Chem., 402, 134244.
10. GARDE-CERDÁN, T.; RUBIO-BRETÓN, P.; MARÍN-SAN ROMÁN, S.; SÁENZ DE URTURI, I.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E.P. 2020. **Pre-fermentative maceration with SO₂ enhanced the must aromatic composition.** Food Chem., 345, 128870.



11. SÁENZ DE URTURI, I.; RIBEIRO-GOMEZ, F.M.; MARÍN-SAN ROMÁN, S.M; MURILLO-PEÑA, R.; TORRES-DÍAZ, L.; GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E.P.; GARDE-CERDÁN, T. 2023. **Vine foliar treatments at veraison and post-veraison with methyl jasmonate enhanced aromatic, phenolic and nitrogen composition of Tempranillo Blanco Grapes.** Foods, 12, 1142.
12. MELE, M.A.; KANG, H.-M.; LEE, Y.-T.; ISLAM, M.Z. 2020. **Grape terpenoids: Flavor importance, genetic regulation, and future potential.** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 61, 1429–1447.
13. TOMAISNO, E.; BOLMAN, S. 2021. **The potential effect of β -ionone and β -damascenone on sensory perception of Pinot Noir wine aroma.** Molecules, 26, 1288.
14. CASTILLO-MUÑOZ, N.; GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. 2010. **Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars.** J. Food Compos. Anal., 23, 699–705.
15. GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; SÁENZ DE URTURI, I.; MURILLO-PEÑA, R.; MARÍN-SAN ROMÁN, S.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E.P.; RUBIO-BRETÓN, P.; GARDE-CERDÁN, T. 2022. **Effect of methyl jasmonate and methyl jasmonate plus urea foliar applications on wine phenolic, aromatic and nitrogen composition.** Beverages, 8, 52.

***Lachancea thermotolerans*: herramienta biotecnológica para acidificar y su efecto en el desarrollo de la fermentación maloláctica**

Gemma Roca-Domènech¹, M. Carme Masqué-Tell¹, M. Claustre Grau-Bella¹, Josefa Capdevila-Mestres¹ y Anna Puig-Pujol^{1,2}

*Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI)*¹, *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)*². Plaça Àgora, 2-3, 08720, Vilafranca del Penedès, Barcelona. 93.890.02.11. grocad@gencat.cat

Resumen

El cambio climático es un hecho que está afectando a la elaboración del vino. Frecuentemente los mostos presentan una elevada concentración de azúcares, acidez total baja y pH elevado. Las levaduras vínicas pueden ser una herramienta biológica interesante para mitigar estos efectos, en especial el uso de una levadura no-*Saccharomyces* como *Lachancea thermotolerans* (2-3 primeros días) en inoculación secuencial con una *Saccharomyces cerevisiae* para finalizar la fermentación alcohólica (FA). *L. thermotolerans* es capaz de consumir parte de los azúcares del mosto y producir ácido láctico, contribuyendo al aumento de la acidez total, disminución del pH y reducción de unas décimas del grado alcohólico, además de participar en la síntesis de compuestos aromáticos que repercuten en el perfil sensorial de los vinos. Sin embargo, es importante estudiar la influencia que puede tener la presencia y metabolismo de *L. thermotolerans* en el desarrollo de la fermentación maloláctica (FML) con una cepa de *Oenococcus oeni*, inducida ya sea simultánea o secuencialmente a la FA.

Este estudio evalúa el efecto en FA y FML de 3 cepas de *L. thermotolerans*: 1 cepa comercial y 2 cepas de la colección de INCAVI aisladas de vides silvestres, en 2 variedades de uva tinta: Syrah (Sy) y Cabernet sauvignon (Cs).

1. Introducción

El aumento de las temperaturas y la variación en la distribución de la pluviometría está induciendo al calentamiento global, conocido como cambio climático. Estas alteraciones afectan directamente a la evolución y maduración de la uva, especialmente en las zonas vitivinícolas más cálidas, promoviendo un desfase en la maduración tecnológica y fenólica de las vides. Concretamente, la precoz maduración de la uva deriva en la obtención de mostos con una concentración elevada de azúcares, una concentración baja de ácidos y pH altos. La fermentación de estos mostos se traduce en la producción de vinos excesivamente cálidos, con menor acidez, mayor pH y con un aumento del grado alcohólico. Además, también contribuye a que los vinos sean microbiológicamente menos estables (Jones *et al.*, 2005; Mira de Orduña, 2010). Todas estas variaciones también afectan a la capacidad de envejecimiento de los vinos tranquilos y vinos espumosos con la consecuente afectación del perfil sensorial del producto final.

Tradicionalmente, se han estado usando herramientas químicas o físicas para revertir estos efectos, promoviendo la disminución del pH y el aumento de la acidez de los vinos. Dos de las herramientas más usadas por el sector son, por un lado, la adición de ácido tartárico en el



mosto y el uso de resinas de intercambio catiónico para aumentar la acidez y reducir el pH, respectivamente. Ambas, pero, también tienen inconvenientes, como la posible precipitación de los tartratos y la posible pérdida de compuestos que disminuyen la calidad de los vinos resultantes (Benito, 2018; Morata *et al.*, 2018).

Hoy en día, existen herramientas biológicas que se pueden usar como alternativas para revertir los efectos que el cambio climático está produciendo en el sector vitivinícola. Concretamente, estas herramientas biológicas se basan en el uso de levaduras de especies no-*Saccharomyces* (*Torulasporea*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Lachancea*...) con inoculación secuencial o coinoculación con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Está descrito que algunas de estas levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de incrementar la acidez de los vinos de forma natural además de repercutir positivamente en el perfil sensorial de los vinos obtenidos mediante la síntesis de compuestos aromáticos afrutados (Benito *et al.*, 2016; Vilela, 2018).

Concretamente, la especie *Lachancea thermotolerans* es de especial interés debido a su capacidad de consumir parte de los azúcares del mosto y transformarlos en ácido láctico (Jolly, Varela y Pretorius, 2014; Morata *et al.*, 2018), contribuyendo a incrementar ligeramente la acidez total, reduciendo el pH, y en consecuencia reduciendo en unas décimas el grado alcohólico de los vinos resultantes (Gobbi *et al.*, 2013; Ciani *et al.*, 2016; Morata *et al.*, 2018). Además, también está descrita la capacidad de algunas cepas de *L. thermotolerans* para incrementar el contenido de glicerol y reducir la acidez volátil de los vinos (Benito *et al.*, 2016; Gobbi *et al.*, 2013).

Sin embargo, a pesar de las capacidades descritas de *L. thermotolerans*, es importante estudiar la influencia que puede tener la presencia y metabolismo de *L. thermotolerans* en el desarrollo de la fermentación maloláctica (FML) con una cepa de *Oenococcus oeni*, inducida ya sea simultánea o secuencialmente a la FA.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos del estudio del efecto en fermentación alcohólica (FA) y FML de 3 cepas de *L. thermotolerans*: 1 cepa comercial (Lt c) y 2 cepas de la colección de INCAVI aisladas de vides silvestres (Lt 26F12 y Lt 4M15), en la elaboración de vinos a partir de 2 variedades de uva tinta: Syrah y Cabernet sauvignon, durante dos vendimias consecutivas (2018 y 2019).

2. Material y Métodos

En la primera vendimia (2018), se llevaron a cabo tres experiencias de vinificaciones de 100 kg/vinificación con la variedad Syrah (Figura 1): una vinificación control (Vc1) con acidificación química con 1 g/l de ácido tartárico y con FA y FML secuenciales, y dos vinificaciones (V1 y V2) con inoculación de una cepa Lt c y transcurridas 24h se inoculó una cepa de *S. cerevisiae* comercial (Sc c). En el caso de la experiencia V1, la inducción de la FML se realizó de manera secuencial a la FA, mientras que la experiencia V2 la FA y la FML se llevaron a cabo de manera simultánea, inoculando una cepa comercial de *Oenococcus oeni* (Oo) tras 24h de haber inoculado la cepa Sc c.

En la vendimia del 2019, se repitieron las experiencias, pero en este caso se realizaron, por un lado, dos vinificaciones de 100 kg/vinificación con la variedad Syrah y cuatro experiencias de 9 kg con la variedad Carbernet sauingnon, éstas últimas por triplicado (figura 1). Con las



experiencias con Syrah, se realizó una vinificación control (Vc2) y una vinificación (V3) donde se inoculó Lt c y transcurridas 24 h se realizó una coinoculación de Sc c y Oo para inducir la FA y la FML simultáneas. Por otro lado, con las experiencias con Cabernet sauvignon, se realizaron las vinificaciones control (Vc3) y las vinificaciones inoculando Lt c (V4), Lt 26F12 (V5) o Lt 4M15 (V6) y transcurridas 96h se inoculó una cepa de *S. cerevisiae* (Sc vs o Vc3) de la colección de levaduras de INCAVI aisladas de vides silvestres. La FML se indujo de forma secuencial una vez finalizada la FA.

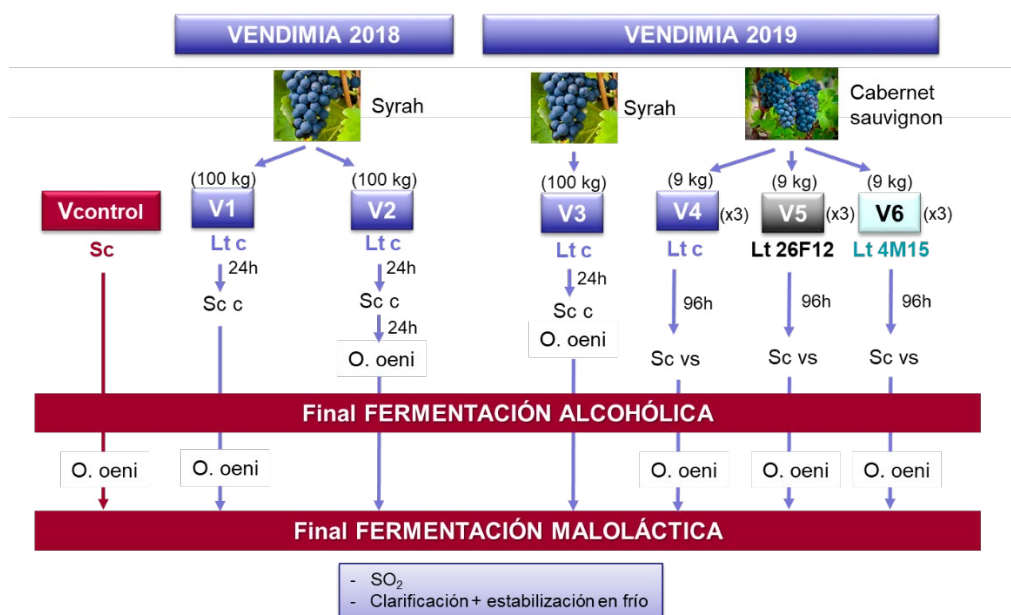


Fig. 1. Esquema gráfico de las vinificaciones realizadas en las vendimias 2018 y 2019.

La tabla 1 muestra las características fisicoquímicas de los mostos de partida, tanto de la variedad Syrah como de Cabernet sauvignon utilizadas en cada una de las vendimias (2018 y 2019).

Tabla 1. Características físico-químicas del mosto inicial de las variedades Syrah y Cabernet sauvignon utilizados en las experiencias.

	Syrah 2018	Syrah 2019	Cabernet sauvignon 2019
°Brix	24,6	24,5	23,5
GAP (%v/v)	14,55	14,44	14,17
AT (g/L)	4,4	4,2	3,6
pH	3,48	3,44	3,59
Ác. L-Málico (g/L)	2,2	1,9	1,4
NFA (mg/L)	127	152	91
T ^a vinif. (°C)	23	23	16



Las vinificaciones se llevaron a cabo en depósitos de acero inoxidable, y con un proceso de elaboración estándar para vinos tintos. Durante la FA y la FML se llevó a cabo un control diario de densidad y de temperatura. Se realizó también el seguimiento en placa de las poblaciones viables de microorganismos, usando medios selectivos para levaduras: agar Sabouraud cloranfenicol, (Scharlau, Barcelona, España) y de bacterias lácticas: MRS con 50 mg/l de nistatina (Scharlau, Barcelona, España).

Además, para comprobar que las cepas inoculadas se hubieran implantado eficientemente y fueran las responsables del desarrollo de las fermentaciones, se aplicaron dos técnicas moleculares para la tipificación de levaduras y bacterias lácticas (BAL). Concretamente, las levaduras (Sc y Lt) se tipificaron por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción de ADN mitocondrial (RFLP-mtDNA) (Querol *et al.*, 1992; OIV 2011), antes de inocular las cepas de Sc c y Sc vs, a la mitad y a final de FA, mientras que para las BAL se usó la amplificación al azar del ADN polimórfico-reacción en cadena para la polimerasa (RAPD-PCR) con el cebador M13 a los 2/3 de FML (Rossetti y Giraffa, 2005; OIV, 2012; Masqué *et al.*, 2011).

Los vinos acabados se sulfitaron, clarificaron, estabilizaron en frío y se filtraron antes de embotellar. Finalmente, se realizó una caracterización físico-química y organoléptica de los vinos embotellados.

3. Resultados

3.1. Fermentación alcohólica (FA) e implantaciones de levaduras (Sc y Lt)

En todas las experiencias de ambas vendimias se detectó, como era de esperar, un ligero retraso de la FA (entre 2 y 4 días) en las vinificaciones donde se inoculó de forma secuencial alguna de las cepas de Lt y una cepa de Sc respecto a la duración de la FA en el depósito control (solo con Sc). Pero en ninguno de los casos se detectaron problemas para finalizar la FA (Figura 2). La FA del Sy (2018) finalizaron a los 9 días para el depósito control (Vc1) y 11 días en los depósitos con Lt (V1 y V2), mientras que las vinificaciones de Sy (2019) terminaron a los 8 y 12 días para el depósito control (Vc2) y V3, respectivamente. Sin embargo, las FA del Cs (2019) se alargaron hasta los 28 días para el control (Vc3) y 32 días para los depósitos donde inicialmente se sembraron distintas cepas de Lt (V4, V5 y V6): Este hecho es debido muy probablemente a la baja *t*^a de FA (16°C) en la que se llevó a cabo la experiencia del Cs, respecto a los 23°C del Sy en ambas vendimias.

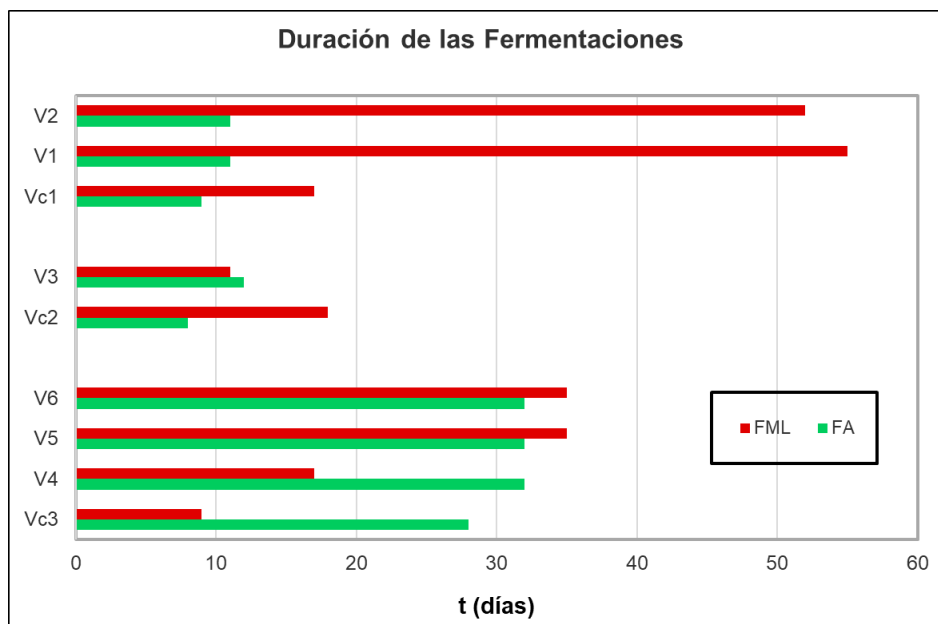


Fig. 2. Duración de las FA y FML (en días) en los ensayos de las vendimias 2018 (Vc1, V1 y V2) y 2019 (Vc2, V3; Vc3, V4, V5 y V6).

Los resultados del estudio de implantación de las *L. thermotolerans* de todas las experiencias (Tabla 2) muestran en las vinificaciones realizadas con Sy una implantación del 100% de la cepa de Lt c justo antes de inocular la cepa de Sc c, tanto en la vendimia de 2018 como en la de 2019. A mitad de FA la cepa de Lt c aún está presente en una proporción importante (42 %) en V1 y V2 de 2018, pero sin embargo no se detecta en V3 en 2019.

En el caso de las vinificaciones con Cs de la vendimia de 2019, la implantación de las Lt evaluadas (Lt c, Lt 26F12 y Lt 4M15) antes de sembrar la Sc v no fue tan buena como en los casos anteriormente mencionados, probablemente debido a la temperatura de vinificación más baja (16°C). No obstante, la presencia de las distintas cepas de Lt a mitad de FA osciló entre un 40% y un 60%. No se observó presencia de Lt a final de FA en ningún depósito.

En cuanto a la implantación de las cepas de Sc, en todas las vinificaciones control (Vc1, Vc 2 y Vc 3) donde sólo se inoculó una cepa de Sc (Sc c o Sc vs), ésta se implantó al 100% ya desde mitad de FA. No obstante, cuando en los depósitos, independientemente de la variedad o de la vendimia, actuaron secuencialmente Lt y Sc, la implantación de las cepas de Sc sembradas en cada caso a mitad o final de FA nunca fue completa, a excepción del depósito V3 a mitad de FA. La existencia de una proporción más o menos importante (desde un 8 % a un 42 %) de Sc indígenas es muy probablemente debido a la proliferación de éstas durante las primeras 24 h o 96 h en las que las Lt están actuando.



Tabla 2. Análisis de implantación de las levaduras (%) antes de inocular la cepa Sc, a mitad y a final de FA de las vinificaciones de las vendimias 2018 y 2019

		Implantación antes de la inoculación de Sc	Implantación a mitad de FA	Implantación a final de FA
Vendimia 2018	Vc1 (Sy)	-	100 % Sc c	100 % Sc c
	V1 (Sy)	100 % Lt c	42% Lt c + 42% Sc c + 16% otras Sc	67% Sc c + 33% otras Sc
	V2 (Sy)	100 % Lt c	42% Lt c + 16% Sc c + 42% otras Sc	92% Sc c + 8% otras Sc
Vendimia 2019	Vc2 (Sy)	-	100 % Sc c	100% Sc c
	V3 (Sy)	100 % Lt c	100 % Sc c	92% Sc c + 8% otras Sc
	Vc3 (Cs)	-	100 % Sc vs	100 % Sc vs
	V4 (Cs)	25% Lt c + 75% otras no-Sc	40% Lt c + 40 % Sc vs + 20 % otras Sc	75% Sc vs + 25% otras Sc
	V5 (Cs)	50% Lt 26F12 + 50% otras no-Sc	45% Lt 26F12 + 35% Sc vs + 20 % otras Sc	70% Sc vs + 30% otras Sc
	V6 (Cs)	66% Lt4M15 + 34% otras no-Sc	60% Lt 4M15 + 35% Sc vs + 5% otras Sc	65% Sc vs + 35% otras Sc

3.2. Fermentación maloláctica (FML)

Respecto a la cinética de la FML, la figura 2 muestra como en la variedad Syrah en la vendimia del 2018 se alargó hasta los 52-54 días en los casos donde se había inoculado la Lt c (V1 y V2) mientras que en la fermentación control (Vc1) la FML terminó transcurridos 18 días. Estos resultados podrían deberse al hecho de que *L. thermotolerans* produce ácido láctico a partir de los azúcares presentes en el mosto, y una concentración demasiado elevada de este ácido podría llegar a ralentizar o incluso inhibir la FML llevada a cabo por las BAL. Concretamente, V1 y V2 tenían unos valores de 4,15 g/l y 4,01 g/l de ácido láctico al terminar la FML, respectivamente. En cambio, Vc1 presentó una concentración de ácido láctico de 1,16 g/l al final de la FML (Tabla 3). En cambio, los resultados de la vendimia 2019 con la misma variedad mostraron que la FML V3 terminó 6 días antes que la FML de Vc2 (Figura 2). En este caso, la concentración de ácido láctico de V3 al final de la FML fue de 2,77 g/l y la de Vc2 de 1,31 g/l (Tabla 3). En este caso, a pesar del incremento de ácido láctico por parte de *L. thermotolerans* más el producido por *O. oeni*, esta cantidad no inhibió la FML en la vinificación V3.

Finalmente, los resultados de las vinificaciones de la variedad Cabernet sauvignon mostraron que la FML de Vc3 terminó a los 9 días de iniciarse y 8 días antes que la FML de V4 y que las FML de V5 y V6. Estas dos últimas no llegaron a terminar y se dieron por finalizadas a los 35 días de seguimiento ya que se detectó analíticamente un estancamiento en los valores de ácido málico y láctico (Figura 2). En este caso, las concentraciones de ácido láctico a final de la FML para Vc3, V4, V5 y V6 fueron de 1,48 g/l, 2,17 g/l, 2,87 g/l y 2,75 g/l, respectivamente (Tabla 3).



Respecto a la implantación de las BAL, en todas las vinificaciones se detectó una imposición de más de 90% de la cepa de Oo inoculada.

Con los resultados obtenidos, se pone en evidencia de que un incremento excesivo de ácido láctico debido al metabolismo de cepas de *L. thermotolerans*, sumado al producido por las BAL hasta valores cercanos o superiores a 3 g/l podrían ralentizar o inhibir la FML en la elaboración de vinos tintos.

3.3. Caracterización fisicoquímica de los vinos finales

De las características fisicoquímicas de los vinos resultantes de las vinificaciones en las que se utilizó una cepa de Lt (Lt c, Lt 26F12 o Lt 4M15) en comparación con los vinos control, cabe destacar que todos son vinos más ácidos. En la tabla 3 se puede observar como el incremento de acidez total es notable, aumentando entre 0,5 g/l y 2 g/l en ácido tartárico en las vinificaciones con Lt en comparación con las respectivas vinificaciones control. Este incremento de la acidez total es atribuible al contenido más elevado en ácido láctico. Concretamente, en la vendimia de 2018 con la variedad Syrah el ácido láctico incrementó aproximadamente 3 g/l en los vinos resultantes de las vinificaciones con Lt en comparación con las vinificaciones control, mientras que en la vendimia de 2019 (en las variedades Syrah y Cabernet sauvignon) incrementó entre 1g/l y 1,5 g/l. Una hipótesis para comprender estos resultados es que el incremento de ácido láctico que Lt puede producir durante los primeros días de fermentación puede estar relacionado con el tiempo en que Lt pueda actuar en solitario antes de inocular una cepa de Sc y/o BAL. Otras características que también se observaron fueron un ligero incremento de glicerol (0,5 g/l) y una reducción de unas décimas del grado alcohólico de los vinos producidos en presencia de Lt en comparación a los vinos control.

Tabla 3. Análisis de los parámetros fisicoquímicos de los vinos de las vendimias 2018 y 2019.

	Vendimia 2018					Vendimia 2019			
	Syrah			Syrah		Cabernet sauvignon			
	Vc1	V1	V2	Vc2	V3	Vc3	V4	V5	V6
Grado alcohólico adquirido (%v/v)	14,24	14,14	13,28	14,11	14,1	14,22 ± 0,07	14,15 ± 0,01	14,06 ± 0,03	14,06 ± 0,09
Acidez total (g/l de ácido tartárico)	6	8,2	8,2	6,5	7,3	5,17 ± 0,06	5,57 ± 0,06	7,35 ± 0,07	7,07 ± 0,1
pH	3,35	3,45	3,45	3,42	3,6	3,73 ± 0,01	3,7 ± 0,01	3,55 ± 0,02	3,57 ± 0,01
Ácido láctico (g/l)	1,16	4,15	4,01	1,31	2,77	1,48 ± 0,02	2,17 ± 0,05	2,87 ± 0,11	2,75 ± 0,04
Ácido málico (g/l)	<0,1	0,22	0,14	0,08	0,06	0,1 ± 0,00	0,1 ± 0,00	1,08 ± 0,09	0,86 ± 0,10
Ácido acético (g/l)	0,47	0,6	0,78	0,34	0,34	0,75 ± 0,02	0,77 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,69 ± 0,04
Glicerol (g/l)	9,4	10	9,9	10,5	10,9	9,77 ± 0,22	10,26 ± 0,27	10,22 ± 0,07	10,27 ± 0,2
So2 total (mg/l)	32	48	64	48	26	31 ± 7	34 ± 7	28 ± 0	31 ± 4
IPT (Abs 280 nm)	64,71	67,81	66,82	53,46	56,25	35,63 ± 3,93	37,27 ± 3,27	39,17 ± 0,48	39,60 ± 3,56
Abs 420 nm	4,798	5,705	6,013	5,321	7,243	3,523 ± 0,4	3,412 ± 0,26	4,08 ± 0,01	3,833 ± 0,32
Abs 520 nm	10,598	11,58	11,601	11,68	14,813	3,785 ± 0,58	4,534 ± 0,65	4,85 ± 0,32	4,813 ± 0,57
Abs 620 nm	1,614	2,121	2,384	1,726	3,013	0,847 ± 0,08	0,974 ± 0,09	1,04 ± 0,03	1,039 ± 0,07
IC	17,01	19,406	19,998	18,727	25,069	8,155	8,92	9,97	9,685



3.4. Caracterización organoléptica de los vinos finales

La caracterización sensorial de los vinos tintos de las dos vendimias ayudó a definir el impacto que tiene el metabolismo de las cepas de Lt (Lt c, Lt 26F12 o Lt 4M15) en los vinos producidos. Para su análisis se usó una ficha dividida en dos partes: en la primera se puntuaron descriptores organolépticos generales (color, aroma, sabor y post-sabor según su calidad e intensidad), y en la segunda, se definieron los descriptores aromáticos de los vinos.

En la figura 3 se muestra a modo de ejemplo los resultados obtenidos del análisis organoléptico (descriptores generales y aromáticos) de los vinos obtenidos en la vendimia del 2018 y 2019 con la variedad Syrah.

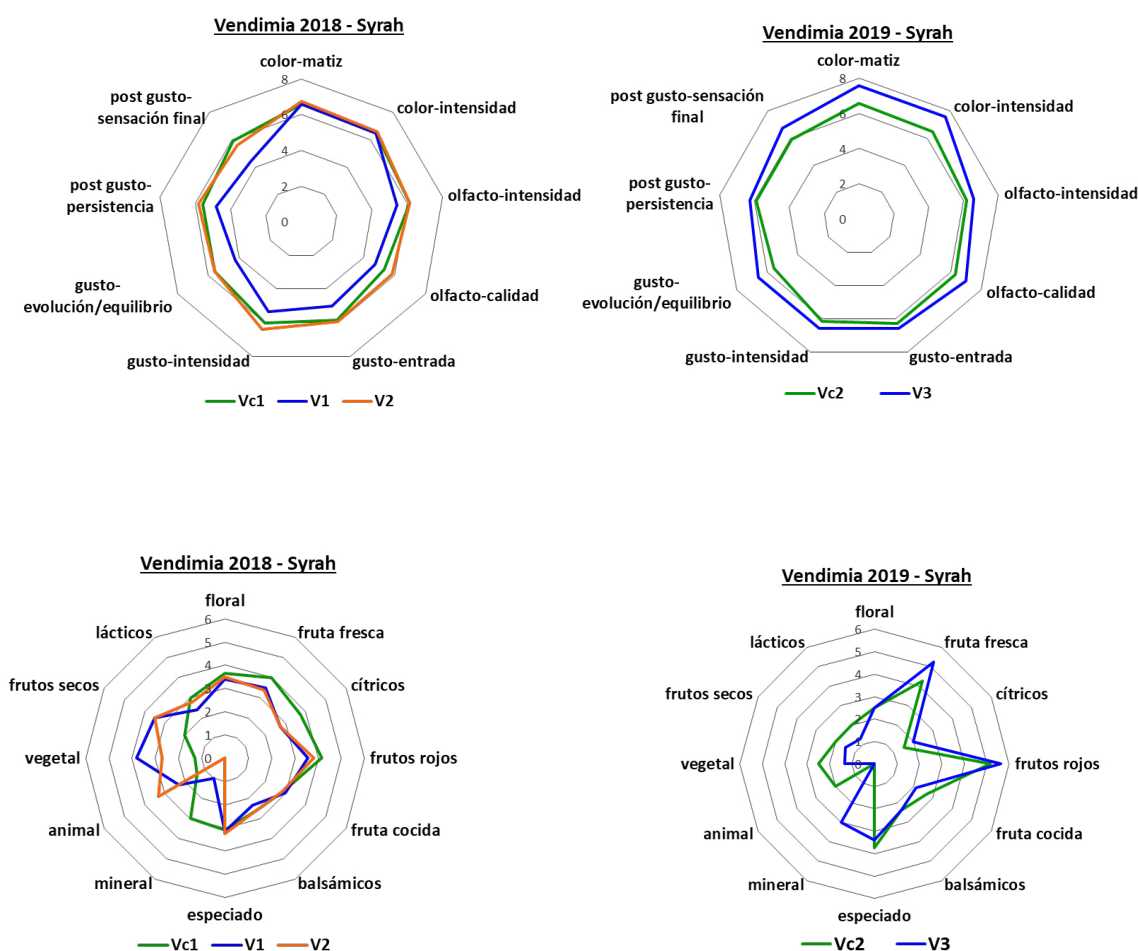


Fig. 3. Análisis organoléptico: descriptores generales (superior) y aromáticos (inferior) de los vinos de Syrah de las vendimias 2018 y 2019 (Vc1, V1, V2; Vc2, V3).

Los resultados de la descripción general de los vinos de las vendimias 2018 y 2019 de la variedad Syrah mostraron que las vinificaciones mejor valoradas fueron aquellas que habían sido inoculadas con Lt + Sc, tanto aquellas en las que la FA y la FML se había llevado a cabo de forma secuencial (V1) o coinoculada (V2 y V3), en comparación con las vinificaciones control inoculadas únicamente con Sc.



De la descripción aromática de los vinos se concluyó que los vinos de la vendimia de 2018 tenían un perfil bastante diferenciado entre ellos y destacaban los aromas vegetales y animales en las vinificaciones donde se había añadido Lt, probablemente debido a la larga duración de la FML, aunque los aromas florales y de frutos rojos son muy similares en todas las vinificaciones. Por otro lado, los vinos de la vendimia 2019 de Syrah fueron relativamente parecidos entre ellos a nivel aromático, pero ligeramente mejor valorado V3 en comparación con Vc2 (control), con muy poca presencia de aromas vegetales y animales (descriptores negativos) y con un predominio de la fruta fresca, roja y notas especiadas y sobre todo minerales.

La figura 4 describe los resultados de la evaluación sensorial de los vinos de Cabernet sauvignon de la vendimia 2019. Los catadores destacaron de los descriptores generales una menor preferencia por los vinos V6 elaborados con Lt 4M15, a nivel de equilibrio y persistencia del post-gusto, destacando una excesiva acidez de los vinos. En los descriptores aromáticos, los vinos presentaron perfiles diferentes entre ellos, destacando los aromas balsámicos en el vino control (Vc3), notas especiadas en los vinos elaborados con Lt 26F12 o fruta confitada-cocida en los vinos con Lt c. Los vinos elaborados en inoculación secuencial con una Lt y una Sc fueron evaluados en general como menos florales.

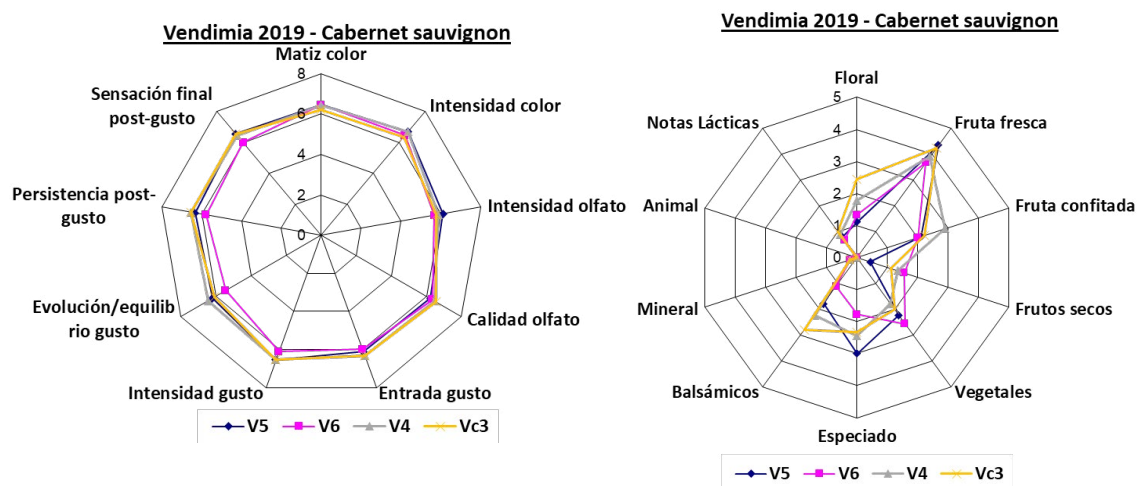


Fig. 4. Análisis organoléptico (descriptores generales y aromáticos) de los vinos de la vendimia de 2019 de la variedad Cabernet sauvignon (Vc3, V4, V5 y V6).

4. Conclusiones

De este estudio se puede concluir que el uso *L. thermotolerans* (Lt c, Lt 26F12 o Lt 4M15) en inoculación secuencial o coinoculación con una cepa de *S. cerevisiae* (Sc c o Sc vs) puede ser una buena herramienta para obtener vinos con mayor grado de acidez debido a la producción de ácido láctico por parte de Lt. Sin embargo, los resultados parecen indicar que elevadas concentraciones de ácido láctico (cercanas o superiores a 3 g/l) podrían interferir en el desarrollo de la FML. Para poder solventar este fenómeno, el incremento de la acidez se podría modular con una estrategia de inoculación entre las cepas de levadura (no-Sc y Sc) y de BAL utilizadas. El tiempo de actuación de las cepas de Lt antes del inóculo de Sc parece ser óptimo en 24 h y los mejores resultados se han obtenido cuando las BAL se han coinoculado con una cepa de Sc y se ha inducido la FA y la FML simultáneamente.



Con los resultados obtenidos en ambas vendimias y con dos variedades evaluadas, todo parece indicar que el uso de Lt en combinación con Sc y BAL podría ser una buena estrategia biológica, no solo para aumentar de forma natural la acidez de los vinos, sino también para reducir el grado alcohólico, incrementar el contenido de glicerol y obtener un buen perfil organoléptico.

5. Bibliografía

1. BENITO, A.; CALDERÓN, F.; PALOMERO, F.; BENITO, S. (2016). **Quality and composition of Airén wines fermented by sequential inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae***. *Food Technol. Biotechnol.* 54 (2), p. 135-144.
2. BENITO, S. (2018). **The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on wine-making**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (16), p. 6775-6790.
3. CIANI, M.; MORALES, P.; COMITINI, F.; TRONCHONI, J.; CANONICO, L.; CURIEL, JA; ORO, L.; RODRIGUES, A. J.; GONZALEZ, R. (2016). **Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines**. *Front. Microbiol.* 7, p. 642.
4. GOBBI, M.; COMITINI, F.; DOMIZIO, P.; ROMANI, C.; LENCIONI, L.; CIANI, M. (2013). ***Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine**. *Food Microbiol.* 33, p. 271-281.
5. JOLLY, N. P.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. (2014). **Not your ordinary yeast: *Non-Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered**. *FEMS Yeast Res.* 14, p. 215-237.
6. JONES, G.; WHITE, M. A.; COOPER, O. R.; STORCHMANN, K. (2005). **Climate change and global wine quality**. *Climatic Change*, 73, p. 319-334.
7. MASQUÉ, M. C.; SOLER, M.; ZAPLANA, B.; FRANQUET, R.; RICO, S.; ELORDUY, X.; PUIG, A.; BERTRAN, E.; CAPDEVILA, F.; PALACIOS, A. T.; ROMERO, S. V.; HERAS, J. M.; KRIEGER-WEBER, S. (2011). **Ethyl carbamate content in wines with malolactic fermentation induced at different points in the vinification process**. *Annals of Microbiology*, 61, p. 199-206.
8. MIRA DE ORDUÑA, R. (2010). **Climate change associated effects on grape and wine quality and production**. *Food Res. Int.* 43, p. 1844-1855.
9. MORATA, A.; LOIRA, I.; TESFAYE, W.; BAÑUELOS, M. A.; GONZÁLEZ, C.; SUÁREZ LEPE, J. A. (2018). ***Lachancea thermotolerans* applications in wine technology**. *Fermentation*, 4, p. 53.
10. OIV (2011). **Molecular tools for identification of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and other species related to winemaking**. *Resolution OIV-OENO 408-2011*.



11. OIV (2012). **Biology molecular tools for identification of grape and wine lactic acid bacteria.** *Resolution OIV-OENO 409-2012.*
12. QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. (1992). **A comparative study of different methods of yeast strain characterization.** *Systematic and Applied Microbiology*, 15, p. 439-446.
13. ROSSETTI, L.; GIRAFFA, G. (2005). **Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-Generated, RAPD-PCR fingerprint databases.** *Journal of Microbiological Methods*, 63, p. 135-144.
14. VILELA, A. (2018). ***Lachancea thermotolerans*, the Non-Saccharomyces yeast that reduces the volatile acidity of wines.** *Fermentation*, 4, p. 56.

6. Agradecimientos

Agradecemos a la empresa LALLEMAND BIO S.L. su soporte y colaboración en este estudio. Agradecemos al personal de los laboratorios de INCAVI y al panel de catadores su colaboración en los análisis físico-químicos y sensoriales.

Nuevas variedades de vid en la Región de Murcia, 2000 - 2023. Historia de una selección, fases y criterios empleados.

José Ignacio Fernández Fernández, M^a Rocío Gil Muñoz, Juan Daniel Moreno Olivares, Juan Antonio Bleda Sánchez, Celia Martínez-Mora, Juan Corredor Cano, Ana Cebrián Pérez, David Martínez Balsas, José Cayetano Gómez Martínez, José Antonio Martínez Jiménez, M^a Gertrudis García Pérez, M^a Severa Palencia Sigüenza, Juan Carlos Carcelén Cutillas, María José Giménez Bañón, Santos Fernández García, Ana María Fuentes-Denia, Isidro Hita Gambín, Eliseo Salmerón Gómez, Carlos Ventura Padilla, Adrián Yepes Hita, Diego José Fernández López, Adrián Martínez Cutillas, Leonor Ruiz-García

IMIDA, Avenida de la Asunción nº 24, 30520 Jumilla (Murcia), 968757580, josei.fernandez@carm.es

Resumen

El IMIDA, desde el año 2000, ha desarrollado un programa de obtención de nuevas variedades de vid a partir de monastrell, en un clima semiárido mediterráneo. En una primera fase se estudiaron 1591 cruces de monastrell, establecidos en campo a partir de la germinación de semillas procedentes de los cruzamientos. Una vez que estos cruces entraron en producción, se realizó una selección basada en la calidad de la uva, partiendo solo de una cepa por cruce. En una segunda fase se estudiaron 44 cruces tintos y 12 blancos, preseleccionados en la primera fase, partiendo de 20 cepas de cada cruce injertadas sobre R110. La selección se realizó por fecha de vendimia y calidad del vino con los datos de varios años de estudio. En 2018 comenzó una tercera fase, donde se procedió a registrar las nuevas variedades de vid y su implantación en parcelas experimentales, en colaboración con bodegas y agricultores en distintas zonas de la Región de Murcia.

En marzo de 2022 se reconocieron como nuevas variedades comerciales, orden APA/228/2022 BOE 25/03/2022, (<https://www.boe.es/boe/dias/2022/03/25/pdfs/BOE-A-2022-4799.pdf>) apareciendo en el boletín de registro de variedades comerciales de la oficina española de variedades comerciales N° 2/2022 (27/04/2022). Así mismo, el 04/04/2022, la CVPO (Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales), concedió la protección comunitaria (<https://online.plantvarieties.eu/publicSearch?denomination=myrtia>). El BOE publicó el 1 de marzo 2023 su inclusión como variedades de vid autorizadas para producir vinos en la Región de Murcia (<https://www.boe.es/boe/dias/2023/03/01/pdfs/BOE-A-2023-5370.pdf>). Hablamos de Calblanque, Calnegre, Gebas y Myrtia.

1. Introducción

Los Equipos de Enología y Viticultura, de Mejora Genética Molecular y el Servicio de Certificación Sanitaria de Vid, que antes formaban el Departamento de Viticultura y Enología del IMIDA, vienen realizando un programa de mejora de la variedad Monastrell basado en cruzamientos con otras variedades, desde finales de los años 1990. El objetivo inicial fue obtener variedades adaptadas a zonas cálidas, con una composición fenólica elevada y un perfil mediterráneo. Estos objetivos se han ampliado, buscando resistencias, maduración con un grado Baumé bajo y variedades sin pepita. Todo este trabajo puede clasificarse en tres fases. La Tabla 1 recoge la cronología de las plantaciones de las fases 1 y 2 así como los análisis de uvas realizados en estas fases.



En la fase 1, las semillas obtenidas en el proceso de cruzamientos, se colocan en un marco de plantación de 3 m x 0,5 m. Las grandes plantaciones de semillas, fase 1, provenientes de cruces con Monastrell, se realizaron en 2001, 649 semillas, y en 2005, 942 semillas. Finalizaron en 2012 con la plantación de 2.258 semillas provenientes de cruzamientos de la preselección de cruces de los años 2003 y 2008. La selección en esta fase es por calidad de uva y del total de 1591 semillas plantadas en 2001 y 2005, se preseleccionan 44 cruces tintos y 13 blancos. De las 2258 semillas plantadas en 2012, se preseleccionaron 5 cruces tintos.

Tabla 1. Cronología de las plantaciones y análisis de uvas.

Año	Fase	Semillas	Cruces Tintos	Cruces Blancos	Cepas	Cepas / Ha	Análisis Cruces Tintos	Análisis Cruces Blancos
2001	F1	649			1	6.666	20	
2002							58	
2003	F2		10		20	3.200	67	12
2004							202	37
2005	F1	942			1	6.666	217	60
2006							180	18
2007							200	25
2008	F2		2	7	20	2.667	362	117
2009							420	163
2010	F2		16	1	20	2.667-3.200	578	234
2011							430	230
2012	F1	2.258			1	6.666	259	171
2012	F2		10		20	2.667		
2013							47	28
2014	F2		6	5	20	2.667	39	13
2015							44	13
2016							905	13
2017							94	13
2018	F2		5		20	2.667		

En la fase 2, la primera plantación tuvo lugar en 2003. Se seleccionaron 10 cruces tintos que provienen de los primeros cruzamientos realizados, antes de la plantación del año 2001. Tuvimos que comprobar que los criterios de selección eran eficaces y que los vinos obtenidos con estos cruces tenían un contenido polifenólico elevado. Por eso transcurre tanto tiempo hasta la siguiente plantación de la fase 2 en 2008, donde se plantaron 2 cruces tintos y 7 cruces blancos. Continuamos en 2010 con 16 cruces tintos y 1 blanco. El año 2012 se plantaron 10 cruces tintos y en, la última plantación de cruces de Monastrell fue en 2014, con 5 cruces tintos y 5 cruces blancos. De los 2.258 cruces dobles de la fase uno plantados en 2012, hicimos una preselección en 2016 de 100 cruces, y se preseleccionaron 5 en 2017 por ser los más adecuados a madurar con un grado Baumé bajo, de los que seguimos evaluando la calidad de su vino. En esta fase, los cruces preseleccionados en la fase 1, se injertan sobre R110 y las plantas injertadas, se colocaron a un marco de plantación de 3 m x 1,25 m. La selección de esta fase se hace por calidad de vino, producción y fecha de vendimia. Nos hemos quedado con 6 variedades tintas y 4 blancas, y falta por incluir la selección final de los cinco cruces dobles.



La fase 3 tiene dos pasos. El primero consiste en la inscripción de las nuevas variedades en el registro de variedades comerciales, tiene una duración de cinco años. Las condiciones de entrega de este material están recogidas en la página web del MAPA (https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/rvc-especiesfechascantidadescondicionesycentrosdeensayoactualizado-6marzo2023_tcm30-645146.pdf). A finales del año 2017, se entregó a la Oficina Nacional de Variedades Vegetales, los injertos de un año con los cruces que se decidieron registrar. Dado que el proceso de registro dura cinco años, esta primera selección se realizó con los cruces de la fase 2 plantados en 2003, 2008, 2010 y 2012. Los cruces elegidos, ordenados por fecha de vendimia, fueron Calblanque (MC180), Myrtia (MS10), Gebas (MC98) y Calnegre (MC80). En marzo de 2022 se reconocieron como nuevas variedades comerciales, orden APA/228/2022 BOE 25/03/2022, (<https://www.boe.es/boe/dias/2022/03/25/pdfs/BOE-A-2022-4799.pdf>), Así mismo, el 04/04/2022, la CVPO (Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales), concedió la protección comunitaria (<https://online.plantvarieties.eu/publicSearch?denomination=myrtia>).

En diciembre de 2018 comenzó el proceso para el registro de dos nuevas variedades tintas, Carmolí (MC4) y Quípar (MC18). La primera se caracteriza por madurar con 11,5 grados Bumé. En marzo de 2023, se reconocieron como nuevas variedades comerciales, orden APA Orden APA/228/2023, BOE 8 marzo de 2023 (<https://www.boe.es/boe/dias/2023/03/08/pdfs/BOE-A-2023-6179.pdf>) Y la CPVO concedió su protección comunitaria con fecha 03/04/2023. Si dividimos la vendimia en cuatro épocas, tenemos que Calblanque y Myrtia pertenecen a la primera, Carmolí y Quípar a la segunda, Gebas a la tercera y Calnegre a la cuarta, siendo la que más se aproxima a la fecha de vendimia de Monastrell.

El segundo paso de la fase 3, consiste en la elaboración de un informe de aptitud, conforme al anexo XX del Real Decreto 32/2023, de 24 de enero por el que se regula el potencial de producción vitícola (<https://www.boe.es/boe/dias/2023/01/25/pdfs/BOE-A-2023-2024.pdf>), consistente en un estudio consecutivo de cinco años de producción desde el comienzo del examen. Este informe de aptitud se eleva al MAPA y una vez que es aceptado, publica en el BOE el listado de las variedades autorizadas para producir vino en la Región de Murcia, en nuestro caso en el BOE de 1 de marzo de 2023 (<https://www.boe.es/boe/dias/2023/03/01/pdfs/BOE-A-2023-5370.pdf>). Han pasado más de 23 años y ya podemos tener vinos comerciales de las nuevas variedades, eso sí, sólo para la Región de Murcia.

Nunca fue nuestra prioridad el registro de nuevas variedades, pero si esta es la finalidad desde el principio, teniendo en cuenta que se necesitan tres años para que el viñedo entre en producción, necesitamos 6 años en la primera fase, otros 6 para la segunda fase, 5 años para el registro de variedades, que se pueden hacer coincidir con el periodo del examen de aptitud, y 1 año más hasta la aprobación por el MAPA. Hablamos de un periodo de tiempo mínimo de 18 años. Eso sí, sólo están autorizadas para la Región de Murcia. Hasta enero de este año, una vez autorizadas en una región de España, cualquier región podía solicitar su inclusión, pero el artículo 34 del Real Decreto 32/2023 ha cambiado y ahora es requisito demostrar que las condiciones agroclimáticas son similares. La inclusión de estas variedades en los pliegos de condiciones de las diferentes menciones de calidad, CRDOP, IGP, ya es otra historia.



2. Material y Métodos

El proceso de los cruzamientos se describe por Martínez Cutillas, A. (1) en el Libro de la Monastrell y por Ruiz-García, L. (2) En la Tabla 2 pueden verse los cruces plantados por tipo en las fases 1 y 2. Los parentales empleados en 2001 fueron Tempranillo, Syrah, Cabernet Sauvignon y Barbera. El año 2005 se añadió Verdejo y en todos los casos Monastrell actuó como madre, al presentar la floración más tardía. El año 2012 se procedió a la plantación de semillas que provenían de cruzamientos entre cruces preseleccionados en los años 2003 y 2008. De forma orientativa, en torno al 50% de los cruces no tiene producción, o es tan baja que no permite su análisis. Los cruces que tienen una calidad fenólica más alta fueron los obtenidos con Cabernet y Syrah. A destacar el buen comportamiento de un cruce blanco con Tempranillo y sobre todo con Verdejo, que representa la excepción que confirma la regla. Los cruces con Barberá presentan un buen comportamiento, pero nunca llegan al alcanzado por los cruces de Monastrell con Cabernet y Syrah, cosa que sí consiguen los cinco cruces dobles preseleccionados y estudiados en la fase 2, cuya selección final está por decidir.

Tabla 2. Tipo de cruce y año de plantación.

Año	Fase	MC	MS	MT	MB	MV	MC80 MS49	MC59 MS49	MC19 MS49	MS104 MC56
2001	F1	271	136	119	123					
2005	F1	201	134	9	206	392				
2012	F1						831	595	398	434
Selección	F2 Tintos	23	15	1	5		1	2		2
Selección	F2 Blancos	4	4	2		3				
Registrados	F3 Tintos	2	1							
Registrados	F3 Blancos	1								
En proceso		3	1	1	0	1				

El volumen muestras de uvas analizadas, fue cambiando, así como su metodología. Comenzamos analizando la composición fenólica total por el método Lamadón, F. (3) y la extractabilidad de los mismos por el método de Saint- Cricq, N. (4), que da información sobre la madurez de la pepita y de la pared celular. Luego pasamos al método Failla (5), donde la composición fenólica total de la piel y de la pepita se obtiene por separado. Este método se empleó a partir del año 2012 para los cruces preseleccionados de la fase 2. Para la preselección de los 100 cruces dobles, plantados en 2012, aplicamos un análisis directo al triturado de la uva, sin extracciones, analizando antocianos e índice de Folin, Fernández, J.I. (6). Actualmente estamos analizando la calidad de la uva por el método ITV standard (7), que emplea una hora de extracción.

En la Tabla 3 se muestra la cronología de las plantaciones correspondientes a las variedades registradas y aquellas que lo serán en un futuro. Se comenzó una colaboración con empresas de la Región interesadas en las nuevas variedades. Con todas ellas se han firmado convenios de cesión de material vegetal para la plantación de viñedos experimentales. Además de las variedades anteriores, en 2018 se realizaron plantaciones de un cruce tinto MS104, de dos cruces blancos, MC69 y MT103, al que hemos añadido este año un cruce blanco más, MV67.



Durante los años 2018 a 2021, se realizaron estudios de maduración, tendentes a buscar el momento óptimo de vendimia para cada variedad. En los estudios de maduración, la calidad general de la uva se analizaba en el triturado de la misma y la composición fenólica se analizaba por el método I.T.V. Estos estudios de maduración acabaron por confirmar que la variedad MS104 madura con un grado Baumé bajo. Por razones de espacio no se incluyen datos.

Tabla 3. Plantaciones de variedades en proceso de registro. Fase 3.

Año	Situación	Variedad	Cepas	Cepas / Ha
2018	IMIDA FINCA HACIENDA NUEVA CEHEGÍN.	Calblanque	80	3.333
2018		Calnegre	255	3.700
2018		Gebas	258	4.000
2018		Myrtia	256	3.333
2018		Quípar	254	3.333
2018		Carmolí	174	3.333
2018		Monantrell Clon188	126	3.333
2018		Mononastrell Clon 4	96	3.333
2018		MT103	88	3.200
2018		MC69	80	3.333
2018		MS104	80	3.333
2021		Mononastrell Peluda	257	4.000
2023		MV67	80	3.333
2018		FINCA TOLI	Myrtia, MC69	
2018	BODEGAS MONASTRELL	Myrtia, MC69		
2020	BODEGAS LUZON	Myrtia, Carmolí		
2020	BODEGAS EVINE	Myrtia		
2021	BODEGAS CARCHELO	Myrtia, Calblanque, Carmolí, MC69		
2021	BSI	Myrtia, Gebas, Carmolí, MT103		

Las elaboraciones siguen criterios técnicos, tendentes a potenciar el carácter varietal, frente a las técnicas de vinificación. La vendimia se realiza de forma manual a primera hora de la mañana. Se transporta desde la Finca Experimental Hacienda Nueva de Cehegín hasta la bodega Experimental de Jumilla y se conserva en cámara frigorífica a 8°C hasta su elaboración, que, para tintos, sigue las reglas clásicas de despalillado, estrujado y sulfitado. El hueco del depósito se inertiza y al día siguiente se realiza la analítica inicial del mosto, la adición del pie de cuba y la corrección de acidez. Hay un bazuqueo diario del depósito, mientras dura la fermentación alcohólica y se mantiene la maceración durante 14 días. Se mezcla el vino del presado con el de yema, y se hacen dos trasiegos consecutivos, a los dos días del prensado y a los dos días del primer trasiego, para evitar olores a sulfhídrico. Se añaden bacterias lácticas y se mantienen a 18°C hasta su finalización. Para vinos blancos, el sulfitado se divide. Se añade en el despalillado, estrujado, en el prensado y en el depósito de desfangado. El desfangado es estático, por frío y con enzimas pectolíticos. Al día siguiente se desfanga, se analiza y se añade el pie de cuba y la corrección de acidez. Según los datos de control de campo, si la acidez es baja, se puede realizar una primera corrección de acidez antes del desfangado. No hay un control estricto de la temperatura de fermentación, ya que se buscan aromas varietales. Una vez finalizada la fermentación alcohólica, se trasiega, se sulfita y se conserva en frío.



3. Resultados

Los criterios de selección en la fase 1 por calidad de uva se resumen en la Tabla 4. Comenzamos aplicando un criterio de aquellos cruces con valores medios superiores a la media de todos ellos. Esto se repite tantas veces como sea necesario para llegar al número de cruces que se pueden plantar. Se van añadiendo criterios en el proceso de selección, que hacen referencia al PH, tamaño del gano, que en este caso no tuvo ninguna incidencia, producción, nivel de maduración óptima y fecha en que se alcanza. En la última selección de la fase 1 realizamos catas de uvas, ya que el volumen de muestras lo permitió, y fue un criterio importante, sobre todo en cruces blancos. Su cata nos permitió seleccionar cruces con aromas especiados muy frescos, que recuerdan a la familia de la hierbabuena.

Tabla 4. Criterios de selección Fase 1

Método	Compuestos Fenólicos	Antocianos
Lamadon	6,6 g/Kg uva	0,9 g/Kg uva
Extractabilidad	60 IPT Extraíbles	1000 mg/L Antocianos Totales
Oswaldo	2800 mg/Kg uva	2400 mg/Kg de uva
Triturado Directo	2300 mg/L	350 mg/L

En la fase 2, los criterios empleados fueron por calidad de vino, teniendo en cuenta como principal criterio de calidad la concentración del mismo, el índice de polifenoles totales y la intensidad de color. La cata pasó a un segundo lugar, debido a la dificultad de poder vendimiar todos los cruces en su momento óptimo de vendimia. Clasificamos los cruces en cuatro épocas de vendimia, separadas cada una de ellas por una semana y elegimos un cruce para cada una de estas épocas. Las variedades Myrtia, Calnegre, Quípar y Gebas tienen una composición fenólica muy superior a Monastrell. Carmolí, que es una variedad que madura con 11,5 grados Baumé, tiene una composición fenólica similar a las variedades. Sin embargo MS104, que también madura con un grado Baumé bajo, tiene una mayor intensidad de color y un buen nivel de polifenoles totales. En la Tabla 5, se muestran los valores medios correspondientes a la composición del vino y uva, de los años 2017 a 2022, incluido el año 2019, donde se forzó una vendimia anticipada y los datos de composición se vieron afectados.

Tabla 5. Valores medios 2.017 a 2.022 de las variedades seleccionadas. Fase 2

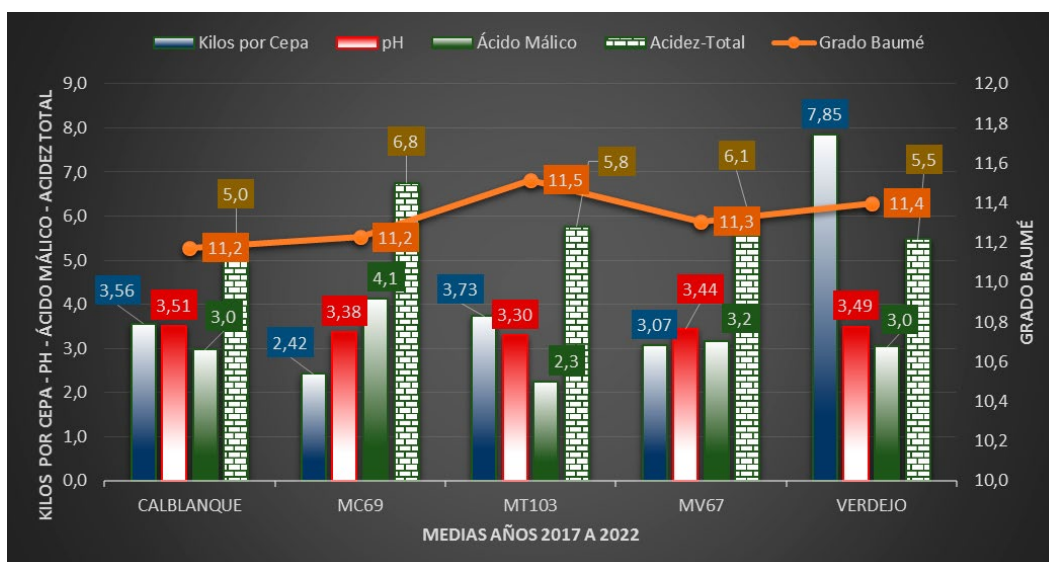
Variedad	I.P.T.	Int. Color	Kilos Cepa	Antoc mg/Kg uva	C.F.T.-piel	Baumé	pH	Acidez Total	Ácido Tartárico	Ácido Málico	Diferencia Monastrell
Myrita	99,6	60,5	2,07	3.723	3.175	13,55	3,63	4,3	4,7	2,3	-33
Calnegre	100,2	46,8	1,68	2.925	3.122	12,86	3,65	3,5	4,7	1,2	-15
Quípar	86,7	44,1	2,42	2.358	2.770	13,67	3,54	4,3	5,3	1,6	-30
Gebas	90,4	39,8	2,46	2.806	2.728	13,19	3,93	3,2	3,8	2,4	-19
MS104	65,6	34,2	3,02	2.340	2.662	11,24	3,74	3,5	4,1	2,0	-30
Carmolí	47,4	20,1	2,40	1.911	1.925	11,77	3,67	3,4	4,5	1,4	-16
Monastrell	43,0	14,0	3,63	1.014	1.400	13,52	3,97	2,8	4,1	1,4	0



Los datos de grado Baumé, acidez total, pH, ácido tartárico y ácido málico corresponden a la analítica del depósito al día siguiente al encubado. La acidez total se expresa en g/L de ácido tartárico y la última columna da el valor medio de los días de diferencia entre la vendimia de Monastrell y las nuevas variedades. La variedad más temprana es Myrtia, que se vendimia un mes antes que Monastrell. Le siguen Quipar, Gebas y Calnegre. La variedad que peor comportamiento presenta en valor de pH es Gebas, muy similar a Monastrell. El mejor comportamiento es de Quípar, con un valor medio de 3,59.

En cuanto a las variedades blancas, en el Gráfico 1 se muestran los valores medios de producción en kilos por cepa y de composición del mosto después del desfangado. Todas las variedades destacan por un buen comportamiento agronómico y una buena composición ácida. La primera variedad que se vendimia es Verdejo, que marca el inicio de la vendimia en nuestra parcela experimental. La última es Calblanque, una semana después. La diferencia con monastrell ronda los 35 días.

Gráfico 1. Valores medios de calidad, variedades blancas. Cosechas 2017 a 2022.



4. Conclusiones

Los principales resultados obtenidos durante estos años se plasman en la tesis doctoral, Moreno, J.D. (8), donde se detallan todos los procesos, criterios empleados y características de las nuevas variedades. En otra tesis doctoral, Fernández, D.J. (9) se realizan estudios sobre la adaptación a sequía de diferentes cruzamientos, destacando el comportamiento de Calnegre, junto con el cruce MS104, que no ha sido objeto de registro. La descripción de las variedades registradas ha sido objeto de diversas publicaciones.

Las nuevas variedades también se han descrito en otras reuniones como la del SECH celebrada en Pamplona en octubre de 2022 (10) y en el congreso de la OIV celebrado en Ensenada Baja California (México), noviembre 2022 (11) y en publicaciones asociadas al congreso (12).



Todas ellas suponen una herramienta útil para completar las características de los vinos de la zona, están bien adaptadas al calor y su comportamiento en espaldera es superior en calidad al que demuestra Monastrell, aunque su producción es menor.

5. Bibliografía

1. MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; RUIZ-GARCÍA, L.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I. 2018. **Material vegetal de Monastrell**. pp 45-70. En: **El Libro de la Monastrell**. CARM. MU 1340-2018. ISBN: 978-84-09-06249-0 ([https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=18478&IDTIPO=246&RASTRO=c2889\\$m58245,58256,58865](https://www.carm.es/web/pagina?IDCONTENIDO=18478&IDTIPO=246&RASTRO=c2889$m58245,58256,58865))
2. RUIZ-GARCÍA, L.; GIL-MUÑOZ, R.; MARTÍNEZ-MORA, C.; BLEDA J.A.; FUENTES-DENIA, A.; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, J.A.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I. 2018. **Nuevas variedades de vid obtenidas en la Región de Murcia**. Actas de Horticultura 80 (ISBN: 978-84-09-03766-7): 226-229.
3. LAMADON, F., 1995. **Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphénolique des raisins**. Rev Fr Oenol76: 37-42.
4. SAINT-CRISQ N.; VIVAS N.; GLORIES Y. 1998. **Maturité phénolique: définition et contrôle**. Rev Fr Oenol 173: 22-25
5. COST Action FA1003 final publication. 2015, VITIS 54, Special Issue. <https://ojs.openagrar.de/index.php/VITIS/issue/view/1069>
FAILLA. 2012. **Phenotyping trial 2012. Protocols for phenotyping berry enological traits**. <http://www.diprove.unimi.it/GRAPENET/protocols.php>
RUSTIONI, L. y cols. (2014) **First results of the European grapevine collections collaborative network: validation of a standard eno-carpological phenotyping method**. Vitis 53 (4), 219–226.
6. FERNÁNDEZ, J.I. Y COL. 2014. **Criterio de selección de cruces de Monastrell basados en análisis rápidos**. 29ª Reunión anual del grupo del grupo de trabajo de experimentación en viticultura y enología. Mayo de 2014. Logroño. ISBN 978-84-491-0022-2 MAPA.
7. CAYLA L., COTTEREAU Ph., RENARD R. 2002. **Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard**. Rev. Fr. OEnol. 193, 10-16
8. MORENO OLIVARES, J.D, 2022. **Selección de Cruzamientos Dirigidos de Monastrell para una Adaptación al Cambio Climático**. Tesis doctoral. <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/125683>
9. FERNÁNDEZ LÓPEZ, D.J. 2022. **Estudio de tolerancia a la sequía de nuevas variedades de uva de vinificación obtenidas a partir de 'monastrell' en la Región de Murcia**. <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/126214>
10. FERNÁNDEZ JI, RUIZ-GARCÍA Y COL 2022. **Calblanque, Calnegre, Gebas y Myrtia: nuevas variedades obtenidas y registradas en el IMIDA adaptadas al clima cálido de la Región de Murcia**. ACTAS DE HORTICULTURA Nº 91. Comunicaciones Técnicas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. IV Jornadas del Grupo de Viticultura de la SECH. 26-28 octubre 2022. Pamplona. 113-117. ISBN 978-84-09-38456-3
11. ROCIO GIL-MUÑOZ Y COL 2022. **New varieties descending from monastrell adapted to climate change**. 43RD WORLD CONGRESS OF VINE AND WINE, 31 OCT - 4 NOV, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO
12. DANIEL MORENO-OLIVARES Y COL. 2022. **Nuevas variedades descendientes de monastrell adaptadas al cambio climático**. 43rd World Congress of Vine and Wine. BIO Web of Conferences 56, 01036 (2023). <https://doi.org/10.1051/bioconf/20235601036>.



6. Agradecimientos

El trabajo ha sido financiado al 80% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y al 20% por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM), con los proyectos PO07-037, FEDER 1420-04 y FEDER1420-29.

ONECA, una variedad blanca antigua recuperada en Navarra, caracterización preliminar

Félix Cibriain Sabalza, Ana Sagüés Sarasa, Alfredo Rueda Díez, Izaskun Oria Ostiz
y Karmele Jimeno Mendoza

*Sección de Viticultura y Enología-EVENA, Departamento de Desarrollo Rural y Medio Ambiente,
Gobierno de Navarra. C/Valle de Orba 34, 31390 Olite – Erriberri, Navarra, Tfno.: 848433601,
vitienu@navarra.es*



Figura nº1.- Variedad Oneca

Resumen

En 2008, en el transcurso de una prospección de material vegetal en viñedo navarro en busca de Garnacha blanca, es localizada en Bargota (Navarra) una cepa cuyos análisis genéticos posteriores determinaron que no nos encontrábamos ante dicha variedad, sino que se trataba de otra desconocida (Maul et al., 2023) sin registrar en el banco de germoplasma de referencia. Tras años de estudio y evaluación, se decidió darle de alta en el RVC y bautizarla con el nombre de *Oneca*. En este trabajo se presenta una caracterización preliminar agronómica y enológica, así como una descripción de la variedad que se viene haciendo estos últimos años en la parcela de conservación de material vegetal que Gobierno de Navarra tiene en Olite.

Los resultados obtenidos indican que estamos ante una variedad única al borde de la extinción que se ha conseguido recuperar para el presente, y que presenta cualidades prometedoras tanto productivas como enológicas y podrían enriquecer y complementar el abanico varietal de nuestros viñedos.



1. Introducción

Actualmente, una de las grandes preocupaciones a escala mundial en el ámbito vitivinícola, es la fuerte disminución del número de variedades de vid cultivadas y la desaparición de otras muy antiguas (Muñoz-Organero et al, 2017). La pérdida de diversidad genética ha ido aumentando desde el siglo XIX. Son muchos los proyectos a nivel estatal que se han llevado a cabo y todavía están en marcha cuyo objetivo es la preservación y recuperación de material vitícola minoritario.

La Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA), actualmente la Sección de Viticultura y Enología de Gobierno de Navarra, lleva trabajando desde 1988 en la recuperación de cepas de viñedo antiguo de Navarra. Como resultado, y hasta 2021, ha llevado a cabo 284 entradas de material recopilados que se guardan en su sede de Olite (Cibriain et al., 2021).

En este contexto, y de forma paralela, se inició en 2008 un proyecto basado en localizar y recopilar material vegetal de Garnacha blanca existente en viñas de cierta edad de Garnacha tinta, con la finalidad de conservar la diversidad genética y realizar una selección clonal de la variedad para poner a disposición del sector material certificado, debido a la baja disponibilidad de éste. (Rodríguez-Lorenzo et al., 2019).

Ese mismo año, en el transcurso de dicho trabajo de recopilación de garnachas blancas, se marcan varias cepas en una viña de más de 70 años sita en el paraje de *Valdeclarin* del municipio navarro de Bargota. La viña, propiedad del agricultor navarro Hipólito García Vicente, se sitúa a una altitud de 555 metros y se cultiva en secano con conducción en vaso. La coloración blanca de las bayas y el hecho de que un gran porcentaje de las cepas existentes en la viña lo fueran de Garnacha Tinta, propició que en un primer momento el viticultor confundiese este cepaje con el varietal Garnacha Blanca, por lo que, como tal, se introdujo en el conservatorio de cepas de EVENA con el código GB07.



Figura nº2.- Cepa original seleccionada



Figura nº3.- Detalle del racimo cepa original



Desde 1940 se venía cultivando esta viña desconociendo que entre sus cepas de Garnacha existía una rareza vitícola que por suerte se pudo recoger antes de su arranque en el año 2010.

En 2009, con objeto de confirmar la identidad varietal, se realizó un análisis molecular en el Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) para su identificación mediante la extracción de ADN y el uso de marcadores de microsatélites (SSR). La variedad fue catalogada como “NO IDENTIFICADA” porque no existía constancia de su genotipo en el banco de germoplasma de referencia ubicado en El Encín (Madrid). El resultado de este análisis, certificó, que no se trataba de Garnacha Blanca, sino de una variedad desconocida a la cual se le adjudicó el nombre fantasía “**ZocaZarra 01**”- **T18**, posteriormente **Oneca**.

Más tarde, en 2016-2017, en el marco del Proyecto INIA RF2012-00027-C5-02 “*Documentación, caracterización y racionalización del germoplasma de vid prospectado y conservado en España. Creación de una colección nuclear*”, se analizó de nuevo el ADN de la variedad en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) de Logroño, mediante marcadores SNP, el cual confirmó la singularidad genotípica del varietal y los análisis de parentesco realizados en este proyecto, constataron que “ZocaZarra 01”- (T18) era portadora del clorotipo A y progenitora de otras dos variedades encontradas en Aragón, hoy denominadas **Gavina** y **Olivana**:

- Gavina (Código 4128) = Castellana Blanca x **Oneca**
- Olivana (Código 4129) = Hebén x **Oneca**

El hecho de que Oneca sea progenitora de dos variedades desconocidas de Aragón indica un vínculo histórico estrecho entre las comarcas vecinas que conforman el Alto Ebro. Además, tanto Hebén como Castellana Blanca son dos variedades que aparecen recurrentemente como progenitoras de muchas de las variedades ibéricas que se cultivan en la actualidad, lo que nos permite plantear la hipótesis de que pudiera ser, cuando menos, tan antigua como ellas, y que se cultivaba en los mismos viñedos. En el trabajo realizado por el “Group of Genomics of Fruit Trees and Grapevine” de la Estación Experimental de Aula Dei – CSIC también se logró establecer la relación de parentesco entre Oneca y la variedad aragonesa Olivana. (Hiba Ghrissi et al., 2022)

En 2018, plantas con idéntico perfil genético al de Oneca fueron localizadas en la población de Barbenuta (Huesca), donde la viticultura prácticamente desapareció a principios del siglo XX. La circunstancia de que esta variedad haya sido localizada en dos ubicaciones geográficas distantes entre sí en más de 200 kilómetros, refuerza la hipótesis de que Oneca no es una variedad exclusivamente local que surge de una posible germinación espontánea, sino que en su día tuvo cierta difusión.

El material vegetal se envió en enero de 2014 al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario para su análisis serológico y biológico mediante las técnicas de Indexage Biológico, ELISA y PCR. Los resultados obtenidos para los virus oficialmente reglamentados - virus de entrenado corto, enrollado I y III y mosaico del Arabis (GFLV, GLRVI, GLRVIII y ArMV) - fueron negativos. De modo sistemático, siguiendo los planes de control reglamentarios establecidos, en los años 2008, 2010, 2015, 2018, 2020 y 2022, se realizaron mediante la técnica ELISA análisis serológicos correspondientes a los mismos virus en el



Laboratorio de Biología Vegetal del Departamento de Desarrollo Rural y Medio Ambiente del Gobierno de Navarra dando igualmente resultados negativos en los virus oficiales.

La variedad se ha conservado en las fincas experimentales de la Sección de Viticultura y Enología del Gobierno de Navarra como material parental en 3 contenedores (1 por cepa), en 6 cepas en la finca *Extremal* y en 30 cepas por referencia con 3 repeticiones en la finca *Baretón*, ambas situadas en Olite.

En noviembre de 2017, esta vinífera inició su evaluación en el IMIDA de Murcia, centro nacional de referencia para la certificación clonal sanitaria de la vid (mediante convenio MAPA), imprescindible para el registro de la variedad en el RVC (Registro de Variedades Comerciales). Se realizó la instancia de solicitud para su inscripción en el RVC, haciéndose efectiva la entrada de dicha solicitud el día 27 de diciembre de 2017. Cuatro años y tres meses después, el 25 de marzo de 2022, apareció publicado su registro en el BOE como ZZ1, por lo que, tras dar aviso de que el nombre definitivo es *Oneca*, se publicó en el BOE del 27 de junio de 2022 la orden APA/588/2022 donde pasó a denominarse *Oneca*. En la actualidad se halla en proceso de autorización en la Comunidad Foral de Navarra.

El objetivo de este trabajo es la caracterización preliminar a nivel fenológico, productivo y enológico de esta variedad blanca recuperada.

¿Por qué el nombre de *Oneca*?

Oneca se emplea como nombre propio femenino en la zona media y oriental de la Comunidad Foral de Navarra, y “*Onecca*” se cita como la madre de Iñigo Arista, considerado el primer rey de Pamplona, embrión y génesis del posterior Reino de Navarra.

En definitiva, **Oneca** se trata de un nombre de género femenino que evoca al pasado, con raíces que se entroncan en la historia de nuestra tierra y dota de originalidad nominativa a una variedad de uva blanca que sin duda resulta singular.

2. Material y métodos

2.1. Caracterización fenológica

Se ha llevado a cabo el seguimiento de los estados fenológicos de la variedad durante las campañas 2016 a 2022 sobre 6 cepas de *Oneca* establecidas en la finca *Extremal* (42° 26' 17,00" N; 1° 38' 53" O) en Olite, donde se encuentra el conservatorio de variedades. Cada año, semanalmente, durante el periodo vegetativo, se anotó el porcentaje de yemas/racimos que se encontraba en los dos estados principales según Baggiolini. (Baggiolini, M. 1952.)

Para una mejor caracterización de la variedad, se ha comparado su fenología con la variedad Garnacha Tinta en los estados fenológicos principales: brotación (inicio estado C, punta verde), floración (inicio estado I), envero (inicio estado M) y vendimia (fecha de vendimia).



Figuras nº 4 y 5 - Estado fenológico racimos visibles y tamaño garbanzo

2.2. Caracterización agronómica

La caracterización agronómica de la variedad Oneca se ha realizado en la parcela *Baretón* (42° 25' 28,43" N; 1° 39' 44" O) en la cual se cuenta con 3 repeticiones de 5 cepas sobre dos portainjertos (110R y SO4), habiendo un total de 30 cepas. Se plantó sobre 110R en el año 2013 y sobre SO4 en el año 2014 a un marco de 2,60 por 1,30 m. La parcela está conducida en espaldera con un sistema de formación en cordón doble Royat, con seis pulgares desferracinados a dos brotes bien conformados. Se comenzaron a realizar controles en el año 2018.

Para determinar el momento de la vendimia, se empleó el Índice de Maduración de Cillis y Odifredi que puede alcanzar valores en la maduración industrial comprendidos en el intervalo de 2.5 a 5 y cuya fórmula se expone a continuación:

$$\text{IM: } \frac{\text{Azúcar en gr/100 ml de mosto}}{\text{Acidez total gr/l de mosto (ácido tartárico)}}$$

En nuestro caso, se ha utilizado con unas ligeras modificaciones en su cálculo para trabajar con resultados en números enteros. Se estiman necesarios 1.7 g de azúcar para obtener un grado de alcohol, por lo que, habiendo medido el contenido en azúcar en % vol. a 20 °C, será necesario multiplicar el valor del Grado Probable (%vol) por 1,7 para obtener el contenido de azúcar en g/l de mosto, por 17 para estimarlo en g/100 ml. En base a éste índice modificado se han tomado como valores adecuados los situados entre 30- 50 para los vinos blancos.

En el momento de la vendimia, se controló el número de racimos por cepa, la producción (kg uva /cepa) y el peso medio del racimo (g). Adicionalmente, se tomó del conjunto de las cepas una muestra representativa de bayas, a partir de las cuáles se obtuvo el peso de 100 bayas y los parámetros básicos de maduración: grado alcohólico probable, pH, acidez total tartárica y ácido málico.

Se ha calculado la media como estadístico de tendencia central y la desviación estándar como estadístico de dispersión para los datos básicos de producción peso de racimo y producción en kg por metro cuadrado en cada año. Los valores de producción obtenidos se han comparado entre años mediante análisis de varianza (ANOVA) y se han determinado grupos



homogéneos a partir del análisis post hoc de Tukey-b. El conjunto de los análisis se ha realizado mediante IBM SPSS Statistics v. 25 y se ha considerado un nivel de significación $\alpha=0,05$.



Figura nº 6.- Cepas de Oneca en la finca Baretón. Formación en espaldera

Por otro lado, durante los años 2021 y 2022, en el momento de la poda, se controló de manera individual el peso de la madera de poda por cepa, considerando 3 repeticiones y obteniendo los valores medios de peso por cepa e índice de Ravaz, determinado éste como la relación entre la producción y el peso de poda (kg).

2.3. Caracterización enológica y organoléptica

De manera paralela a los controles agronómicos en campo, anualmente se ha venido vinificando desde la campaña 2018 a la 2022 vino de Oneca. La elaboración del vino se realiza siguiendo el protocolo de elaboración de vino blanco experimental de la Sección de Viticultura y Enología (EVENA) consistente en un prensado sin despalillado, desfangado con enzimas pectolíticas a baja temperatura y fermentación alcohólica a unos 18°C con siembra de una levadura LSA neutra para permitir que la variedad se exprese.

Los parámetros analizados del vino fueron: grado alcohólico (% vol.); acidez total, (g/l tartárico); pH; acidez volátil, (g/l ácido acético); ácido L-málico, (g/l), glucosa-fructosa, (g/l), contenido en sulfuroso libre y total, (mg/l), contenido mineral (calcio, potasio, magnesio, todas en mg/l) y los parámetros de color (DO 320 nm, DO 420 nm, IPTs, en Abs/cm) todos ellos en el Laboratorio Enológico del Gobierno de Navarra.

Los análisis sensoriales se realizaron en la sala de catas de EVENA por un panel formado por una media de 7 técnicas/os. Se empleó la ficha de cata de la OIV (Organización Internacional del Vino), que establece una puntuación máxima de 100 puntos, dividiendo la cata en fase visual (15 puntos máximo), olfativa (30 puntos máximo), en boca (44 puntos máximo) e impresión general (11 puntos máximo). El año 2022 se realizó una cata descriptiva empleando una ficha adaptada de la norma ISO 11035.



Las puntuaciones totales obtenidas en cata se han comparado entre años mediante análisis de varianza (ANOVA) y se han determinado grupos homogéneos a partir del análisis post hoc de Tukey-b. Para identificar de manera gráfica las relaciones entre los vinos elaborados cada año respecto a las fases de cata y la impresión general, se han realizado análisis de componentes principales (ACP) para el conjunto de todos años y con los resultados de la cata descriptiva. El conjunto de los análisis se realizó mediante IBM SPSS Statistics v. 25 y XLSTAT Trial 2023 y se ha considerado un nivel de significación $\alpha=0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterización fenológica

Se ha observado, como aspecto diferenciador en brotación, un retraso significativo (aproximadamente 12 días) respecto a la variedad de referencia Garnacha Tinta cultivada en la misma parcela y con idéntico manejo agronómico. Respecto al cierre de racimo e inicio de envero, Oneca y Garnacha Tinta lo hacen simultáneamente.

Respecto a la madurez técnica entendida como el equilibrio adecuado entre grado probable y acidez titulable, Oneca demuestra al menos 15-20 días más precocidad que Garnacha Tinta.

Tabla 1.- Fenología de Oneca en relación a Garnacha Tinta. Se resaltan los momentos de brotación y vendimia.

Variedad	Marzo		Abril				Agosto			Septiembre			Octubre	
	16-23 día	24-31 día	1-8 día	9-15 días	16-23 día	24-30 día	1-10 día	11-20 día	21-31 día	1-10 día	11-20 día	21-30 día	1-10 día	11-20 día
Garnacha Tinta														
Oneca														
	BROTACIÓN						VENDIMIA							

3.2. Caracterización de la producción

La fecha media de vendimia es el 16 de septiembre, observándose cierta variabilidad de producción entre años.

Tabla 2.- Datos de Peso Racimo, producción y peso 100 bayas de la variedad Oneca en la finca de Baretón

Año	Fecha	Media Peso racimo (g)	DesvEst Peso racimo (g)	Media Producción anual (kg/m ²)	DesvEst Producción (kg/m ²)	Peso 100 bayas (g)
Año 2018	12/09/2018	262,5	54,5	0,94	0,27	256
Año 2019	25/09/2019	197,9	17,3	0,72	0,11	200
Año 2020	24/09/2020	347,1	108,1	1,88	0,55	183
Año 2021	20/09/2021	209,6	9,6	0,97	0,09	244
Año 2022	08/09/2022	230,5	3,0	1,03	0,05	216



La producción media del conjunto de los años en esta parcela se sitúa en 1,11 kg/m². El valor de 2020, es decir, 1,88 kg/m² (casi un 70% por encima de la media), el único no homogéneo según el análisis estadístico realizado, parece deberse a la elevada pluviometría que aconteció durante la primavera, lo que se tradujo en un incremento notable en la producción (Figura 7).

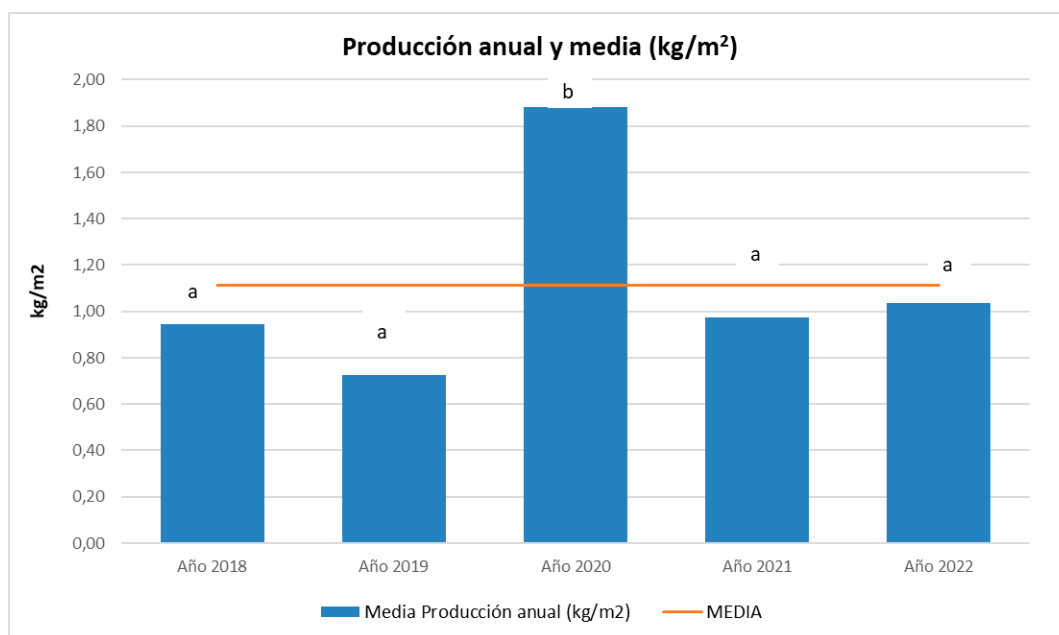


Figura 7.- Producción anual (kg/m²) y media

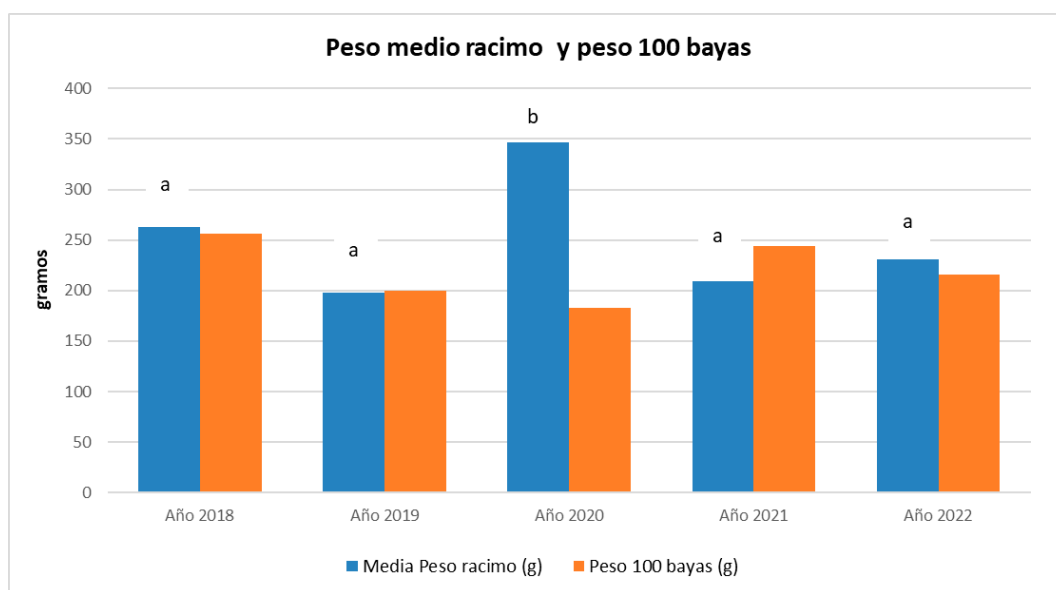


Figura 8.- Peso medio del racimo y peso de 100 bayas de Oneca durante los años de estudio en la finca de Baretón.



El peso de 100 bayas es el parámetro más estable, con una variación máxima respecto de la media (220 g) de un 17%. El mayor peso de racimo en 2020, puede ser debido a las condiciones del año comentadas anteriormente que se tradujo en un mayor tamaño de racimos (Figura 8).

En ambos parámetros productivos se observan diferencias significativas entre años. Los años 2018, 2019, 2021 y 2022 presentan medias similares, siendo el año 2020 el que se diferencia, presentando valores medios superiores.

Estos resultados indican que, en general, se trata de una variedad con una producción estable en el tiempo, si bien en ciertos años se puede observar cierta variabilidad de la producción, relacionado con las condiciones climáticas particulares de cada campaña (como las altas precipitaciones en la primavera del año 2020).

En lo que respecta a los parámetros básicos medios del mosto, Oneca en los años de estudio en la finca Baretón presentó un grado alcohólico probable de 14,03% vol.; un pH de 3,46, oscilando entre 3,27 y un máximo de 3,55 y una acidez total en tartárico media de 4,7 g/l.

Tabla 3. Parámetros básicos de maduración y uvas de Oneca durante los años de estudio en la finca de Baretón. GAP, grado alcohólico probable; ATT, acidez total en tartárico; I.M., Índice de madurez.

Año	Fecha	GAP (% vol)	pH	ATT (g/l)	Ácido málico (g/l)	I.M.
Año 2018	12/09/2018	13,52	3,44	4,5	1,4	51
Año 2019	25/09/2019	14,13	3,27	5,5	1,5	44
Año 2020	24/09/2020	14,41	3,55	4,2	1,0	58
Año 2021	20/09/2021	14,47	3,48	5,3	1,3	47
Año 2022	08/09/2022	13,77	3,55	4,0	0,9	59
MEDIA	16-sep	14,06	3,46	4,7	1,2	51,7

Si observamos la Tabla 3, vemos cómo el índice de maduración supera el valor 50 en 3 de los 5 años de estudio, la necesidad de haber vendimiado con antelación, para conseguir de esa manera, unos parámetros más representativos del punto óptimo de la variedad.



Figura 9. Racimo de Oneca durante los controles de vendimia.

El peso medio de control de la madera de poda se sitúa en 1073 g, con un índice de Ravaz medio de 3,24. Estos valores se situarían ligeramente por debajo de los valores establecidos como óptimos por García- Escudero para la variedad Tempranillo (García- Escudero, et al., 1991) que considera el rango 4-7 como adecuados.

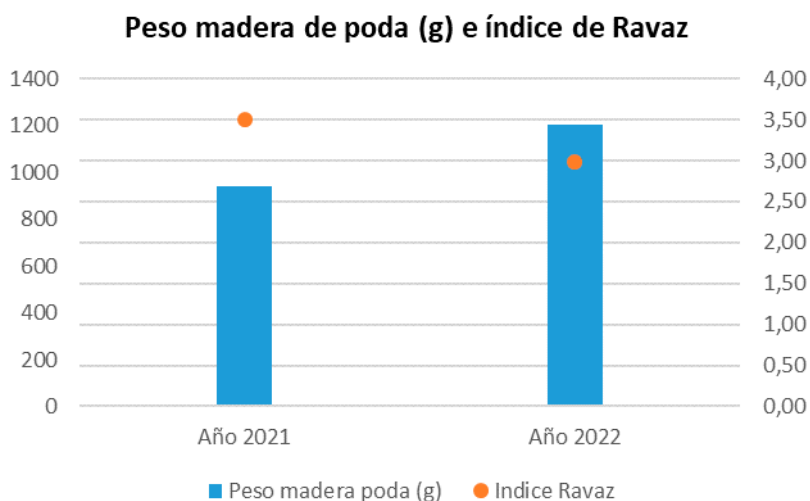


Figura 10. Peso de madera de poda e índice de Ravaz de Oneca durante los años de estudio en la finca de Baretón.



3.3. Caracterización enológica y organoléptica

Los parámetros analíticos medios de los vinos de Oneca durante la serie de años ensayada dan como resultado un vino con una graduación de 14,4% vol., una acidez total de 5,5 g/l, pH de 3,2 y un contenido en ácido málico de 1 g/l como parámetros más destacados. Asimismo, tiene una cantidad de IPT de 5 (Tabla nº 4).

Tabla nº 4. Parámetros analíticos del vino elaborado de Oneca durante los años de estudio.

Año	Grado alcohólico %vol	Acidez total g/l tartárico	pH	Acidez volátil g/l ac.acético	Glu+Fru g/l	Ácido L-málico g/l	DO 320 nm Abs/cm	DO 420 nm Abs/cm	IPTs Abs/cm	Calcio mg/l	Potasio mg/l	Magnesio mg/l
2018	13,36	5,70	3,19	0,50	1,4	1,2	1,289	0,034	3	58	261	53
2019	15,14	6,30	3,17	0,60	1,1	1,2	3,643	0,048	5	40	370	83
2020	14,50	4,60	3,28	0,27	3,3	0,7	4,240	0,061	6	47	437	62
2021	14,60	5,30	3,24	0,40	0,5	1,0	2,935	0,048	5	52	501	57
2022	14,57	5,57	3,30	0,36	<0,3	1,0	0,399	0,056	<25	42	483	76
MEDIA	14,43	5,5	3,24	0,43	1,6	1,0	2,501	0,049	5	48	410	66

En las evaluaciones organolépticas mediante la ficha de la OIV, si bien se observan diferencias significativas en la puntuación total entre años, todos los años el vino joven se catalogó dentro del intervalo “Bueno - Muy bueno” y la puntuación ha ido incrementándose en los últimos tres años, paralelamente a un mayor volumen de litros elaborados, llegando hasta 86 puntos totales 2021, con un 10 sobre 11 en impresión general y manteniéndose estable con valores homogéneos según el análisis “post hoc” (Figura 11).

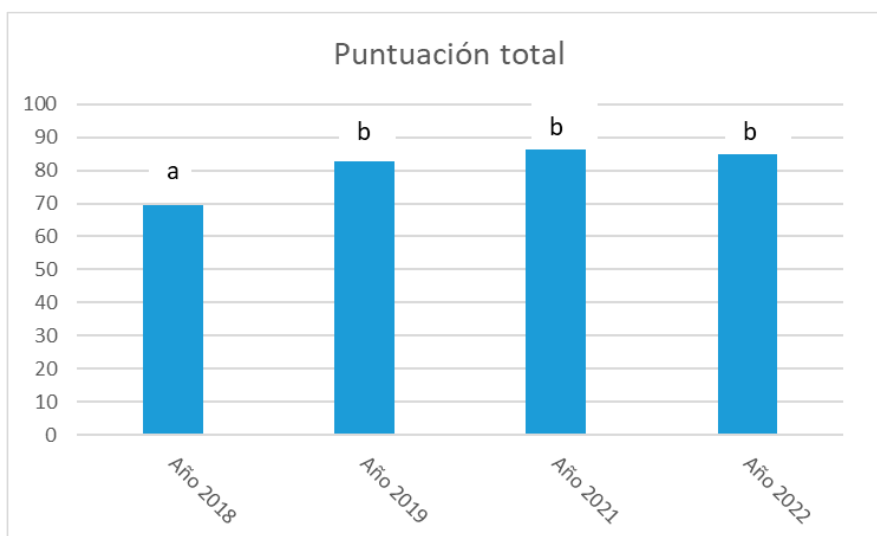


Figura 11.- Evolución puntuaciones de Oneca en la serie de años evaluada



En la cata descriptiva realizada en 2022 el vino de Oneca fue catalogado como un vino de color amarillo pajizo con ribete verdoso, limpio, brillante. En fase olfativa destacó su intensidad aromática elevada y compleja, con aromas a fruta blanca, cítricos y notas florales (Figura 12). En boca se percibió equilibrado, con estructura y persistente (Figura 13).

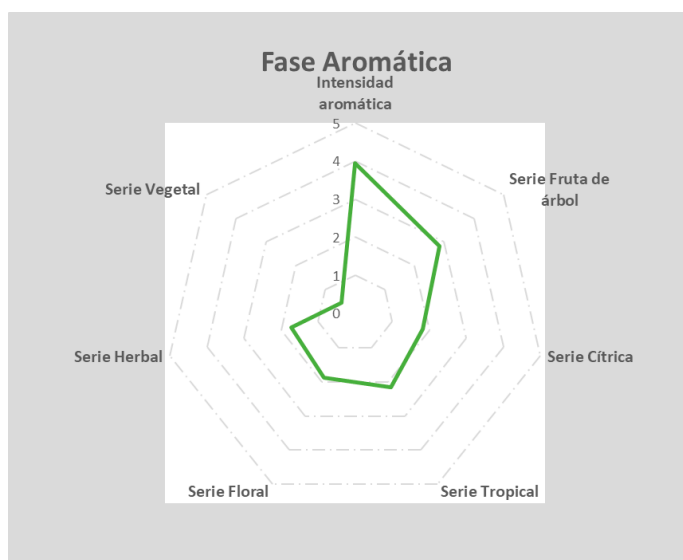


Figura 12. Fase aromática. Prueba descriptiva Oneca

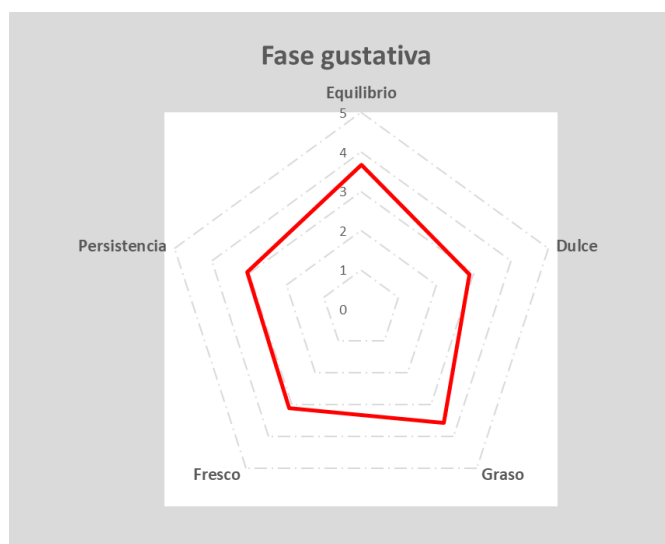


Figura 13. Fase gustativa. Prueba descriptiva Oneca

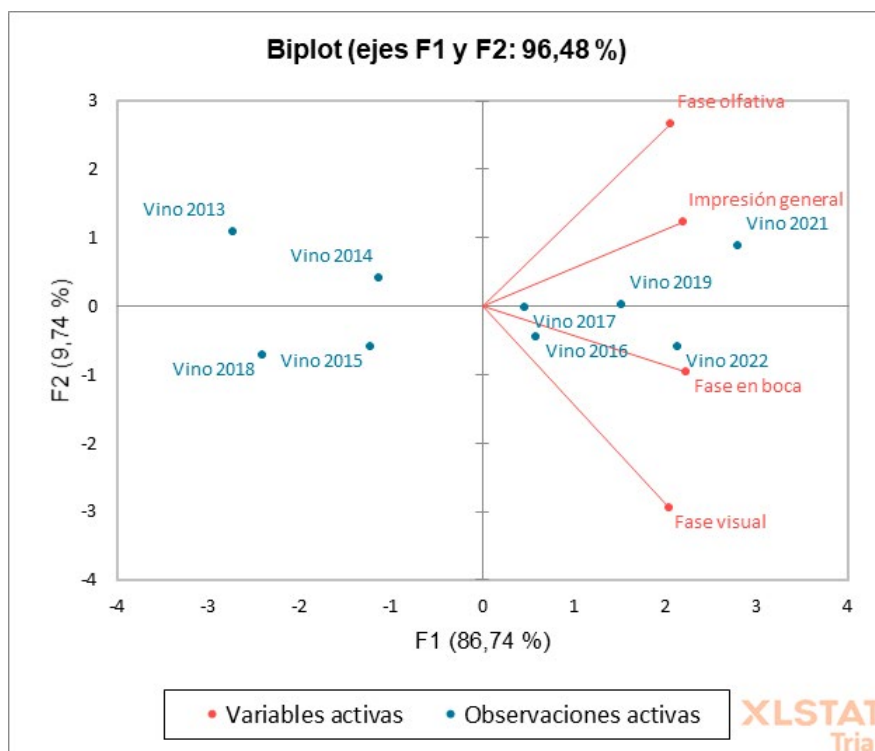


Figura 14. A.C.P. Cata descriptiva vinos ONECA Olite, cosechas 2013 – 2021 y valoración fases sensoriales globales

Las diferencias detectadas en el análisis post hoc se reflejan también en el análisis de componentes principales (ACP) de las diferentes añadas y las fases sensoriales globales, en la cual los dos ejes explican el 96,48% de la variabilidad y donde los vinos elaborados los últimos años obtienen mayor puntuación en las diferentes fases. Ello puede ser debido a una optimización en el proceso de elaboración conforme se ha ido obteniendo un mayor volumen de uva y un mayor conocimiento del comportamiento de la variedad. También muestra que se trata de vinos equilibrados, en los que, a lo largo de los años, las puntuaciones en las diferentes fases se mantienen proporcionales respecto de la puntuación total, siendo la fase olfativa la que presenta mayores puntuaciones.

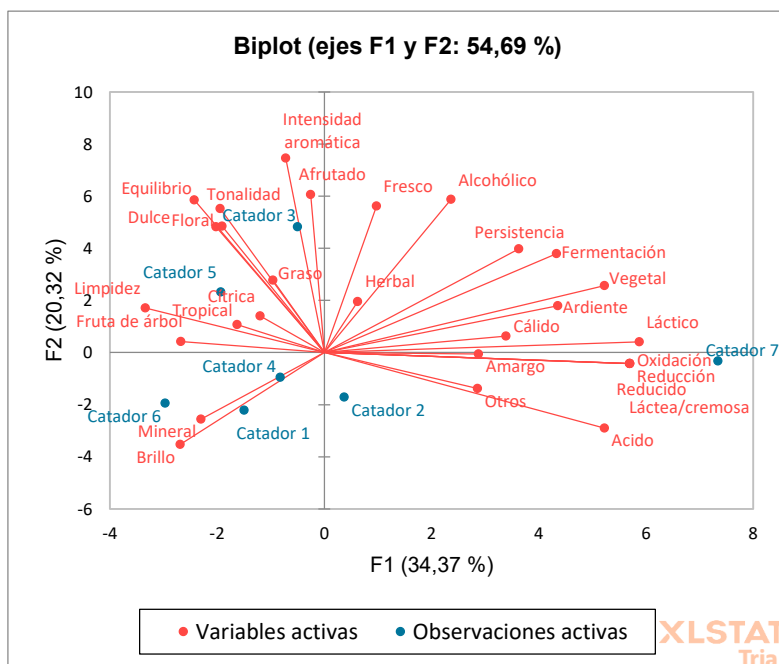


Figura 15. A.C.P. Cata descriptiva vinos ONECA Olite Cosecha 2022, variables de la cata descriptiva de los distintos catadores (ficha de cata de análisis descriptivo según el método de la norma ISO 11035 específica para vinos blancos)

En el ACP que relaciona los valores otorgados por los distintos catadores a las variables consideradas en la cata descriptiva, los dos ejes explican un 54,69% de la variabilidad, y se observa una agrupación de la mayor parte de las/os catadoras/es que se asocian, fundamentalmente, con las valoraciones más altas de Intensidad Aromática, Equilibrio, Afrutado, Tonalidad y Floral, entre las variables más destacadas.

4. Conclusiones

Oneca es una variedad única desde el punto de vista genético y morfológico, con unas buenas características de cultivo.

Tanto los resultados relativos a su localización geográfica, como los datos de parentesco que la identifican como progenitora de otras variedades, permiten afirmar que se ha conseguido recuperar para el presente una variedad al borde de la extinción que representa nuestro pasado vitícola, y da pistas sobre una vitivinicultura ancestral en el área geográfica de la comarca vitícola del Alto Ebro

La brotación media, su rusticidad frente a algunas enfermedades, así como su potencialidad para la elaboración de un producto distinto y cualitativamente óptimo, son algunos de los aspectos que han justificado la solicitud y la inclusión en el Registro de Variedades Comerciales con el objetivo de que en el medio plazo pueda volver a cultivarse en los viñedos navarros.







Así, mediante las Órdenes APA/228/2022 y APA/588/2022, publicadas en el Boletín Oficial del Estado en marzo y junio de 2022 se ha procedido a la inclusión en el Registro de Variedades Comerciales (Real Decreto 170/2011) de la variedad de vid ONECA. En la actualidad se está a la espera de la publicación de la autorización de su cultivo en la Comunidad Foral de Navarra.

5. Bibliografía

2. BAGLIOLINI, M. 1952. **Les stades réperens dans le developpement annuel de la vigne et leur utilisation pratique.** Revue Romande d'Agriculture, de Viticulture, et d'Arboriculture,8, pp-4-6
3. CIBRIAIN SABALZA F., SAGÜES SARASA A., RUEDA DIEZ A, ORIA OSTIZ I. (2021). **Conservatorio de Cepas Singulares y vinos Old-Vidaos de Navarra.** Navarra Agraria 249, pag. 33-39.
4. GARCIA-ESCUADERO, ENRIQUE (1991). **Influencia de la dosis y del momento de aplicación del riego sobre la producción desarrollo vegetativo, calidad del mosto y nutrición mineral de la vid (V. vinífera l)** Universidad Politécnica de Madrid, Madrid
5. GHRISSI H., DE ANDRÉS M.T., ANDREU L.J., YOLANDA GOGORCENA Y. (2022). **Genetic Diversity and Structure in a Spanish Grape Germplasm Collection Assessed by SSR Markers, Australian Journal of Grape and Wine Research**, vol. 2022, Article ID 8028224, page 9
6. MAUL et al. (2023): **Vitis International Variety Catalogue** - www.vivc.de (August)
7. MUÑOZ ORGANERO G. et al. (2017) **La enorme diversidad varietal de vid en España, en proceso de descubrimiento.**
https://www.acenologia.com/diversidad_varietal_vid_cienc0417/
8. RODRÍGUEZ-LORENZO, MAITE; CIBRIÁIN SABALZA, FÉLIX; SAGÜES SARASA, ANA; MARTÍNEZ ZAPATER, JOSÉ MIGUEL; IBAÑEZ, JAVIER; CARBONELL-BEJERANO PABLO. (2019) **Conociendo a la variedad Garnacha Blanca.** Navarra Agraria, nº 236 (págs. 29-36)



9. Ficha ampelográfica de la variedad Oneca

SUMIDAD			
Apertura extremidad	Totalmente abierta		
Distribución de la pigmentación antocianica extremidad	Ribeteada		
Densidad pelos tumbados de la extremidad	Baja		
HOJA JOVEN			
Color del haz	Verde amarillento		
Densidad de los pelos tumbados del envés	Nula		
PÁMPANO			
Color cara dorsal entrenudos	Verde y rojo		
Color cara ventral entrenudos	Verde		
Color cara dorsal nudos	Verde y rojo		
Color cara ventral nudos	Verde y rojo		
HOJA ADULTA			
Tamaño del limbo	Medio		
Forma	Orbicular		
Hinchazón del haz	Débil		
Nº lóbulos	Entre tres y cinco		
Profundidad de los senos laterales	Ausente		
Apertura del seno peciolar	Abierto		
Relación longitud/anchura de los dientes	Medios		
Forma de los dientes	Convexos		
Pigmentación de los nervios	Nula		
Diente en seno peciolar	A veces ausente y otras presente		
Limitación venas en seno peciolar	No delimitada		
Diente en seno lateral	Ausente		
Densidad pelos tumbados entre nervios envés	Nula o muy baja		
Densidad pelos erguidos sobre nervios envés	Nula o muy baja		
Long peciolo/long nervio central	Más larga		
RACIMO			
Longitud	Medio, algo menos de 16 cm		
Compacidad	Suelto-medio		
BAYA			
Longitud	Corta, algo menos de 13 mm		
Forma	Esférica		
Color de epidermis	Verde		
Intensidad coloración de la pulpa	Ausente		
Grado de consistencia	Blanda		
Sabores particulares	Especial		
Presencia de pepitas	Bien formadas		
ENVERO			
Época de envero	Muy tardío		
FLOR			
Órganos sexuales	Estambres completamente desarrolladas y gineceo completamente desarrollado		
Sumidad	Hoja adulta	Racimo	
			

Parámetros físico-químicos de vinos obtenidos de variedades resistentes a enfermedades en La Rioja

Sara I. Blanco*, María del Mar Hernández, Cristina M. Menéndez

Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (UR, GR, CSIC), Finca La Grajera, Carretera de Burgos km 6, 26007, Logroño.

Resumen

La viticultura es un sector líder en la economía agrícola española y europea, pero es también el de mayor uso de productos fitosanitarios. Los fungicidas utilizados para prevenir enfermedades de la vid pueden generar impactos negativos en el suelo y afectar a la calidad del vino. La utilización de variedades con resistencia genética a las enfermedades fúngicas (PIWIS) se presenta como una estrategia alternativa para mejorar la calidad y sostenibilidad del sector.

En este contexto se ha realizado un estudio con nueve variedades PIWIS comerciales con el fin de valorar su adaptación a las condiciones de la DO Rioja. El objetivo de esta investigación fue analizar el potencial enológico de estas variedades mediante la determinación de los parámetros físico químicos de las microvinificaciones de cinco variedades blancas (Fleurtai, Sauvignon Kretos, Sauvignon Nepis, Sauvignon Rytos, Soreli) y cuatro tintas (Cabernet Eidos, Cabernet Volos, Julius y Merlot Khorus). Estas variedades están localizadas en una plantación experimental en la finca de Valdegón del Gobierno de La Rioja, en bloques al azar con tres repeticiones y Tempranillo y Viura como controles. Se realizaron tres microvinificaciones por variedad.

Los vinos resultantes de la fermentación alcohólica se han analizado para los parámetros enológicos convencionales, que presentaron una gran variabilidad en pH, acidez total y contenido en polifenoles totales. Las variedades blancas presentaron niveles de acidez total más elevados que las tintas, destacando *Sauvignon Nepis* y *S. Rytos*. Tres variedades tintas *C. Eidos*, *C. Volos* y *Julius* presentaron altos niveles de antocianos, característica muy interesante dadas las características climáticas de la campaña 2022.

El conocimiento del comportamiento agronómico y enológico de estas variedades PIWIS en condiciones de La Rioja, permitirá valorar la oportunidad de introducir variedades más sostenibles y abrir camino para el estudio de esta posibilidad con variedades autóctonas riojanas.

1. Introducción

Las enfermedades fúngicas, en especial el oídio y el mildiu son responsables de importantes pérdidas económicas en viticultura. La vid es el cultivo que recibe el mayor volumen de productos fitosanitarios de todas las especies cultivadas en la Unión Europea. Este dato justifica la preocupación por la mejora de la sostenibilidad medioambiental de la viticultura.



Ante las restricciones en el empleo de fitosanitarios que plantea el Pacto Verde Europeo, una de las estrategias para abordar el desafío de la sostenibilidad vitícola consiste en la plantación de variedades con resistencia genética a enfermedades fúngicas. En diversos países europeos, Francia, Italia, Alemania y Suiza, se han obtenido en los últimos años, un repertorio de variedades resistentes a oídio y mildiu, que se conocen como "PIWI", y que están registradas como comerciales. En el contexto español, también existen iniciativas en este ámbito; en Cataluña (variedades del Penedés), y en Murcia, por parte del IMIDA (a partir de la variedad Monastrell); que han generado variedades PIWI a partir de cepas adaptadas a sus respectivas zonas vitícolas.[2]

Para valorar la oportunidad del cultivo de variedades PIWI, es esencial estudiar su comportamiento agronómico: ciclo de cultivo, rendimiento, tamaño y peso de racimo, peso de la baya, así como características de los mostos, en las condiciones edafoclimáticas de la zona. Además, es necesario conocer su potencial enológico y la percepción de los consumidores. En un estudio previo, se han caracterizado estas variedades para los parámetros agronómicos de interés.

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo el estudio del potencial enológico de estas variedades en la DOCa Rioja mediante la caracterización de los parámetros físico químicos de los vinos obtenidos en las microvinificaciones de la campaña 2022. La información derivada de estos resultados será de gran utilidad para entender la viabilidad de la producción de vinos más sostenibles y diferenciados que puedan satisfacer las necesidades de aquellos consumidores más preocupados por el medio ambiente.

2. Materiales y Métodos

La vendimia se llevó a cabo de forma escalonada, en base al punto óptimo de recolección de cada variedad y replicación. Se estableció la madurez en 12 Baumé para las blancas y en 13 Baumé para las tintas. Las altas temperaturas que caracterizaron la campaña de 2022 provocaron que las variedades más tempranas no pudieran vendimiarse en el momento óptimo y fueran cosechadas con niveles de azúcar superiores al óptimo establecido.

Se realizaron microvinificaciones de nueve variedades PIWIS y dos controles (Tempranillo y Viura) en la bodega experimental del ICVV. Se realizaron tres microvinificaciones por variedad, obteniéndose cada una a partir de uvas procedentes de 12 cepas.

Después de la recepción y pesado en bodega se procedió de dos formas diferentes según el tipo de variedad.

Para las variedades blancas, una vez realizado el despalillado y estrujado de las uvas, se utilizó una prensa neumática (Fig.1.) para prensar los hollejos y se recogió el mosto en lecheras de 3, 10 o 12 litros, según el volumen obtenido. Se añadió metabisulfito de potasio. A las 24h se añadieron levaduras comerciales *S. cerevisiae* cepa UVAferm VRB (Lallemand) (20 g/HL). El seguimiento de la fermentación (FA) se realizó diariamente y una vez completada (glucosa y fructosa <2g/L) se adicionó sulfuroso (50mg/l) para evitar la fermentación maloláctica. Los vinos se conservaron en cámara frigorífica (5°C) y a los dos meses, se trasegaron y se ajustó el SO₂ libre a 40mg/l.

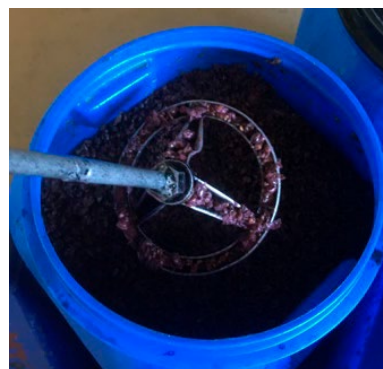


Fig. 1. Prensado de la uva tras su despallado. Fig. 2. Bazuqueo de las variedades tintas.

La vinificación de las variedades tintas, presentó diferencias respecto a las blancas, que se señalan a continuación. Tras el proceso de recepción y pesado de las uvas, se procedió al despallado y a su depósito en tanques para llevar a cabo la maceración. Se añadió metabisulfito de potasio, y se adicionaron las levaduras comerciales de igual manera que en la vinificación de blancas. Se realizaron bazuqueos diarios (Fig. 2.) para asegurar el contacto entre el sombrero y el mosto y favorecer la extracción de los compuestos deseables de los hollejos. Una vez completada la FA, se procedió a prensar la uva para separar el vino de los hollejos y se adicionó metabisulfito para prevenir la fermentación maloláctica.

Todos los vinos se conservaron a 12-15°C en una cámara hasta su análisis en la Estación Enológica de Haro.

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó el programa SPSS, realizando un ANOVA y un test Duncan para conocer las diferencias significativas de los distintos parámetros en función de las variedades PIWI.

3. Resultados y discusión

Se evaluaron en este trabajo 27 microvinificaciones de variedades resistentes y dos controles. Los resultados muestran diferencias significativas entre las variedades en la mayoría de los parámetros estudiados. No se apreció incidencia de enfermedades en ninguna variedad, posiblemente por las condiciones climáticas (altas temperaturas y baja HR) de la campaña.

En la Tabla 1, se muestran los datos de las variedades blancas. Es destacable que los valores de acidez total (AT) de todas las variedades fueron inferiores a las descritas en sus fichas técnicas [3] a excepción de la variedad *S. Nepis*, que presentó niveles superiores a los esperados y significativamente mayor al resto.

En cuanto al pH destaca la variedad *Fleurtai*, con valores de pH significativamente mayores al resto de variedades.



Tabla 1. Parámetros físico-químicos de variedades PIWIS blancas

VARIETADES BLANCAS	SO ₂ TOTAL (mg/l)	AV (g/L)	GAP %(v/v)	pH	AT (g/L)	IPT	IC
<i>Fleurtai</i>	104±1,2	0,2±0,1 ^a	13,9±0,2	4,06±0,16 ^b	3,4±0,6 ^a	6,4±0,3 ^b	0,1±0,0 ^b
<i>S. Nepis</i>	85±8,3	0,4±0,0 ^{a,b}	14,5±0,1	3,53±0,03 ^a	6,6±0,1 ^c	7,3±0,1 ^c	0,2±0,0 ^b
<i>S. Kretos</i>	99±9,7	0,5±0,1 ^b	14,9±0,2	3,77±0,05 ^{a,b}	4,6±0,3 ^{a,b}	8,1±0,5 ^d	0,1±0,0 ^b
<i>S. Rytos</i>	96±18,7	0,6±0,2 ^b	14,9±0,9	3,61±0,28 ^a	5,8±1,5 ^{b,c}	8,0±0,4 ^{c,d}	0,1±0,0 ^b
<i>Soreli</i>	89±7,0	0,2±0,0 ^a	14,0±0,1	3,62±0,04 ^a	4,4±0,1 ^{a,b}	5,6±0,1 ^a	0,1±0,0 ^a

En la Tabla 2 se muestran los datos relativos a los parámetros de los vinos de las variedades tintas. Los valores de acidez total obtenidos en Rioja son menores de los esperados según las fichas técnicas como se observó en las blancas. Destaca la variedad *C. Eidos* con una AT significativamente inferior al resto.

En cuanto al grado alcohólico, los valores obtenidos son altos como consecuencia de las condiciones climáticas de la campaña.

El contenido en polifenoles y antocianos, se corresponde con las variedades parentales de los cruzamientos originales. Así, *Julius* y *C. Eidos* y *C. Volos* presentan niveles de antocianos significativamente superiores a la variedad *Merlot Khourus*. Esta última mostró valores inferiores a los descritos en su ficha técnica.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos de las variedades tintas

VARIETADES TINTAS	SO ₂ TOTAL (mg/l)	AV (g/L)	GAP %(v/v)	pH	AT (g/L)	ANTOCIANOS	IPT	IC
<i>C. Eidos</i>	83±22,6 ^b	0,4±0,1	14,0±0,4 ^a	4,67±0,02 ^c	2,6±0,1 ^a	853,3± 62,6 ^b	63,3±4,2 ^a	13,6±1,5 ^b
<i>C. Volos</i>	37±8,7 ^a	0,6±0,0	14,8±0,5 ^a	4,37±0,02 ^b	3,5±0,1 ^b	>910± 0 ^b	97,9±9,5 ^b	10,4±1,5 ^a
<i>Julius</i>	62±3,7 ^{a,b}	0,5±0,1	15,8±0,1 ^b	4,33±0,05 ^b	4,3±0,6 ^{b,c}	>910± 0 ^b	99,2±6,0 ^b	10,9±1,4 ^a
<i>M. Khourus</i>	58±10,6 ^{a,b}	0,5±0,1	14,7±0,4 ^a	4,16±0,05 ^a	4,6±0,1 ^c	717± 52,6 ^a	60,9±2,4 ^a	9,2±3,6 ^{a,b}

4. Conclusiones

Este estudio evaluó las propiedades físico-químicas de los vinos obtenidos a partir de nueve variedades de uvas resistentes a enfermedades fúngicas y dos variedades control en la región de La Rioja. Los resultados mostraron que los vinos obtenidos de variedades resistentes tienen una acidez total menor a la esperada según las fichas técnicas, posiblemente debido al adelanto de la maduración que ha repercutido también en un grado alcohólico elevado debido a la vendimia tardía.

Estos resultados se confirmarán en otras campañas con el fin de entender la viabilidad de la producción de vinos más sostenibles frente a las enfermedades y al cambio climático, así como la percepción de consumidores comprometidos con el medio ambiente.



5. Bibliografía

- [1]. (Renée Mozell, M.); (Thach, L.) 2014. **The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions.** doi: <https://doi.org/10.1016/j.wep.2014.08.001>
- [2]. (Ruiz-García L.); (Gago,P.); (Martínez-Mora, C.); (Santiago JL); (Fernández-López, D); (Martínez, MC); (Boso, S). 2021. **Evaluation and Pre-selection of New Grapevine Genotypes Resistant to Downy and Powdery Mildew, Obtained by Cross-Breeding Programs in Spain.** Front. Plant Sci., 10 December 2021. Sec. Plant Pathogen Interactions Volume 12 - 2021 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.674510>
- [3] (Vivai Cooperativi Rauscedo sca) 2020. **The Disease-Resistant Varieties. Technical Booklets VCR (4th Edition)**
- [4]. (Gutiérrez-Escobar,R.); (Aliaño-González, M.J.); (Cantos-Villar, E). 2021. **Contenido de polifenoles del vino y su influencia en la calidad y propiedades del vino: una revisión.**

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Comunidad Autónoma de la Rioja a través del proyecto 2021/08 “Valorización de variedades resistentes a enfermedades para mejorar la sostenibilidad del viñedo: percepción de los consumidores”. El material vegetal ha sido cedido por Agromillora. Se agradece la colaboración del personal auxiliar del CIDA, Gobierno de la Rioja, y la de R. Zaldívar en la bodega experimental del ICVV.

Selección de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de vinos tintos

Rocío Escribano Viana, Lucía González Arenzana, Patrocinio Garijo, Pilar Santamaría, Ana Rosa Gutiérrez*

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja, CSIC), Finca La Grajera, Ctra. de Burgos Km. 6 (LO-20 - salida 13) 26007 Logroño (La Rioja) ESPAÑA. 941 894 980. ana-rosa.gutierrez@unirioja.es.

Resumen

El empleo de cultivos seleccionados de *Saccharomyces cerevisiae* ha contribuido a un mejor control de las vinificaciones, pero también a una simplificación de las comunidades microbianas que participan en las fermentaciones. Para evitar la homogeneidad ligada a los vinos inoculados con cepas comerciales de *S. cerevisiae*, se ha propuesto el uso de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae*.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de levaduras no-*Saccharomyces* para su empleo como inóculos en la elaboración de vinos tintos. El proceso de selección comenzó con la caracterización clonal de aislados procedentes de diferentes ecosistemas enológicos de la Denominación de Origen Calificada Rioja. En las siguientes etapas se evaluaron características como el comportamiento enológico o la liberación de compuestos aromáticos en el vino. Por último, se estudió el comportamiento de los inóculos de levaduras seleccionadas en tres variedades de uva: Tempranillo, Garnacha y Graciano.

El proceso finalizó con la selección de un inóculo mixto formado por *Torulaspora delbrueckii* y *Lachancea thermotolerans* que presentó características positivas para la calidad del vino como la producción de lactato de etilo, glicerol o ácido láctico, además de una elevada capacidad de implantación, esencial en los starters microbianos.

1. Introducción

Actualmente la inoculación de los mostos con cepas comerciales de *S. cerevisiae* en forma de levaduras secas activas (LSA) es una práctica muy extendida en enología. Esta técnica tiene algunas ventajas, como la fermentación rápida y completa del mosto y la gran reproducibilidad del producto final (1). Sin embargo, el empleo de inóculos comerciales también da lugar a una menor complejidad y cierta estandarización de los vinos obtenidos (2,3).

Con el fin de evitar la homogeneidad de los vinos inoculados con cepas comerciales de *S. cerevisiae*, se ha propuesto el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas en fermentaciones secuenciales con *S. cerevisiae*. Esta práctica ofrece algunas de las ventajas de las fermentaciones espontáneas como la mayor complejidad organoléptica, pero permitiendo un mayor control del proceso, lo que evita el riesgo de paradas de fermentación y los posibles defectos en el vino causados por la microbiota indígena (2,4).



Diferentes estudios realizados en los últimos años han demostrado que las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* obtenidas en programas de selección adecuados pueden tener una influencia positiva en las características del vino (5–7).

En este trabajo se aborda el proceso de selección de levaduras no-*Saccharomyces* aisladas en ecosistemas de la Denominación de Origen Calificada Rioja (D.O.Ca. Rioja) para su empleo en la elaboración de vinos de calidad.

2. Material y Métodos

Aislados de levaduras

Los aislados incluidos en el proceso de selección formaban parte de la colección del Servicio de Investigación Vitivinícola del Gobierno de La Rioja, formada por más de 500 cepas. El estudio se inició a partir de 97 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* entre las que se incluyeron especies que habían mostrado buenos resultados en anteriores estudios (*Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kluyveri* y *Torulaspota delbrueckii*) y especies poco estudiadas que habían sido identificadas en diferentes ecosistemas de la D.O.Ca. Rioja en anteriores trabajos (especies de los géneros *Candida* spp. y *Criptomococcus* spp., *Debaryomyces hansenii*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Williopsis pratensis* y *Zygosaccharomyces bailii*). En los ensayos se incluyó una cepa comercial de *S. cerevisiae* con la que se compararon los resultados obtenidos.

Identificación clonal

En las especies que incluían varios aislados se llevó a cabo su identificación a nivel clonal. Las cepas se caracterizaron mediante RAPD-PCR empleando los primers M13, M14, Coc, OPA02 y OPA09 según la metodología descrita por Renault et al. (8) con algunas modificaciones (9).

Vinificaciones

A lo largo del estudio se llevaron a cabo tres tipos diferentes de elaboraciones: vinificaciones puras en 100 mL, vinificaciones en 2000 mL y vinificaciones en 30 L.

Vinificaciones puras en 100 mL: las fermentaciones puras se llevaron a cabo en mosto pasteurizado de Viura contenido en matraces de 100 mL sellados con válvulas Müller. Cada uno de los aislados se inoculó a una concentración de 10^6 células/mL y el control de la fermentación se realizó mediante la medida de la reducción de peso por la liberación de CO_2 .

Vinificaciones en 2000 mL: las siguientes elaboraciones se llevaron a cabo en recipientes con 2000 mL de mosto de Tempranillo tinto y 500 g de hollejos. Las levaduras no-*Saccharomyces* se inocularon a una concentración de 10^6 células/mL y transcurridas 72 horas se añadió una levadura *S. cerevisiae* comercial a la misma concentración.

Vinificaciones en 30 L: en la última fase del proceso de selección las elaboraciones se realizaron en la bodega experimental del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) en depósitos de 30 L con tres variedades tintas de la D.O.Ca. Rioja: Tempranillo, Garnacha y



Graciano. Empleando las levaduras que habían superado las anteriores etapas del proceso de selección, se llevaron a cabo fermentaciones secuenciales siguiendo el mismo procedimiento que en las vinificaciones en 2000 mL.

Control de implantación de las levaduras inoculadas

Las muestras para el control de implantación de las levaduras se tomaron en diferentes momentos de la fermentación y se sembraron las diluciones adecuadas en placas de cloranfenicol glucosa agar (CGA) para su aislamiento.

La identificación de las colonias aisladas se llevó a cabo mediante la extracción del ADN y la amplificación del dominio D1/D2 del ADNr 28s por PCR empleando los cebadores y condiciones descritas por Kurtzman y Fell (10). Los productos de PCR fueron secuenciados por MacroGen Inc. y las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos disponibles de GenBank para identificar las especies a las que pertenecían los aislados.

Análisis de los parámetros enológicos en vinos

En los vinos obtenidos se analizaron parámetros como el grado alcohólico, pH, acidez total y acidez volátil de acuerdo con los métodos oficiales de la CEE. Los ácidos málico y láctico, el glicerol, el acetaldehído y los azúcares residuales se determinaron por un método enzimático empleando un autoanalizador MIURA One. El ácido tartárico se determinó por el método de Rebelein (11) y las antocianinas mediante decoloración empleando SO₂ (12).

Análisis de los compuestos aromáticos

La determinación de los compuestos aromáticos fermentativos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases empleando el método descrito por Ortega y colaboradores (13) con algunas modificaciones (14).

Análisis estadístico

El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó en todos los parámetros determinados en los diferentes ensayos empleando el programa SPSS. Se establecieron diferencias significativas aplicando el test de Tukey ($p \leq 0.05$).

El análisis de la capacidad discriminante de los parámetros enológicos analizados en el último ensayo se realizó también empleando el programa SPSS.

3. Resultados

Identificación clonal

El estudio de los aislados mediante RAPD permitió la diferenciación de 17 clones en los 21 aislados de *T. delbrueckii*, 13 clones en los 16 aislados de *M. pulcherrima*, 15 clones en los 16 aislados de *L. thermotolerans* y 7 clones en los 7 aislados de *Z. bailii* y los 11 aislados de *W.*



pratensis. Los resultados obtenidos mostraron una alta diversidad clonal en las especies estudiadas.

Fermentaciones puras en 100 mL

Las microvinificaciones se llevaron a cabo con 24 cepas pertenecientes a ocho especies diferentes (*Candida zeylanoides*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Williopsis pratensis*, *Lachancea thermotolerans* y *Torulaspota delbrueckii*) que habían sido preseleccionadas en base a características como la resistencia al SO₂ o las actividades enzimáticas relacionadas con el aroma y con el color y la clarificación del vino.

La implantación de las levaduras inoculadas fue total en la mayoría de los casos, excepto en los mostos inoculados con *W. pratensis*, dos de las cepas de *C. zeylanoides* y la cepa de *C. uzbekistanensis*. Dado que estas levaduras no fueron capaces de desarrollarse en el mosto, fueron eliminadas del proceso de selección.

El análisis del comportamiento fermentativo mostró que *S. cerevisiae* fue la única levadura capaz de consumir todo el azúcar (Tabla 1). *L. thermotolerans* y *Z. baillii* mostraron la capacidad para elevar la acidez del vino debido a la producción de ácido láctico y ácido málico, respectivamente. Los niveles más elevados de glicerol se detectaron en las muestras inoculadas con *Z. baillii*, seguidas de las inoculadas con *L. thermotolerans* y *M. pulcherrima*.

Tabla 1. Parámetros enológicos de los vinos inoculados con las diferentes especies de levaduras no-Saccharomyces.

Parámetros	Especies de levaduras						
	<i>D. hansenii</i>	<i>C. zeylanoides</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>L. thermotolerans</i>	<i>Z. baillii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Azúcares residuales (g/l)	201.0 e	151.1 d	111.2 cd	47.2 b	75.6 bc	96.6 c	0.08 a
Etanol (% v/v)	0.11 a	2.99 b	5.31 c	9.83 e	8.22 de	6.33 cd	12.60 f
Glicerol (g/l)	0.55 a	3.10 b	4.80 de	4.05 c	4.65 d	5.60 f	5.20 ef
pH	3.54 b	3.45 b	3.46 b	3.47 b	3.26 a	3.25 a	3.43 b
Acidez total (g/l)	2.30 a	3.30 b	3.50 b	3.25 b	5.70 d	4.40 c	3.55 b
Acidez volátil (g/l)	0.12 ab	0.41 e	0.05 a	0.22 c	0.26 cd	0.34 de	0.20 bc
Acetaldehído (mg/l)	0.00 a	45.0 b	11.5 a	7.50 a	17.5 a	21.5 ab	19.5 a
Ácido málico (g/l)	0.90 bc	0.95 c	0.90 bc	0.71 a	0.74 ab	1.26 d	0.69 a
Ácido láctico (g/l)	0.13 a	0.13 a	0.12 a	0.11 a	3.81 b	0.09 a	0.09 a

Los resultados de la composición aromática de los vinos mostraron una mayor concentración de alcoholes superiores en *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae*. Los vinos inoculados con *M. pulcherrima* presentaron los niveles más altos de 2-fenil etil acetato, que aporta aromas florales (Datos no mostrados).



Fermentaciones secuenciales en 2000 mL

Los anteriores ensayos mostraron que ninguna de las levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas fue capaz de completar la fermentación. Por esta razón, en esta etapa se llevaron a cabo fermentaciones secuenciales con las levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae*. El estudio de los resultados obtenidos en los ensayos previos dio lugar a la selección de 9 cepas de levaduras no-*Saccharomyces* pertenecientes a 6 especies (*T. delbrueckii*, *M. pulcherrima*, *L. thermotolerans*, *Z. bailii*, *W. pratensis*, y *C. zeylanoides*) y dos inóculos mixtos espontáneos que habían sido detectados en un test de pureza formados por *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* en proporción 70/30.

En los controles de implantación se observó que, tanto en el caso de los inóculos mixtos como de las cepas individuales, *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans*, fueron las levaduras que más tiempo permanecieron en los depósitos, hasta los 6 días.

Entre los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros enológicos (Tabla 2) destacó la elevada producción de láctico en *L. thermotolerans* que se vió reflejada también en los inóculos mixtos LT. Además, se observó una elevada concentración de glicerol en *T. delbrueckii*, que también se detectó en los inóculos mixtos.

Tabla 2. Parámetros enológicos

Parámetros enológicos	<i>M.p</i>	<i>T.d</i>	<i>L.th</i>	<i>L&T</i>	<i>Z.b</i>	<i>W.p</i>	<i>C.z</i>	<i>S.c</i>
Etanol (v/v)	14.1±0.0 a	14.1±0.1 a	14.1±0.1 a	14.2±0.0 ab	14.3±0.0 b	14.3±0.0 b	14.3±0.0 b	14.3±0.0 b
Azúcares (mg/L)	1.78±0.05 a	2.08±0.21 a	3.68±0.67 b	2.58±0.67 ab	2.00±0.00 a	2.05±0.21 a	1.80±0.14 a	1.80±0.00 a
pH	3.69±0.01 bcd	3.75±0.01 e	3.46±0.04 a	3.63±0.01 b	3.70±0.01 de	3.67±0.03 bc	3.69±0.00 bcd	3.72±0.01 de
Acidez total (g/L ácido tartárico)	5.26±0.37 ab	5.36±0.09 ab	6.90±0.26 c	5.71±0.22 b	5.32±0.27 ab	4.98±0.08 a	5.06±0.05 a	5.23±0.21 ab
Ácido acético (mol/L)	0.11±0.02 ab	0.09±0.01 a	0.19±0.04 b	0.13±0.02 ab	0.12±0.04 ab	0.14±0.01ab	0.11± 0.07ab	0.16± 0.01ab
Ácido málico (g/L)	1.87±0.13 bc	2.15±0.04ab	1.88±0.19 ab	2.06±0.15 bc	1.62±0.02 a	1.46±0.06 a	1.44±0.01 a	2.46±0.07 c
Ácido láctico (g/L)	0.17±0.15 a	0.20±0.05 a	3.38±0.78 c	1.11±0.06 b	0.16±0.08 a	0.04±0.11 a	0.17±0.04 a	0.16±0.00 a
Acetaldehído (g/L)	12.2±2.2 b	23.8±1.5 a	29.5±8.1 b	24.8±4.6 ab	23.0±1.4 ab	14.0±2.8 ab	14.5±2.1 ab	11.0±1.41 a
Glicerol (g/L)	6.45±3.63 a	8.75±0.24 d	7.73±0.13 bc	8.2±0.19 cd	7.80±0.14 bc	8.00±0.14 c	7.85±0.36 bc	7.55±0.07 b

Entre los resultados de los compuestos aromáticos destacó la elevada concentración de lactato de etilo en los vinos fermentados secuencialmente con *L. thermotolerans*, que también se pudo detectar en los inóculos mixtos (Datos no mostrados). Los elevados niveles de este compuesto se pueden explicar por la habilidad de *L. thermotolerans* para producir ácido láctico.

Fermentaciones secuenciales en 30 L

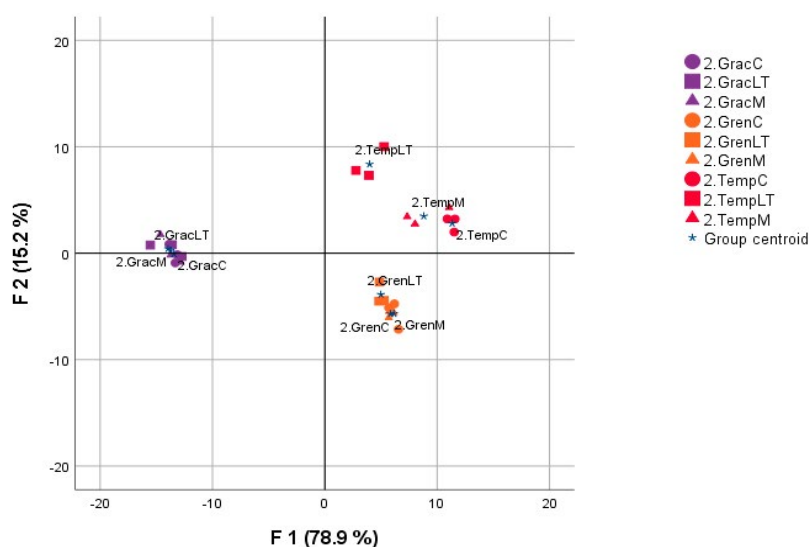
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los anteriores ensayos, se decidió seleccionar para la siguiente etapa una cepa de *M. pulcherrima* y uno de los inóculos mixtos con el fin de estudiar su comportamiento en tres variedades de uva diferentes: Tempranillo, Garnacha y Graciano.

Los resultados de los controles microbiológicos mostraron en la variedad Tempranillo la implantación más alta de las tres variedades estudiadas, tanto en el caso de *M. pulcherrima* como



del inóculo mixto. En esta variedad se pudo observar también una mejor implantación del inóculo mixto que del formado por *M. pulcherrima*.

Con los resultados de los análisis fisicoquímicos de los vinos se realizó un análisis discriminante canónico (ADC) (Fig. 1). Este análisis mostró una diferenciación de los vinos de la variedad Tempranillo elaborados con el inóculo mixto frente a las muestras control y las inoculadas con *M. pulcherrima*. Los vinos correspondientes al inóculo mixto se caracterizaron por un bajo pH y una elevada acidez total.



Coeficientes canónicos estandarizados				
Parámetros enológicos	F 1	F 2	F 3	F 4
pH	0.690	0.755	-0.224	0.343
Acidez total (g/L)	-0.481	0.978	-0.402	0.115
Acidez volátil (g/L)	-0.116	-0.217	0.636	0.835
Ácido láctico (g/L)	0.167	0.141	1.044	-0.254

Fig. 1. Representación del ADC de los parámetros enológicos analizados.

4. Conclusiones

Este trabajo muestra las diferentes etapas seguidas en el proceso de selección de un inóculo de levaduras no-*Saccharomyces* procedente de la región vinícola de La Rioja. El estudio culminó con la selección de un inóculo mixto formado por *T. delbrueckii* y *L. thermotolerans* que mostró características positivas como la producción de compuestos de interés y el incremento de la acidez del vino, además de una elevada capacidad de implantación, esencial en los starters microbianos. Debido a ello se puede concluir que el inóculo seleccionado es adecuado para su empleo en la producción de vinos de calidad.



5. Bibliografía

1. ROMANO, P.; CAPECE, A.; JESPERSEN, L. 2006. **Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts**. Yeasts in Food and Beverages. 13–53 p.
2. ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. 2003. **Function of yeast species and strains in wine flavour**. Int J Food Microbiol.86(1–2):169–80.
3. RAINIERI, S.; PRETORIUS, I.S. 2000. **Selection and improvement of wine yeasts**. Ann Microbiol. 50(1):15–31.
4. JOLLY, N.P.; AUGUSTYN, O.P.H.; PRETORIUS, I.S. 2006. **The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production**. South African Journal of Enology and Viticulture. 27(1):15–39.
5. BENITO, S.; HOFMANN, T.; LAIER, M.; LOCHBÜHLER, B.; SCHÜTTLER, A.; EBERT, K. et al. 2015. **Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-Saccharomyces and Saccharomyces cerevisiae**. European Food Research and Technology. 241(5):707–17.
6. LOIRA I, MORATA A, COMUZZO P, CALLEJO MJ, GONZÁLEZ C, CALDERÓN F, et al. 2015. **Use of Schizosaccharomyces pombe and Torulaspora delbrueckii strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality**. Food Research International. 76:325–33.
7. MEDINA, K.; BOIDO, E.; FARIÑA, L.; GIOIA, O.; GÓMEZ, M.E.; BARQUET, M.; et al. 2013. **Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with Hanseniaspora vineae**. Food Chem.;141(3):2513–21.
8. RENAULT, P.; MIOT-SERTIER, C.; MARULLO, P.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; LAGARRIGUE, L.; LONVAUD-FUNEL, A. et al. 2009. **Genetic characterization and phenotypic variability in Torulaspora delbrueckii species: Potential applications in the wine industry**. Int J Food Microbiol. 134(3):201–10.
9. GONZÁLEZ-ARENZANA, L.; GARIJO, P.; BERLANAS, C.; LÓPEZ-ALFARO, I.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, P. et al. 2017. **Genetic and phenotypic intraspecific variability of non-Saccharomyces yeasts populations from La Rioja winegrowing region (Spain)**. J Appl Microbiol. 122(2):378–88.
10. KURTZMAN, C.; FELL, J.W. 1998. **The yeasts: A taxonomic study**. 4th ed. Elsevier Science. ISBN: 9780080542690.



11. LIPKA, Z.; TANNER, H. 1974. **Une nouvelle méthode de dosage rapide de l'acide tartrique dans les moûts, les vins et autres boissons (selon Rebelein)**. Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture. 6(1):5–10.
12. SOMERS, T.C.; EVANS, M.E. 1974. **Wine quality: Correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines**. J Sci Food Agric. 25(11):1369–79.
13. ORTEGA, C.; LÓPEZ, R.; CACHO, J.; FERREIRA, V. 2001. **Fast analysis of important wine volatile compounds**. J Chromatogr A. 923(1–2):205–14.
14. LÓPEZ, R.; LÓPEZ-ALFARO, I.; GUTIÉRREZ, A.R.; TENORIO, C.; GARIJO, P.; GONZÁLEZ-ARENZANA, L. et al. 2011. **Malolactic fermentation of Tempranillo wine: Contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition**. Int J Food Sci Technol. 46(11):2373–81.

6. Agradecimientos

Este trabajo se realizó gracias a la financiación aportada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA).

35º REUNIÓN

GRUPO DE TRABAJO
**EXPERIMENTACIÓN EN
VITICULTURA Y ENOLOGÍA**

.....

TRANSVERSALES

Control de virus de vid para certificación sanitaria

Carlos Padilla, Miguel Alcaraz, Eliseo Salmerón
Equipo de virología

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA).
C/Mayor s/n, 3150 La Alberca (Murcia). Tlf: 968368583, E-mail: carlosv.padilla@carm.es

Resumen:

Mediante un convenio entre el IMIDA y la OEVV (Oficina Española de Variedades Vegetales) del Ministerio de Agricultura, desde hace más de 40 años el servicio de virología del IMIDA ha realizado el estudio de certificación sanitaria de virus de vid para planta candidata a cabeza de clon (material inicial) para todas las Comunidades Autónomas.

Los virus a analizar y detectar son los contemplados en el Real Decreto 208/2003, de 21 de febrero, del Reglamento técnico de control y certificación de plantas de vivero de vid. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: Entrenudo corto (GFLV), Mosaico del arabis (ArMV), Enrollado tipo 1 y 3 (GLRaV-1 y 3) y Jaspeado (GFkV).

1. Introducción.

En la actualidad hay más de 70 virosis que afectan al cultivo de la vid (Martelli, 2014), la mayoría de ellos no ocasionan problemas, otros son perjudiciales según el ecosistema donde se encuentra la planta, fundamentalmente en relación con la temperatura. Cuando hay infecciones mixtas de varios virus en una planta, se produce un efecto sinérgico, por el cual aunque los virus no son en sí graves, la planta quedará debilitada frente a otros fenómenos tanto bióticos como abióticos.

En general, los efectos que producen los virus en la planta de vid son los siguientes:

- Disminución de la producción
- Menor grado de azúcar
- Falta de color de las bayas
- Aumento del índice de acidez
- Merma de la capacidad de enraizamiento
- Escaso prendimiento de los injertos
- Envejecimiento prematuro de la planta
- Escasa y mala calidad de la madera de poda



Programa de certificación

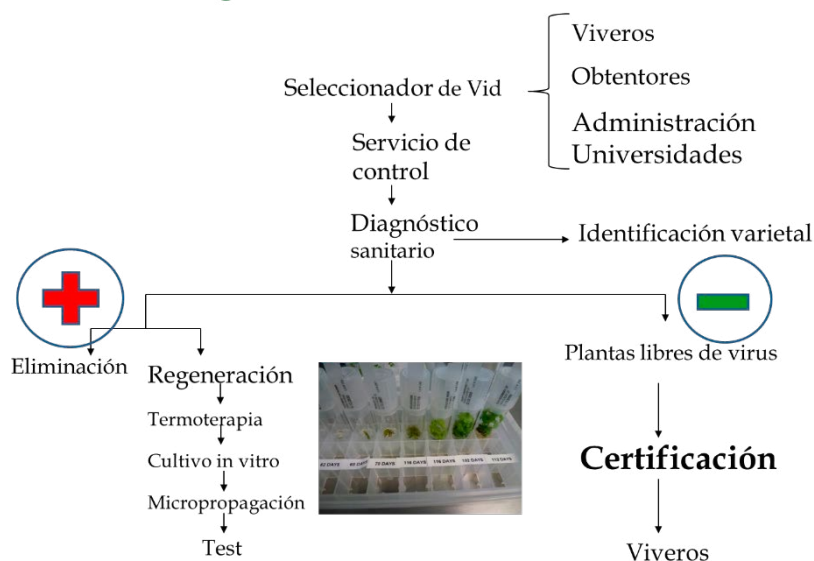


Fig1: Esquema del programa de certificación

Según cada país vitivinícola le afectan unos virus concretos condicionados por el ecosistema. En nuestro país los virus considerados como más graves son los siguientes:

Entrenudo corto infeccioso

Se trata de un Nepovirus (virus poliédrico transmitido por nematodos) muy extendido por todas las zonas vitivinícolas del mundo.

En la planta infectada afecta fuertemente a las raíces, siendo menos numerosas, de menor tamaño y escasas las raicillas, lo cual conlleva una mala absorción de agua y nutrientes. Respecto a las hojas, presentan menor tamaño y deformaciones ocasionando dificultades en el proceso fotosintético y por tanto en la absorción de metabolitos.

Puede llegar a producir más del 80% de pérdida de la cosecha (Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Rit-zenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., et al.)

Los tratamientos de riego, abonado, poda (para evitar anomalías en los sarmientos como dobles nudos, fasciaciones, entrenudos cortos) solo supondrán pérdidas de tiempo y dinero.

Como todos los virus la manera de transmitirse es mediante multiplicación vegetativa, injerto, acodo, reposición con planta infectada... Otra vía de contagio se produce cuando en el terreno se encuentra el nematodo ectoparasito *Xiphinema index*, el cual al picar en la raíz de una cepa infectada puede desplazarse por el suelo y llegar a una planta sana en la que inocula el virus.



Enrollado

Comprendido por una amplia familia Closteroviridae muy extendido por todo el mundo. Compuesto por variantes diferentes de enrollados: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 (5, 6, 9, Car), GLRaV-7, GLRaV-13.

Cabe destacar por su gravedad los tipos 1, 2 y 3.

Las hojas en cultivares tintos adquieren tonalidades rojizas, excepto las nerviaciones primarias y secundarias que se mantienen verdes.

Dichas hojas se enrollan (de aquí la denominación del virus) hacia el envés muestran un tacto endurecido y crujiente.

En cultivares blancos el tono del limbo es amarillento manteniendo las nerviaciones verdes.

La producción es menor y los racimos maduran irregularmente, más tardíos que los de las cepas sanas.

Las uvas tienen menor contenido en azúcares y mayor acidez. Lo cual hace depreciar el producto.

El sistema radicular se ve también afectado con menor número de raíces.

La transmisión es mediante vía vegetativa, los vectores generalmente son cochinillas del género Planococcus ficus y citri, Pseudococcus longispinus entre otras.

Jaspeado

Se trata de una afección de índole virótico, cuya presencia ocasiona graves problemas sobre todo, en los portainjertos.

Produce un escaso desarrollo foliar que conlleva producciones y calidades regulares constituyendo el mayor problema el efecto sinérgico generado por presencia de infecciones mixtas.

Es un virus que no muestra síntomas en campo, por lo que pasa desapercibido por los prospectores.

Su propagación es vegetativa y no se conocen los vectores transmisores.

(En Chardonnay se encuentra con frecuencia ocasionando pérdidas de mayor o menor envergadura)

Mosaico del Arabis

Es un Nepovirus (ArMV), en nuestro país, se ha detectado excepcionalmente en zonas frías.



La transmisión es mediante multiplicación vegetativa y el nematodo *Xiphinema diversicaudatum*

Los síntomas son similares al entrenudo corto, produce pérdida de color y ligera deformación de la hoja. Cuando se une al entrenudo corto se denomina “degeneración infecciosa” y tanto los síntomas como la gravedad es severa.

Madera rizada

Aunque el reglamento técnico no lo contempla, se trata de un síndrome virótico grave.

Es un Vitivirus compuesto por varias variantes (GVA, B, D, E, F) que está muy extendido por todas las regiones vitícolas, aunque su presencia en los viñedos es menor debido a que los síntomas son llamativos y el viticultor tiende a eliminar las plantas afectadas. La corteza aparece más o menos agrietada con acanaladuras en floema de mayor o menor profundidad, llegando al Xilema, que ocasionan oclusión en los vasos libero leñosos con lo que la circulación de la savia tanto bruta como elaborada se ve seriamente dañada, afectando negativamente a la producción.

La transmisión es mediante vía vegetativa y mediante cochinillas vectores del genero *Pseudococcidae*.

2. Material y Métodos

El diagnóstico y detección de virosis de vid lo realizamos mediante indexaje biológico, análisis serológico DAS-ELISA (Standard DoubleAntibody-Sandwich Assay) y análisis molecular mediante RT-qPCR, para los siguientes virus:

Entrenudo Corto Infeccioso (GFLV), Virus del Mosaico del Arabis (ArMV), Enrollado (GLRaV (tipos 1 y 3) y Jaspeado (GFkV), sólo para patrones.

Para completar el estudio y aportar más información al obtentor, además analizamos para otras virosis, como las variantes de Enrollado (GLRaV- 2, 4, 5, 6, 9), Jaspeado (GFkV) en viníferas, el complejo de la Madera Rizada (RW) y el virus del Pinot gris (GPGV)

Indexaje biológico:

Consiste en injertar una planta que no se conoce su estado sanitario, sobre una planta indicadora sana, que ante la infección por un determinado virus exteriorizan síntomas visuales característicos que ayudan a identificar el tipo de virus.

Somos el único organismo en España que desarrolla la técnica de indexaje biológico (de acuerdo a la normativa europea) en campo, nos permite una reproducción lo más fidedigna posible del comportamiento del virus en condiciones naturales que asemejan la realidad agrícola del cultivo de vid.



Estos estudios nos han permitido ser los primeros en detectar virus nuevos en Europa, como variantes del enrollado, (GLRaV- 4, 5 y 9) y estar actualizados y alerta frente a nuevos virus emergentes.

En análisis en material vegetal rutinario, debido a la biología de la vid y al muestreo, a veces al analizar mediante técnicas serológicas (ELISA) o moleculares (PCR) pueden surgir falsos negativos.

En nuestro caso, en el estudio de virosis para planta seleccionada para cabeza de clon, entendemos que el indexage biológico puede alargarse en tiempo de diagnóstico y no dar unos resultados inmediatos, hay que esperar a que el posible virus se multiplique en la planta indicadora.

Hay que tener en cuenta que es el material inicial de todas las Comunidades Autónomas a partir del cual se multiplicará a base, certificado...y se comercializará.

Incorporamos y complementamos todas las técnicas de diagnóstico posibles para integrarlas y asegurar un resultado robusto y fiable. Sobre todo y teniendo en cuenta que analizamos muchas variedades provenientes de selecciones clonales que llegan a 10 años de trabajo.

La secuenciación masiva ofrece un potencial de diagnóstico futuro muy prometedor para cualquier cultivo pero en el caso de la vid hay que investigar y establecer protocolos oficiales de diagnóstico ya que en muchos casos y según la variedad, la vid tiene la singularidad de no distribuir homogéneamente los virus por la planta.

3. Resultados

En la década de los 70, vitivinicultores transmitieron la problemática de baja producción y calidad de sus uvas a los viveristas, ya que aunque hacían tratamientos fitosanitarios, riegos o abonaban la cosecha no mejoraba. Tras reuniones con el Ministerio de Agricultura, se consideró tener un control sanitario frente a virus, como tenían otros países en ese momento (Francia, Alemania, USA...), la incidencia vírica a nivel nacional era considerable.

A partir de los años 80. Se legisló sanitariamente el material de vid en España. Los organismos de control y sanidad vegetal de las distintas CCAA empezaron a hacer inspecciones y análisis, eliminando el material infectado y etiquetando las plantas certificadas libres de las virosis más graves.

En la actualidad, nuestro equipo ha analizado cerca de 6000 plantas madres iniciales “cabeza de clon” de toda España, son la base de la vitivinicultura. Contribuyendo a disponer de viñedos productivos, de calidad, sin envejecimiento prematuro de las cepas y competitivos comercialmente, frente a otros países que tienen programas de certificación muy parecidos al nuestro.



Fig. 2. Categorías de material vegetal de vid.

4. Conclusiones

Actuación frente a los virus

Control de vectores transmisores como cochinillas, insectos... Es importante conocer el terreno donde vamos a plantar, por la posible presencia de nematodos vectores (básicamente *Xiphinema index*). Medidas como: desinfección del suelo, dejar en barbecho la parcela, nematicidas o poner otro cultivo al que no le afecten los citados nematodos.

No usar madera de otras viñas para hacer injertos sin previamente conocer su estado sanitario, acudiendo para ello a los servicios de diagnóstico vegetal.

Eliminación de material contaminado por su posible propagación por la parcela.

El aspecto fundamental es disponer de material certificado, tanto patrones como viníferas, contribuye a garantizar la producción de los viticultores, pues al adquirir las plantas certificadas en viveros autorizados libres de virus, se aseguran que está poniendo la base de la futura rentabilidad de su viña, en este sentido conviene resaltar que tanto el patrón como la vinífera tienen que ser certificadas, ya que en caso de que uno de los materiales esté infectado se producirá una contaminación generalizada.

Hay que tener especial precaución a la hora de adquirir material vegetal de fuera de España ya que debido al trasiego globalizado de material, se están expandiendo virus de carácter grave que no existían en nuestro país, así como virus emergentes nuevos que podrían ser una futura amenaza. Tenemos viveros autorizados muy profesionalizados que cumplen todas



las inspecciones y garantías sanitarias y que previene al viticultor de posibles desastres futuros por ahorrarse un poco de dinero.

La OEVV ofrece una oportunidad GRATUITA a los obtentores, viveristas, investigadores, mejoradores....que quieran certificar sus plantas madres candidatas a cabeza de clon de material inicial.

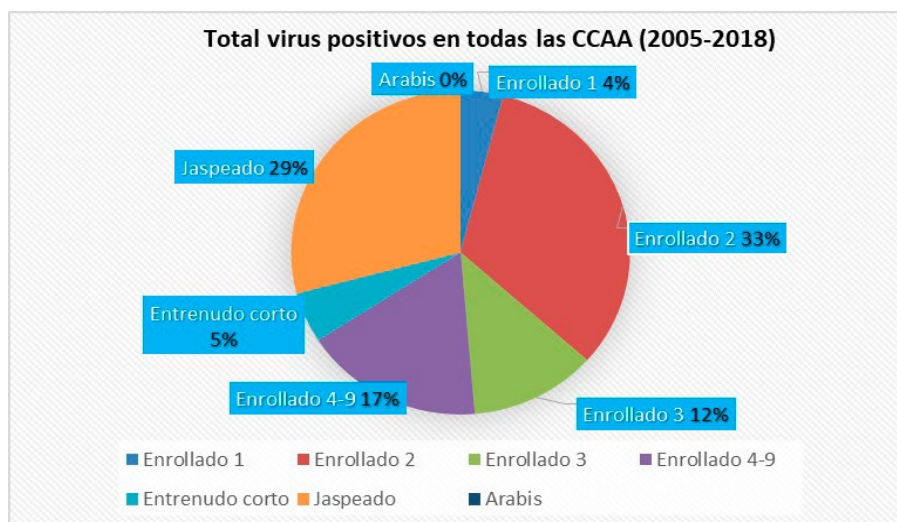


Fig4. Infecciones de virus (2005-2018)

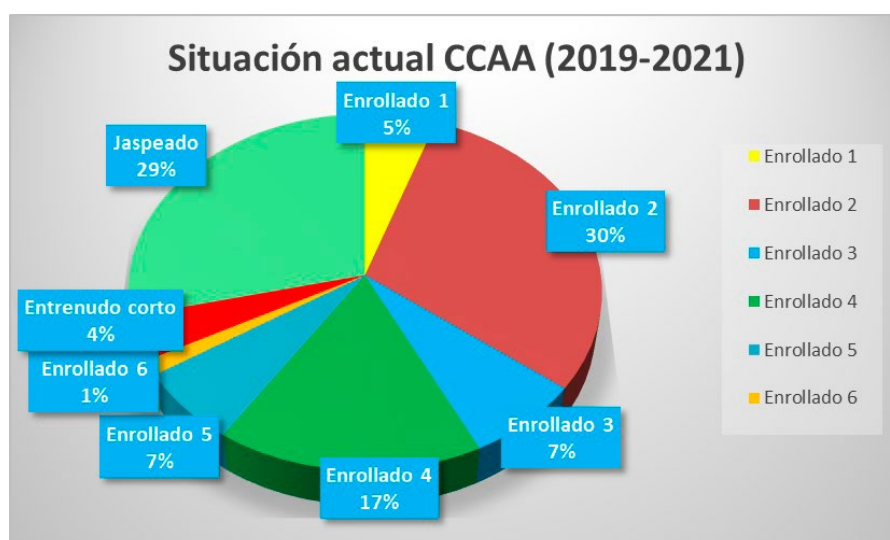


Fig4. Infecciones de virus (2019-2021)

El registro de variedades comerciales Registro de Variedades de Vid

Ramón Martínez García

*Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA)
C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia)
Teléfono: 968 101149
ramon.martinez8@carm.es*

1. Introducción.

Dependientes de la SG de Medios de Producción Agrícolas y Oficina Española de Variedades Vegetales, existen dos instituciones íntimamente relacionadas entre sí, el Registro de Variedades Protegidas y el Registro de Variedades Comerciales.

El Registro de Variedades Comerciales tiene como base legal la Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos. Una de las funciones que el Registro de Variedades Comerciales tiene encomendada es la de fomentar y poner a disposición de los agricultores semillas y plantas de vivero de variedades cada vez más productivas y mejor adaptadas a las distintas condiciones españolas de clima y suelo. Por otro lado, el Registro de Variedades Protegidas, cuya base legal es la Ley 3/2000 de 7 de enero de régimen jurídico de la protección de las obtenciones vegetales, otorga a su titular una propiedad especial limitada en el tiempo (Título de Obtención Vegetal), entrando a formar a parte, junto con las patentes, de los tradicionales derechos de propiedad intelectual e industrial.

Ambos Registros de Variedades conforman un sistema por el que se reconocen derechos de propiedad y autorizaciones de comercio, y armonizan los derechos de los obtentores, los productores, los agricultores y los consumidores.

La interconexión entre ambos sistemas tiene su máxima expresión en el examen técnico de identificación de la variedad, ya que el efectuado en un Registro se considera válido en el otro y las muestras oficiales de material vegetal aportadas por el solicitante de una variedad en uno de ellos se consideran igualmente como tal en el otro.

El examen técnico de identificación comprende todos los trabajos de campo y laboratorio que se requieren para comprobar que el material de la variedad solicitada es distinto, estable y homogéneo, en comparación con el resto de las variedades de la colección de referencia para esa especie.

No obstante, y debido a la propia naturaleza de ambos Registros, existen algunas diferencias entre ellos. En el de Variedades Protegidas se necesita además el estudio de la novedad.

La novedad es un requisito heredado del sistema de patentes. Sin embargo, a diferencia del sistema de patentes que requiere novedad absoluta, en el sistema de protección de variedades se requiere novedad exclusivamente comercial. Se considera, en el caso concreto de la vid, que una variedad pierde la novedad cuando:



- a) Se hubiese realizado una venta con un año de antelación a la fecha de presentación de la solicitud, en España.
- b) Seis años si la venta se realizó fuera de España.

2. Solicitudes.

Los procedimientos de inscripción de variedades de vid en el Registro de Variedades, se iniciaran de acuerdo con lo previsto en el apartado 1, del artículo 12 de la Ley 30/2006, de 26 de julio, de oficio, o a instancia del solicitante, su causahabiente o persona autorizada por ellos.

La solicitud deberá contener como mínimo, las siguientes especificaciones:

- a) Nombre y dirección del solicitante o causahabiente.
- b) Nombre y dirección del obtentor. Si el obtentor es desconocido deberá constar esta circunstancia.
- c) Especie y subespecie botánica y nombre común de la especie a que pertenece la variedad.
- d) Referencia del obtentor.
- e) Denominación de la variedad solicitada.
- f) Descripción del proceso a utilizar en la conservación de la variedad.
- g) Variedades notoriamente conocidas con características análogas a la variedad que se solicita.
- h) Ensayos a que ha sido sometida y resultados obtenidos.
- i) Indicación, en su caso, de estar inscrita en alguna lista de variedades de otro país, con indicación de su fecha y denominación, así como de estar inscrita en el Catálogo común correspondiente de la Unión Europea.
- j) Indicación, en su caso, de estar solicitada o en posesión de un título de obtención vegetal nacional, comunitario o de algún país miembro de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), con indicación de su fecha y denominación.

Cuando los solicitantes sean extranjeros no residentes en la Unión Europea, deberán actuar por medio de representante, que aportarán los datos precisos a los efectos de notificación y liquidación de tasas.

Además de lo exigido en el artículo 12 de la Ley 30/2006, de 26 de julio, la solicitud deberá acompañarse, entre otros, de:

- a) Cuestionario técnico de la especie correspondiente con datos relativos a la variedad solicitada.

El modelo de solicitud de inscripción de variedades de vid y el cuestionario técnico se pueden obtener en la siguiente página web dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación:

<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/semillas-y-plantas-de-vivero/registro-de-variedades/solicitudes-y-formularios>



3. Denominaciones.

Toda variedad que se inscriba en el Registro de Variedades Comerciales y/o el Registro de Variedades Protegidas, debe ser designada con una sola denominación que permita identificarla sin riesgo de confusión con otra.

Las denominaciones de las variedades podrán adoptar la forma de un nombre de fantasía o la forma de un código.

La denominación no podrá inducir a error o prestarse a confusión sobre las características, el valor o la identidad de la variedad o sobre la identidad del obtentor.

No podrá contener palabras como especie, cultivar, variedad, forma, híbrido, cruce u otras similares o traducciones de ellas.

La denominación no podrá hacer referencia a características o valores específicos que den la falsa impresión de que solamente esa variedad las tiene, cuando en realidad otras variedades de esa misma especie las poseen o pueden poseerlas.

No podrá ser ofensiva o contraria al orden público.

La denominación no podrá hacer creer que, debido a su similitud con un nombre comercial notoriamente conocido, diferente de una marca comercial registrada, una denominación de origen o de la denominación de una variedad, la variedad es otra variedad, ni inducir a error sobre la identidad del solicitante, del obtentor o del responsable del mantenimiento de la variedad.

No podrá componerse o contener comparativos o superlativos.

No podrá ser el nombre botánico o parte de él, de cualquier género o especie del reino vegetal, ni el nombre común de un género o especie del reino vegetal perteneciente a la misma clase, de conformidad con el sistema de clases de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

No podrá ser el nombre de una persona física o jurídica, o contener una referencia a ese nombre de tal forma que pueda causar confusión sobre la identidad del solicitante, del responsable del mantenimiento de la variedad o del obtentor.

Una variedad no podrá denominarse de modo diferente al utilizado en el primer país donde haya sido registrada, a menos que se compruebe que la denominación es inadecuada en España.

El solicitante no puede depositar como denominación de una variedad una designación que ya se beneficie de un derecho de marca referente a productos idénticos o similares, o una denominación que pueda crear confusión con dichas marcas, salvo si se compromete a renunciar a los derechos de las marcas desde el momento que la variedad sea inscrita

La denominación de una variedad vegetal no podrá ser idéntica o similar a una denominación de origen reconocida por alguna autoridad oficial, ya sea definitiva o se encuentre en fase de tramitación.



La denominación deberá ser diferente de toda denominación que designe una variedad existente de la misma especie vegetal o de una especie vecina en cualquier Estado miembro de la Unión Europea, miembro de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales o miembro de cualquiera de las organizaciones intergubernamentales que integran la citada Unión.

4. Los Ensayos técnicos de identificación.

Estos ensayos tienen como finalidad:

- a) Comprobar que la variedad candidata pertenece al taxón botánico descrito.
- b) Determinar que la variedad candidata que es distinta, homogénea y estable.
- c) Establecer una descripción oficial de la variedad.

Los caracteres a observar durante la realización de los ensayos son establecidos por la SG de Medios de Producción Agrícolas y Oficina Española de Variedades Vegetales, en función del estado de la técnica y los dictámenes o recomendaciones de los Comités de expertos de los Organismos Internacionales de los que España es miembro, teniendo en cuenta las Comisiones Nacionales de Estimación de Variedades y las Directivas de la Unión Europea. Por lo tanto, los protocolos de realización, metodología de trabajo, niveles de expresión y duración cumplirán con los protocolos técnicos de la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV). En el caso de que estos no existieran, se deberá cumplir con las directrices de examen de la Unión para la Protección de la Obtenciones Vegetales (UPOV).

En el caso concreto que nos ocupa de la vid, el protocolo técnico de la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV) es el documento CPVO-TP/050/2 de fecha 01/04/2009 disponible en <https://cpvo.europa.eu>, y las directrices de examen de la Unión para la Protección de la Obtenciones Vegetales (UPOV) corresponden al documento TG/50/9 de fecha 09/04/2008 y disponible en https://www.upov.int/test_guidelines/es/.

4.1 Distinción

Una variedad será considerada distinta si es posible diferenciarla claramente por la expresión de las características resultantes de un genotipo en particular o de una combinación de genotipos, de cualquier otra variedad cuya existencia, en la fecha de presentación de la solicitud, sea notoriamente conocida.

En particular, se considerará que una variedad es notoriamente conocida, a partir de la fecha en que se haya presentado en cualquier país una solicitud:

- a) Bien de concesión de un derecho de obtentor, siempre que conduzca a la consecución de la protección solicitada.
- b) Bien de inscripción de la variedad en un registro oficial, siempre que resulte finalmente inscrita.



La notoriedad de la existencia de otra variedad podrá desprenderse también de la explotación de la variedad ya en curso, presencia de la misma en una colección de referencia o de cualquier otro medio de prueba.

4.2 Homogeneidad

Una variedad se considerará homogénea, si es suficientemente uniforme en sus caracteres específicos, a reserva de la variación previsible habida cuenta de las particularidades de su reproducción sexuada o de su multiplicación vegetativa.

4.3 Estabilidad

Una variedad se considera estable, si sus caracteres específicos se mantienen inalterados después de reproducciones o multiplicaciones sucesivas o, en caso de un ciclo particular de reproducciones o de multiplicaciones, al final de cada ciclo.

5. El material vegetal para la realización de los estudios de DHE.

Una vez presentada la solicitud, la muestra de material vegetal necesaria para la realización de los estudios de DHE, deber ser enviada al Centro de Examen con las siguientes señas:

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA)
Centro de Ensayos de Evaluación de Variedades
C/Mayor s/n
30150 La Alberca (Murcia)

El material vegetal se enviará por el procedimiento más rápido y seguro, y dentro de los siguientes plazos:

Del 1 de febrero al 15 de marzo.

El solicitante avisará al Centro de Examen, con al menos una semana de antelación, del envío de la muestra.

Las muestras que no se reciban en los plazos señalados o en las que el material no cumpla los requisitos fijados en el punto siguiente, no entrarán en el proceso de examen, y esta incidencia será comunicada de inmediato a la OEVV. La OEVV comunicará al solicitante la incidencia y podrá, de acuerdo con el Centro de examen, admitir la subsanación de las faltas en la remisión del material.

El rechazo, motivado, de una muestra se comunicará por la OEVV al solicitante, el cual dispondrá de un plazo de un mes para retirar la muestra. Pasado ese plazo la muestra será destruida. Si el rechazo es por motivos sanitarios la muestra se destruirá de inmediato.

La falta de muestra conforme podrá dar lugar al archivo de la solicitud.



El material se remitirá de acuerdo con las condiciones señaladas a continuación.

En casos excepcionales, la OEVV de acuerdo con el Centro de examen, podrá aceptar o establecer otras condiciones diferentes.

Muestra:

La cantidad mínima de material vegetal que debe presentar el solicitante será:

- 10 barbados, en el caso de patrones.
- 10 plantas injertos sobre patrón 110 Richter, de un año de edad, en el caso de variedades viníferas o de mesa.

Sanidad:

- Visiblemente sanas y libres de enfermedades transmisibles.
- Acompañadas de un certificado de análisis serológico de laboratorio autorizado, con resultado negativo para las virosis siguientes:
 - Enrollado tipo I y III
 - Entrenudo corto infeccioso.
 - Virus del Mosaico del Arabic, en el caso de material vegetal procedente de fuera de España.
 - Virus del jaspeado de la vid, en el caso de patrones.

Tratamientos:

El material no habrá sido objeto de tratamiento químico no autorizado. Si ha sido tratada se informará en detalle de los tratamientos y productos empleados.

El material no provendrá directamente de un tratamiento de termoterapia salvo que se haya sometido a una comprobación previa de adecuación con el material original.

Método de producción:

El material de la muestra no se habrá obtenido mediante la técnica "in vitro".

Etiquetado:

El conjunto de una muestra podrá ir precintada en su conjunto o en caso contrario de forma individual, y portando una etiqueta identificativa con los siguientes datos:

- Especie
- Variedad
- Solicitante
- Clon, en su caso



Importaciones:

Los solicitantes que presentan material procedente de un país distinto de aquel en el que se efectuará el examen, deberán asegurarse de que se han cumplido todas las formalidades aduaneras y fitosanitarias en vigor.

6. La realización de los estudios de DHE.

Los estudios que se realizan en el Centro de Ensayos de Evaluación de Variedades del IMIDA tienen una duración mínima de cuatro años. Los dos primeros se dedican al establecimiento y formación de las plantas de la variedad candidata a estudiar, para superar su etapa juvenil. Los dos años siguientes se dedican al examen conocido como DHE (Distinguibilidad, Homogeneidad y Estabilidad).

Durante este examen DHE, que se realiza de acuerdo con el protocolo técnico de la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCVV) y teniendo en cuenta las especificaciones de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), se estudian 44 caracteres (los indicados en el documento TP/050/2) sobre un mínimo de cinco plantas, y se compara la variedad candidata con las variedades notoriamente conocidas más parecidas o cercanas a ella.

Si se comprueba que la variedad candidata cumple con los criterios necesarios para su inscripción, es decir, ser claramente distinta en la expresión de al menos uno de sus caracteres a otras variedades conocidas, ser homogénea y estable en la expresión de estos caracteres, y en ese caso se emite un informe final favorable junto con una descripción oficial.

A partir de este momento, la variedad candidata podrá ser inscrita en el Registro correspondiente, si cumple con el resto de requerimientos administrativos, es decir, poseer una denominación apropiada y haber pagado las tasas, y en el caso de variedades protegidas, cumplir con el requisito de novedad, pasando la muestra a formar parte de la Colección Nacional de Referencia de Variedades de Vid para su mantenimiento y custodia.

7. Bibliografía

1. Ley 3/2000, de 7 de enero, de régimen jurídico de la protección de las obtenciones vegetales.
2. Ley 30/2006, de 26 de julio, de semillas y plantas de vivero y de recursos fitogenéticos.
3. Real Decreto 170/2011, de 11 de febrero, por el que se aprueba el Reglamento general del registro de variedades comerciales y se modifica el Reglamento general técnico de control y certificación de semillas y plantas de vivero.
4. <https://cpvo.europa.eu/>
5. <https://www.upov.int/>
6. <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/medios-de-produccion/semillas-y-plantas-de-vivero/>

