

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS



INDUCCIÓN DE POLIFENOLES Y COMPUESTOS VOLÁTILES EN
***Vitis vinifera* PARA CALIDAD EN UVA Y VINO**

TESIS

QUE PRESENTA

IRMA OFELIA MAYA MERAZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DOCTOR EN CIENCIAS HORTOFRUTÍCOLAS

CHIHUAHUA, CHIH., DICIEMBRE DEL 2019

TÍTULO DE LA TESIS

**INDUCCIÓN DE POLIFENOLES Y COMPUESTOS VOLÁTILES EN
Vitis vinifera PARA CALIDAD EN UVA Y VINO**

LINEA DE INVESTIGACIÓN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN HORTOFRUTÍCOLA

DISCIPLINA

FISIOLOGÍA VEGETAL




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS


Los que suscriben, certifican que han leído y recomiendan a la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas la aceptación de la tesis de Doctorado titulada: **“INDUCCIÓN DE POLIFENOLES Y COMPUESTOS VOLÁTILES EN *Vitis vinifera* PARA CALIDAD EN UVA Y VINO.”**

Realizada por: **IRMA OFELIA MAYA MERAZ**
Como cumplimiento parcial de los requerimientos para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**


Ratifican que las firmas son verdaderas:




Dr. Damián Aaron Porras Flores
Director



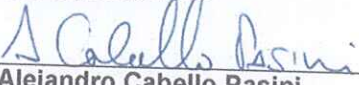
Dra. Ramona Pérez Leal
Director de Tesis



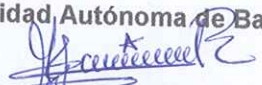
Dr. José de Jesús Ornelas Paz
Co-Director
Centro de Alimentación y Desarrollo A. C.
Unidad Cuauhtémoc



M. C. Ramón Saúl Luján Aguirre
Secretario de Investigación y
Posgrado



Dr. Alejandro Cabello Pasini
Asesor
Universidad Autónoma de Baja California




Dra. María Janeth Rodríguez Roque
Asesor



Dr. Juan Manuel Soto Parra
Asesor

16 - DICIEMBRE - 2019

Fecha



Dr. Juan Luis Jacobo Cuéllar
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Those who subscribe, certify that they have read and recommend to the Department of Agrotechnological Sciences the acceptance of the thesis entitled: **"POLYPHENOLS AND VOLATILE COMPOUNDS INDUCTION IN *Vitis vinifera* FOR QUALITY IN GRAPE AND WINE"**.

Submitted by: **IRMA OFELIA MAYA MERAZ**
In partial fulfillment of the requirements to obtain the degree of **DOCTOR OF SCIENCE**


Ratify that signatures are real:



Dr. Damián Aarón Porras Flores
Director



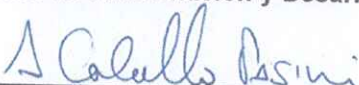
Dra. Ramona Pérez Leal
Major-professor




Dr. José de Jesús Ornelas Paz
Advisor
Centro de Alimentación y Desarrollo A.C.



M. C. Ramón Saúl Luján Aguirre
Secretario de Investigación y Posgrado



Dr. Alejandro Cabello Pasini
Advisor
Universidad Autónoma de Baja California




Dra. María Janeth Rodríguez Roque
Advisor



Dr. Juan Manuel Soto Parra
Advisor

16- DICIEMBRE- 2019

Fecha



Dr. Juan Luis Jacobo Cuéllar
Advisor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

Los que suscriben, miembros del Cuerpo Académico **UACH-CA-11 "FRUTALES DE ZONA TEMPLADA"**, han fungido como parte integral en la asesoría de **IRMA OFELIA MAYA MERAZ** durante el desarrollo y conclusión del trabajo de investigación: **"INDUCCIÓN DE POLIFENOLES Y COMPUESTOS VOLÁTILES EN *Vitis vinifera* PARA CALIDAD EN UVA Y VINO"**.

Dra. Ramona Pérez Leal
Responsable

Dr. Juan Manuel Soto Parra
Integrante

16 - DICIEMBRE - 2019

Fecha

Dra. María Janeth Rodríguez Roque
Integrante

Cd. Universitaria s/n Campus 1
Chihuahua, Chih., México C.P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845
www.faciatec.uach.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

El que suscribe, miembro del Grupo de Investigación "**FITOQUÍMICOS Y NUTRIENTES**", ha fungido como parte integral en la asesoría de **IRMA OFELIA MAYA MERAZ** durante el desarrollo y conclusión del trabajo de investigación: "**INDUCCIÓN DE POLIFENOLES Y COMPUESTOS VOLÁTILES EN *Vitis vinifera* PARA CALIDAD EN UVA Y VINO**".

Dr. José de Jesús Ornelas Paz
Responsable
Centro de Alimentación y Desarrollo A.
C. Unidad Cuauhtémoc

16- DICIEMBRE - 2019

Fecha

Cd. Universitaria s/n Campus 1
Chihuahua, Chih., México C.P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 4391845
www.faciatec.uach.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROTECNOLÓGICAS

El que suscribe, como miembro del Cuerpo Académico **UABC-CA-49 "BOTÁNICA MARINA"**, ha fungido como parte integral en la asesoría de **IRMA OFELIA MAYA MERAZ** durante el desarrollo y conclusión del trabajo de investigación: **"INDUCCIÓN DE POLIFENOLES Y COMPUESTOS VOLÁTILES EN *Vitis vinifera* PARA CALIDAD EN UVA Y VINO"**.

Dr. Alejandro Cabello Pasini
Responsable
Universidad Autónoma de Baja California

16- DICIEMBRE - 2019

Fecha

Cd. Universitaria s/n Campus 1
Chihuahua, Chih., México C.P. 31310
Tel. y Fax (614) 4391844 y 43
www.faciatec.uach.mx

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme alcanzar ésta meta de mi vida. Tal vez algunos lo omitirán, sin embargo me quedo con la frase de Louis Pasteur que nos enseña que “la poca ciencia te aleja de Dios, pero mucha te lleva a Él”.

A mi familia, por todo el apoyo incondicional, por su paciencia y sobretodo comprensión durante estos años de formación académica.

A mis directores de tesis Dra. Ramona Pérez Leal y Dr. José de Jesús Ornelas Paz, por ser excelentes guías durante la realización del trabajo de investigación, gracias por su apoyo, confianza y paciencia, pero sobre todo, por compartir conmigo su gran sabiduría, mi admiración y gratitud.

A mis asesores Dr. Alejandro Cabello-Pasini y Dr. Juan Luis Jacobo Cuéllar, por su gran apoyo, compromiso y dedicación durante el desarrollo del trabajo de investigación.

A mi comité de tesis y catedráticos, por estar presentes de una u otra manera, durante éstos años de formación.

A mis compañeras que me acogieron como parte de su equipo de trabajo en el laboratorio de fitoquímicos y nutrientes: Anita, Gaby y Angélica, en ustedes encontré una gran amistad, así mismo al técnico del laboratorio, gracias Emilio.

A mis compañeras de la primera generación, especialmente Linda y Rocío, les agradezco infinitamente su compañerismo, pero sobre todo su valiosa amistad.

DEDICATORIA

Éste logro va dedicado al motor de mi vida, mi familia, mi esposo Daniel, mis hijos Sofía y Danielito, porque ustedes iluminaron el camino e hicieron que valiera la pena éste gran esfuerzo, siempre me brindaron su amor, comprensión, paciencia, y sobre todo el apoyo incondicional, para poder concluir satisfactoriamente con ésta meta. No fue fácil, pero tampoco imposible.

A dos grandiosas personas que me forjaron, mis padres, Pedro (†) y Ofelia, que me enseñaron a nunca rendirme o quebrantarme ante las adversidades de la vida. Gracias mamá por cuidar de mis hijos y ser su segunda madre cuando yo estaba ausente, gracias padre por ser mi maestro, hoy se cumple la meta de aquella promesa realizada antes de tu partida.

A mis hermanos Luis, Pedro, César y Jorge por siempre estar ahí y apoyarme de alguna u otra manera ante las ocurrencias y locuras de su hermana la más pequeña.

Para todos ustedes con amor y gratitud.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
TABLA DE CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
CAPÍTULO I. MORFOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA VID Y LOS CAMBIOS COMPOSICIONALES DE LA BAYA COMO RESPUESTAS ANTE SU MENEJO	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
1.1 INTRODUCCIÓN	6
1.2 MORFOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA VID Y LOS CAMBIOS COMPOSICIONALES DE LA BAYA COMO RESPUESTAS ANTE SU MENEJO	8
1.2.1 Morfología de la Vid	15
1.2.2 Morfología de la baya.....	16
1.2.3 Cambios composicionales durante la madurez de la baya.....	16
1.2.4 Influencia del Calcio en la Fisiología de la Vid	23
1.2.3 Influencia del Ácido Abscísico Sobre la Síntesis de Metabolitos Importantes Para la Calidad de la Baya.....	25
1.2.4 Influencia del Manejo del Dosel Sobre el Metabolismo Primario y Secundario de la Vid	27
1.3 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	29
1.4 LITERATURA CITADA	29
CAPÍTULO II. EFECTO DE RESIDUOS DE CARBONATO DE CALCIO DE INDUSTRIAS CEMENTERAS SOBRE COMPOSICIÓN FENÓLICA Y EL RENDIMIENTO EN UVAS SHIRAZ .	37
RESUMEN.....	39
ABSTRACT	41
2.1 INTRODUCCIÓN	424
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	446
2.2.1 Chemicals and solvents	44
2.2.2 Study site and treatments.....	44
2.2.3 Foliar analysis.....	39
2.2.4 Grape Analysis	39
2.2.5 Statistical analysis.....	40
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
2.3.1 Effect of grapevine leaf CaCO ₃ application on yield and physicochemical characteristics of grapes	50
2.3.2 Influence of pre-harvest CaCO ₃ on the concentration of phenolic compound in grapes	52
2.4 CONCLUSIONES	62
2.5 LITERATURA CITADA	62

CAPÍTULO III. CARBONATOS DE CALCIO COMO SUBPRODUCTO DE LA INDUSTRIA CEMENTERA PARA INCREMENTAR LA COMPOSICIÓN FENÓLICA EN UVAS Y VINOS CV. SHIRAZ	70
RESUMEN.....	72
ABSTRACT	73
3.1 INTRODUCCIÓN	74
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
3.2.1 Sitio de estudio y tratamientos.....	75
3.2.2 Químicos y solventes.....	76
3.2.3 Cosecha, parámetros fisicoquímicos de la uva y vinificación	76
3.2.4. Determinación de polifenoles	69
3.2.5 Estadísticos	78
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
3.3.1 Influencia del carbonato de calcio en rendimiento y fisicoquímicos de las bayas y sus vinos.....	79
3.3.2 Efecto del carbonato de calcio sobre los compuestos fenólicos individuales de las bayas y los vinos	80
3.4 CONCLUSIONES	86
3.5 LITERATURA CITADA	87
CAPÍTULO IV. EFECTO DEL ANILLADO Y LA ELIMINACIÓN DE HOJAS EN EL RENDIMIENTO Y LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DE LAS UVAS CABERNET SAUVIGNON.....	91
RESUMEN.....	93
ABSTRACT	94
4.1 INTRODUCCIÓN	95
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
4.2.1 Material vegetal.....	89
4.2.2 Fisicoquímicos de las uvas.....	90
4.2.3 Compuestos volátiles	90
4.2.4 Análisis estadístico	99
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	100
4.3.1 Componentes de rendimiento	100
4.3.2 Calidad fisicoquímica de las uvas.....	101
4.3.3 Concentración relativa de compuestos volátiles	102
4.3.4 Rendimiento.....	10597
4.3.5 Parámetros de madurez de las bayas	98
4.3.6 Compuestos volátiles	10799
4.4 CONCLUSIONES	1091
4.5 LITERATURA CITADA	1102
CONCLUSIONES GENERALES.....	1157
LITERATURA CITADA.....	1168

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO II

Tabla 1. Characterization of CaCO ₃ from cement industries of Chihuahua	37
Tabla 2. Phenological stages from dormancy to leaf fall and CaCO ₃ application on Shiraz grapes	38
Tabla 3. Effect of foliar CaCO ₃ application on physicochemical parameters of Shiraz grapes during ripening. TSS = total soluble solids, TA=titratable acidity. Values indicate the means of four samples. CIELab = color as defined by the International Commission on Illumination (CIE), L* = lightness value, a* and b* = color channels.....	44
Tabla 4. Mean concentrations of total phenolic compounds concentration, and stilbene and anthocyanin in CaCO ₃ -treated Shiraz grapes during ripening (mg.g ⁻¹ dry weight)	45
Tabla 5. Phenolic acids and flavan-3-ols identified and quantified in CaCO ₃ -treated Shiraz grapes and controls during ripening (mg.g ⁻¹ dry weight)	46

CAPITULO III

Tabla 1. Efecto del CaCO ₃ sobre Rendimiento y parámetros fisicoquímicos de las bayas	71
Tabla 2. Efecto de la aplicación de CaCO ₃ en bayas sobre los parámetros fisicoquímicos del vino	72
Tabla 3. Efecto de la aplicación de CaCO ₃ sobre los compuestos fenólicos individuales en bayas y en sus vinos	73

CAPITULO IV

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados en los diferentes tratamientos y su descripción aromática	94
Tabla 2. Influencia de los diferentes manejos del dosel sobre la composición relativa (área (/103) de volátiles identificados en las bayas	95

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1.1 Morfología de la vid	8
Figura 1.2 Estructura de la baya.....	9
Figura 1.3 Formación, desarrollo y cambios de composición en las bayas.....	10
Figura 1.4 Síntesis de polifenoles a través de la vía fenilpropanoide	12
Figura 1.5 Esquema general del posible efecto del calcio sobre el ácido abscísico, vía fenilpropanoide y la síntesis de compuestos volátiles	21

CAPITULO II

Figura 1. Effect of foliar CaCO ₃ application on the mean? Relative concentration (%) of potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), and phosphorous (P), and concentrations (in ppm) of copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mg) and zinc (Zn) in leaves of Shiraz grapes. Different letters above bars indicate statistically significant differences.....	42
Figura 2. Effect of foliar applications of CaCO ₃ on the average of number of clusters per grapevine (\pm SE), cluster weight and grape yield at harvest time in Shiraz grapes. Different letters above bars indicate statistically significant differences.....	43
Figura 3. Effect of foliar CaCO ₃ application on the relative concentration (%) of polyphenolic compounds in Shiraz grapes at harvest time....	47

CAPITULO III

Figura 1 Temperaturas máximas y mínimas y precipitación pluvial ocurridas durante el envero y cosecha en la temporada 2017	67
--	----

CAPITULO IV

Figura 1. Efecto del anillado, deshoje basal y anillado más despunte sobre el peso de los racimos en uvas Cabernet Sauvignon/110-R.	92
Figura 2. Influencia de los diferentes manejos del dosel sobre los parámetros fisicoquímicos de las bayas	93
Figura 3. Formación, desarrollo y cambios de composición en las bayas.....	97

INTRODUCCIÓN GENERAL

La *Vitis vinifera* es uno de los cultivos más antiguos del mundo. Sus frutos y subproductos son muy demandados actualmente alcanza producciones alrededor de 73 millones de toneladas en fruto y consumo de vinos alrededor de 244 millones de hectolitros (OIV, 2018). Factores como sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT) y pH han sido utilizados durante mucho tiempo para determinar parámetros de calidad de las bayas (Nogales-Bueno et al., 2013). Ya que representa la cantidad de ácidos orgánicos y de azúcares acumulados en las bayas. Por otro lado se sabe que las bayas contienen biomoléculas más complejas que provienen del metabolismo secundario y que proporcionan calidad organoléptica a sus vinos. Compuestos que otorgan calidad aromática como los compuestos volátiles y compuestos que otorgan color, astringencia, amargor y estabilidad a los vinos como los polifenoles, entre los que se encuentran las antocianinas, los flavonoles, flavanoles y estilbenos (Jia et al., 2017). Actualmente existen variaciones climáticas que afectan las condiciones ambientales, el incremento de temperaturas, variabilidad en la ocurrencia de lluvias o modificaciones en la cantidad de luz han impactado la composición química de la uva y sus vinos (Jones and Davis, 2000; Shultz and Jones, 2010). Por lo tanto, se han reportado en diversas investigaciones que mediante manejos del dosel pueden modificar el microclima de la vid teniendo impacto en la calidad aromática (Gatti et al., 2012; Palliotti et al., 2013; Zhang et al., 2017), mientras que aplicaciones exógenas de ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (AS), jasmonatos, o cloruros de calcio (CaCl_2), han demostrado alterar la acumulación de polifenoles y compuestos volátiles en baya y sus vinos (Al-Qurashi y Awad, 2013; Alonso et al., 2016; Ju et al., 2016; Portu et al., 2017), sin embargo el uso de ABA es caro, y el uso de manejos del dosel solamente se ha enfatizado en raleos de hoja. Por lo tanto, el objetivo general del trabajo de investigación, fue comparar el impacto de técnicas de raleo de hoja, anillado y combinación de raleo apical y anillado sobre la vid en los compuestos volátiles de sus frutos. Así como la evaluación del uso foliar de residuos con carbonatos de calcio (CaCO_3) de la industria cementera de Chihuahua, sobre vides Shiraz en precosecha y su impacto

sobre el rendimiento, la composición fenólica y de compuestos volátiles en sus uvas y vinos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar técnicas de inducción de polifenoles y compuestos volátiles en *Vitis vinifera* para calidad en uva y vino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el impacto de la aplicación de CaCO_3 vía foliar sobre *Vitis vinifera* Shiraz durante la precosecha en la composición de polifenoles y rendimiento de sus bayas.
2. Evaluar el impacto de la aplicación foliar de CaCO_3 sobre *Vitis vinifera* Shiraz durante la precosecha en la composición de polifenoles y características de sus vinos.
3. Evaluar el impacto de técnicas de anillado y combinación de raleo apical y anillado sobre los compuestos volátiles, madurez tecnológica y rendimiento de frutos.

**CAPÍTULO I. MORFOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA VID Y LOS CAMBIOS
COMPOSICIONALES DE LA BAYA COMO RESPUESTAS ANTE SU MANEJO**

RESUMEN

La *Vitis vinifera* es una planta de la familia de las Ampelídeas, sus frutos sufren una serie de cambios composicionales durante la madurez, mismos que proporcionan parámetros de calidad. Entre los que se encuentran, los ácidos orgánicos, acumulación de azúcares, polifenoles y compuestos volátiles, mismos que determinan el potencial de alcohol y características organolépticas a sus vinos. Se ha documentado que el calcio tiene influencia sobre la fisiología de la vid, pues involucra a proteínas que activan diversas expresiones genéticas, entre ellas, el cierre estomático y la síntesis de ácido abscísico (ABA), el ABA de manera exógena, ha sido aplicada en diversas investigaciones con la finalidad de estimular la ruta fenilpropanoide e incrementar el contenido de polifenoles, mientras que diversas técnicas sobre el dosel de la vid, han sido utilizadas para incrementar el contenido de azúcares y compuestos volátiles, por lo que en la presente revisión se muestran los efectos que tiene tanto el calcio y las técnicas de manejos sobre el dosel de la vid, en las respuestas fisiológicas para incrementar la calidad de las bayas.

ABSTRACT

The *Vitis vinifera* is a plant of the Ampelideas family, its fruits undergo a series of compositional changes during maturity, which provide quality parameters. Among those found are organic acids, accumulation of sugars, polyphenols and volatile compounds, which determine the potential of alcohol and organoleptic characteristics of its wines. It has been documented that calcium has an influence on the physiology of the vine, since it involves proteins that activate various genetic expressions, including stomatic closure and abscisic acid synthesis (ABA), ABA exogenously, has been applied in various investigations in order to stimulate the phenylpropanoid pathway and increase the polyphenol content, while various techniques on the vine canopy have been used to increase the content of sugars and volatile compounds, so in the present review They show the effects of both calcium and the techniques of management on the canopy of the vine, in physiological responses to increase the quality of the berries.

I. INTRODUCCIÓN

La vid es una planta con características de arbustos que pertenece a la familia de las Ampelídeas. Sus frutos conformados por un conjunto de bayas sostenidas en un raspón que en conjunto dan origen a los racimos (Hidalgo-Togores, 2011). Durante el desarrollo y la madurez las bayas sufren una serie de cambios composicionales (Conde et al., 2007), en el desarrollo existe una mayor acumulación de ácidos orgánicos, pero éstos tienden a disminuir durante la etapa de madurez, sin embargo se presentan acumulación de azúcares y otros metabolitos secundarios como los polifenoles y compuestos volátiles (Vila y Catania, 2005). Sin embargo para que éstas respuestas fisiológicas se pueden presentar, se ven involucradas una serie de reacciones y expresiones genéticas. Actualmente se sabe que el calcio juega un papel importante como clave de diversas reacciones y expresiones genéticas para adaptación de las plantas (Ranty et al., 2016), pues trabaja como mensajero secundario regulando grupos de proteínas que dominan cierre estomático (Yang, Peng, Whitaker y Conway, 2012; Zou et al., 2015), aunado a que se ha demostrado en *Arabidopsis*, que el calcio a través de proteínas calcineurinas (CBLs), activan expresiones genéticas como el *ZmCBL9* que se encargan de la síntesis del ácido abscísico bajo condiciones de estrés por sequía o salinidad (Pandey et al., 2004). Por lo tanto en la última década, se ha visto el uso de ácido abscísico de manera exógena sobre la *Vitis vinifera*, demostrando que su uso durante la precosecha incrementan el contenido de antocianinas, principalmente en variedades Malbec, Crimson seedless, Beihong, Gamay, Cabernet Sauvignon, entre otras (Coelho de Souza-Leaño, Coelho-Lima, Dias-Costa, y Gomes-da Trindade, 2014; Alonso, Berli, Fontana, Piccoli y Bottini, R. et al., 2016; Ju, Liu, Zhao, Meng y Fang, 2016; Wang et al., 2016; Martins, García, Costa, Sottomayor, y Gerós, 2018), pero el ácido abscísico es caro, por lo tanto se pudiera aplicar calcio como fuente más económica y desencadenar la síntesis de polifenoles y tal vez de compuestos volátiles, ya que en Chihuahua, la industria cementera produce como deshecho carbonatos de calcio (CaCO_3), que pudieran ser aprovechados en diversos cultivos agrícolas, entre ellos la vid. Por otro lado, se ha observado que existen algunas investigaciones de raleo para incrementar los compuestos volátiles en las bayas (Gatti et al., 2012; Nogales-

Bueno et al., 2013; Palliotti et al., 2013; Zhang et al., 2017), sin embargo, no se ha estudiado el impacto de anillado en el incremento de fotosintatos que pudiera acumularse en la parte aérea con un impacto en la composición fisicoquímica de las bayas. Por lo tanto el objetivo de la siguiente revisión, fue documentar los efectos del calcio sobre el ABA y sobre los compuesto fenólicos, además de documentar los efectos que pudiera tener las diferentes técnicas sobre el dosel de la vid, en la composición fisicoquímica de las bayas.

II. MORFOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE LA VID Y LOS CAMBIOS COMPOSICIONALES DE LA BAYA COMO RESPUESTAS ANTE SU MENEJO

2.1 Morfología de la Vid

La planta de la vid, es un arbusto trepador formado por un tronco leñoso, brazos y sarmientos, mientras que en etapa vegetativa también se incluyen pámpanos, hojas pentalobuladas, zarcillos y racimos (Fig. 1.1). La vid pertenece a la familia de las Ampelídeas. Su fruto está conformado por un conjunto de bayas unidas mediante pedicelos a un raspón o escobajo con características herbáceas o leñosas que en conjunto dan origen a los racimos (Hidalgo-Togores, 2011).

El duramen está formado por el tronco y los brazos, siendo la vía por donde la planta es provista de nutrientes a través del xilema, además es el sostén de las ramas, sarmientos, hojas y racimos. Los sarmientos surgen de los nudos y partir de éstos brotan callos, para formar nuevas ramas llamadas pámpanos, a partir del segundo nudo de los pámpanos se originan los racimos. Por otro lado, las hojas de la vid tienen cinco nervaduras principales con un lóbulo central y cuatro lóbulos laterales inferiores y superiores, es en la hoja donde se lleva a cabo diferentes reacciones fisiológicas para la elaboración de fotosintatos, así como la respiración y transpiración (Villa, 2018).

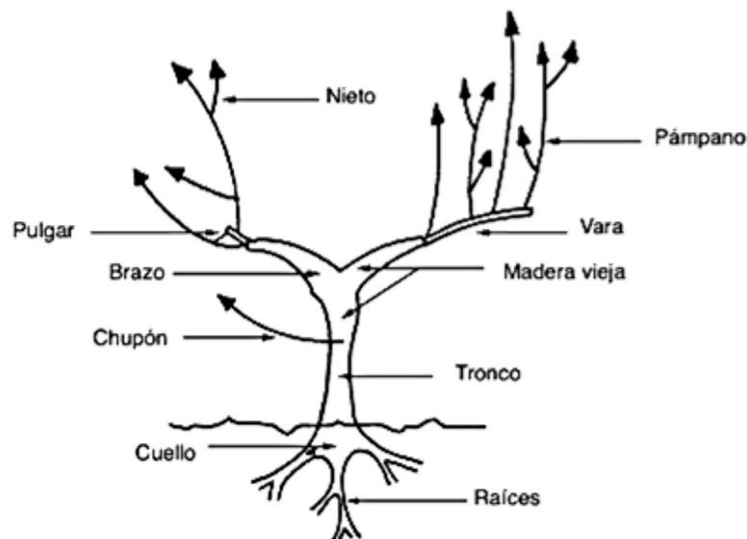


Figura 1.1. Morfología de la vid (Hidalgo-Togores, 2011)

2.2 Morfología de la baya

Las bayas son frutos carnosos provistos de epicarpio, mesocarpo y endocarpo (Fig. 1.2). El epicarpio es la estructura más externa de las bayas conocido como hollejo o piel, éste se conforma principalmente de tejidos de protección epidermis e hipodermis, además de tejido parenquimático. En el hollejo se encuentra el mayor contenido de antocianinas, sobre todo en uvas tintas.

Por otro lado, el mesocarpo o pulpa, está compuesto en su mayoría por tejido parenquimático, y contenido a de ácidos orgánicos, sin embargo, conforme avanza la madurez, la cantidad de ácidos tienden a disminuir, pero incrementa su tamaño y acumulación de azúcares. Finalmente el endocarpo donde se encuentra tejido vascular, además rodea a las semillas donde se encuentran mayor contenido de flavanoles (Mullins et al., 1992).

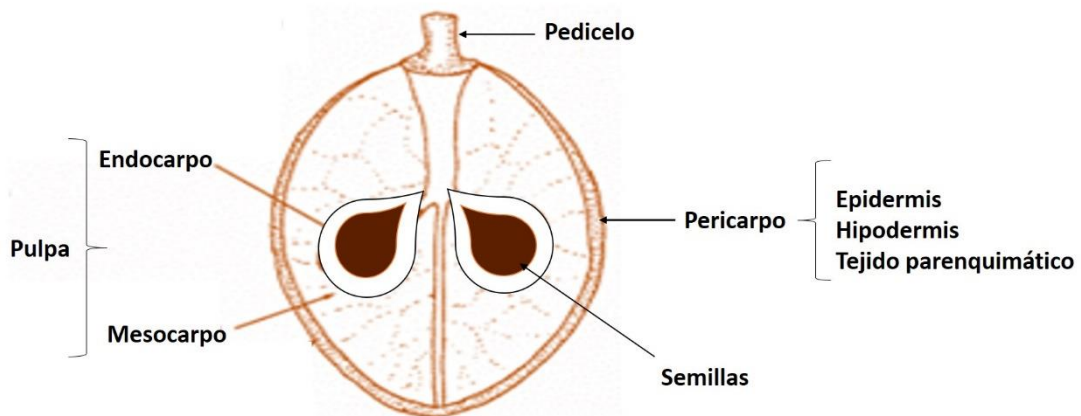


Figura 1.2. Estructura de la baya

2.3 Cambios composicionales durante la madurez de la baya

La madurez de las uvas es indispensable para elaborar vinos de calidad. Factores genéticos, edáficos y climáticos tienen influencia sobre la madurez (Coombe, 2001). Sin embargo, antes de la madurez, la vid atraviesa por una serie de etapas fenológicas para dar origen al fruto, desde brotación, aparición de hojas, floración hasta cuajado de los frutos. A partir del cuajado, comienza tanto la división como la expansión celular hasta que culmina el desarrollo de las semillas deteniendo la

etapa de formación de las bayas. En ésta etapa las bayas se caracterizan por tener mayor acumulación de ácidos orgánicos como el ácido tartárico y málico, pero da inicio el periodo de madurez o envero (Conde et al., 2007). Durante la madurez ocurren una serie de cambios composicionales en las bayas como disminución de ácidos orgánicos pero mayor acumulación de azúcares, compuestos aromáticos y polifenoles (Fig. 1.3).

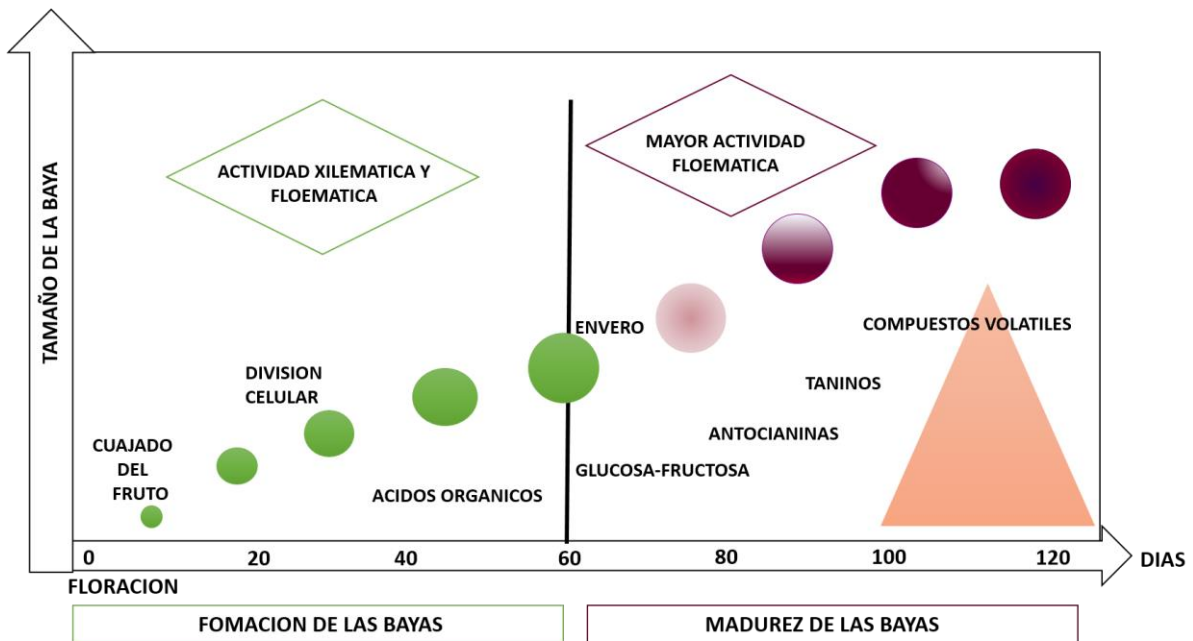


Figura 1.3. Formación, desarrollo y cambios de composición en las bayas (Adaptado de Coombe, 2001).

2.3.1 Metabolitos primarios

2.3.1.1 Ácidos orgánicos

Los ácidos tartárico y málico son los ácidos orgánicos más abundantes acumuladas en las células de las bayas y su concentración depende del estado de madurez, entre menos maduras se encuentren, mayor concentración de éstos ácidos tendrá y conforme la madurez avanza, tienden a disminuir. La relación entre ácido tartárico y málico en las bayas puede ser de 57 y 45 % respectivamente (Kliewer et al., 1967). La síntesis del ácido tartárico ocurre entre la floración y el envero, mientras que el ácido málico se produce en mayor cantidad antes del envero, aunque su

concentración se ve afectada por las temperaturas, ambos ácidos orgánicos tienden a disminuir cuando las temperaturas son superiores a 38 °C, sin embargo, su concentración también se ve afectada por efecto de estrés por sequía antes del envero (Martínez de Toda, 2019).

2.3.1.2 Azúcares

Por otro lado, los azúcares principalmente sacarosa, comienzan a acumularse en las bayas a partir del envero, esto mediante la acción de enzimas invertasas que permiten la acumulación en el fruto de la glucosa y fructosa con una relación de 5:1 durante la etapa de desarrollo de las bayas, mientras que al inicio de la madurez, la relación de éstos dos azúcares es prácticamente la misma (Hardy, 1968). La sacarosa es el disacárido o azúcar mayoritaria en las bayas y al inicio de la madurez. Tanto la glucosa, fructosa y la sacarosa, determinarán la concentración final de azúcares en las bayas, su dulzor y el potencial de alcohol de sus vinos (Zhang et al., 2013).

2.3.2 Metabolitos secundarios

2.3.2.1 Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios sintetizados como respuesta al estrés en diversas plantas y frutos como las bayas (Fig. 1.4), estos son responsables en parte de la calidad organoléptica del vino como astringencia, amargor y color (Antoniolli et al., 2015; Shi et al., 2018). En las bayas se encuentran distribuidos en mayor cantidad en hollejos y semillas, mientras que en la pulpa se encuentran en menor cantidad ya que éste almacena principalmente agua, azúcares y ácidos orgánicos (Vila et al., 2005). Los polifenoles son clasificados principalmente en flavonoides y no flavonoides (Garrido et al., 2019), en la primer clasificación, se encuentran las antocianinas, flavanoles y flavonoles, mientras que los no flavonoides son los ácidos fenólicos y estilbenos.

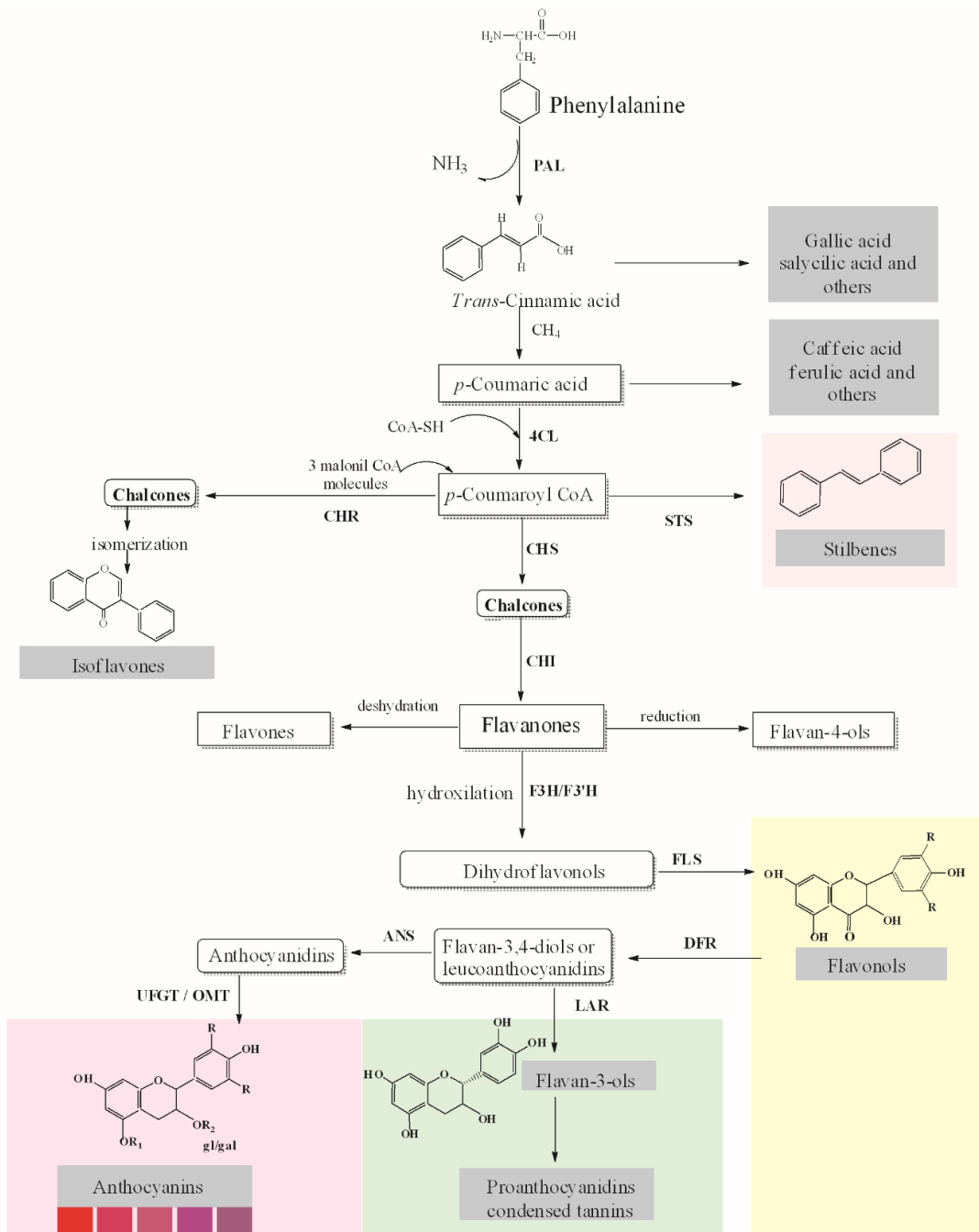


Figura 1.4. Síntesis de polifenoles a través de la vía fenilpropanoide

A) Flavonoides: antocianinas, flavanoles y flavonoles

Las antocianinas, flavanoles y flavonoles pertenecen al grupo de los flavonoides. Éstos compuestos, se les denomina flavonoides, debido a que son sintetizados a partir de la condensación de una molécula de *p*-coumaril CoA y tres moléculas de

malonil CoA por la enzima chalcona sintasa, dando origen a una estructura tipo C-6—C-3—C-6 conocido como chalconas. Las antocianinas se encuentran localizadas en mayor cantidad en el pericarpo de la baya y son liberados a través de la maceración para dar coloración a los mostos y vinos (Hernández-Hierro et al., 2014). Dentro de las antocianinas más frecuentes en las uvas y sus vinos en su forma glicosilada, diglucósido y coumariladas se encuentran la malvidina, delfinidina, peonidina, petunidina, cianidina y en algunos casos se ha identificado la pelargonidina (He et al., 2010; Xing et al., 2015), sin embargo la más abundante en las bayas tintoreras es la malvidina.

Los flavanoles se encuentran en mayor cantidad en los raspones, semillas y en menor proporción en el hollejo (Liang et al., 2012), sin embargo se extraen en mayor concentración de las semillas ya que no es muy común utilizar el raspón durante los proceso de vinificación, aunque eso pudiera diferir de alguna casa vinícola. Los flavanoles más abundantes en la baya son las catequinas y epicatequinas en forma monómera, mientras que las procianidinas B1 y B2 entre otras, se encuentran en su forma dímera, finalmente se encuentran en trímeros como los taninos, tanto las formas monómeras y dímeras otorgan el amargor, mientras que la forma trímera es la que atribuye a la astringencia (Hernández et al., 2016).

Los flavonoles son más abundantes en bayas de variedades blancas, sin embargo también están presentes en las variedades tintas en el pericarpo y en el mesocarpo de la baya. Los flavonoles más conocidos en bayas son la quercetina, kaempferol, mirecitina e isoranmetina (Quijada-Morín et al., 2015).

B) No flavonoides: ácidos fenólicos y estilbenos

Los compuestos fenólicos no flavonoides, a diferencia de los flavonoides, no son sintetizados a partir de chalconas, dentro de ésta clasificación se encuentran los estilbenos y los ácidos fenólicos (hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos). Los hidroxibenzoicos tienen en su estructura un ácido carboxílico y uno o más grupos

de grupos hidroxilo, unos ejemplos son la vainillina, el ácido siríngico y el ácido protocatecuico. Por otro lado, los ácidos hidroxicinámicos tienen mayor capacidad antioxidante que los hidroxibenzoicos debido a que en su estructura el grupo COOH es reemplazado por uno $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$, algunos ejemplos son el ácido *p*-coumárico, ferúlico, clorogénico y caféico (González-Neves et al., 2011). Los ácidos fenólicos se encuentran en mayor cantidad en el mesocarpo de las bayas, el precursor de todos es el ácido *trans*-cinámico, pues es el primero que se sintetiza como producto de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). Por lo tanto, también es el precursor de chalconas para síntesis de flavonoides.

Los estilbenos o fitoalexinas son otro de los grupos más estudiados que sintetiza la vid, el compuesto más abundante es el resveratrol (Wang *et al.*, 2010; Veremeichik *et al.*, 2017), sin embargo éste se encuentra en menor cantidad que las antocianinas, ya que tienen el mismo sustrato, solamente su diferencia radica en que para la síntesis de antocianinas se activan enzimas tipo chalcona sintasa (CHS) como respuesta al estrés abiótico, mientras que para la síntesis de estilbenos, se activan enzimas estilbeno sintasa (STS) como respuesta ante un estrés tipo biótico (Rajha et al., 2014).

2.3.2.2 Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles de los frutos, son metabolitos secundarios sintetizados a partir biomoléculas como ácidos grasos, aminoácidos o carbohidratos. Para la enología, la calidad de las bayas se ha determinado tanto por el contenido de azúcares, acidez, pH, contenido de polifenoles y por los compuestos volátiles (Maya-Meraz y Pérez Leal, 2019), sin embargo, dentro de la composición química de los volátiles, para la enología los compuestos volátiles de origen primario, son los que otorga el fruto, mismos que se pueden sintetizar de diversos precursores que se enumeran a continuación.

A) Compuestos volátiles a partir de lípidos

Los lípidos contenidos en los tejidos de las frutas intervienen en la síntesis de los compuestos volátiles a partir de las rutas β -oxidación y Lipooxigenasa. Ambas rutas, se encargan de sintetizar aldehídos, alcoholes y ésteres de tipo C6 de cadena lineal. Mientras que la β -oxidación utiliza como sustrato al ácido linoleico, la vía de la Lipooxigenasa además utiliza el ácido linolénico (Chen et al., 2004). Dentro de los ejemplos de compuestos volátiles C6 de cadena lineal son el hexanal, hexanol y hexil-acetato.

B) Compuestos volátiles a partir de aminoácidos

Los compuestos volátiles a partir de aminoácidos varían dependiendo del origen de aminoácidos utilizados como sustratos (Sanz et al., 1997). Comúnmente a partir de los aminoácidos leucina e isoleucina como precursores directos, existen síntesis de aldehídos, alcoholes y ésteres de cadena ramificada, esto mediante las reacciones enzimáticas de aminotransferasas que intervienen en la conversión de aminoácidos a α -cetoácidos, seguidos la formación conversión de α -cetoácidos a aldehídos por la acción de piruvato deshidrogenasa y a sus sucesivos compuestos de alcoholes y ésteres por conversión de enzimas como alcohol deshidrogenasa y alcohol aciltransferasa. Generalmente los compuestos volátiles de derivados de estos aminoácidos son descritos como aromas florales y afrutados como el 3-metil-1-butanol o 3-metil-butil-acetato.

Por otro lado, aminoácidos como la fenilalanina además de ser precursora de diversos compuestos fenólicos, también se ve involucrado en la síntesis de algunos compuestos volátiles de origen fenólico como la vainillina y ácidos caféico (González-Neves et al., 2011). Sin embargo la fenilalanina junto con el aminoácido metionina, se ha visto involucrado en la síntesis de metoxipirazinas, compuestos volátiles que en bayas de variedades blancas es bien aceptado, pero no en variedades tintas, ya que desarrolla aromas herbáceos (Robinson, 2006).

C) Compuestos volátiles a partir de carbohidratos

Existen compuestos volátiles derivados de moléculas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, productos tanto de glucólisis y del ciclo de Calvin-Benson, son las que intervienen en la síntesis de éste tipo de compuestos, ya que tanto piruvato y gliceraldehído-3-fosfato son precursoras para dar origen al isopentil pirofosfato e iniciar la vía isoprenoide a través de los plastos, pero no a través de la vía mevalonato (Wink, 2010). Sin embargo a través de los plastos el isopentil pirofosfato, es responsable de la síntesis de diversos compuestos volátiles terpenos, como geraniol, linalon, limoneno, farnesol entre otros.

2.4 Influencia del Calcio en la Fisiología de la Vid

La industria cementera más importante de Chihuahua México produce cerca de 5 mil toneladas de cemento mensuales, durante su producción, se extrae de manera de residuo ya que es un subproducto en forma de polvo llamado carbonato de calcio (CaCO_3), mismo que se recoge y no se le da valor comercial (Flores-Córdova et al., 2018). Por lo tanto se ha propuesto que los residuos de CaCO_3 de la industria cementera pueden ser utilizados como fuente de calcio en diversos cultivos agrícolas, entre ellos la vid.

El calcio (Ca) juega un papel clave como mensajero secundario ante el estrés biótico y abiótico con diversos mecanismos para la adaptación de las plantas y respuesta de fitohormonas (Ranty et al., 2016). Éste elemento, regula tres grupos de proteínas dependientes del Ca, proteínas como las Calmodulinas (CAMs), Calcineurinas (CBLs) y quinasas dependientes del calcio (CDPKs) trabajan como sensores y transmisoras de diversas vías de señalización como respuesta ante situaciones de estrés como salinidad o sequía en suelos e induciendo expresiones genéticas para la síntesis o activación de fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), además del cierre de estomas como mecanismo de defensa ante una deshidratación de la planta (Yang et al., 2012; Zou et al., 2015).

2.4.1 El calcio en el cierre estomático

Las células guarda que conforman los estomas, regulan su apertura para intercambio de gases y realización de la fotosíntesis, sin embargo, los mecanismos de apertura de éstos se ven comprometidos ante condiciones ambientales desfavorables para la planta e induciendo su cierre (Reyes et al., 2013). El cierre de estomas se induce por el incremento de la concentración de iones calcio dentro de las células guarda, ya que provoca la disminución de concentración de los iones potasio que las mantienen abiertas y turgentes, sin embargo, en la actualidad, se ha encontrado que el cierre de estomas se ve inducido por la activación de proteínas CAMs que permiten la despolarización membranal para la salida de iones potasio y mayor concentración de iones calcio en células guarda (Yang et al., 2012).

2.4.2 Proteínas dependientes del calcio en la síntesis del ácido abscísico, cierre estomático y otras acciones fisiológicas en las plantas

Actualmente se ha encontrado que las proteínas dependientes del calcio CBLs activan expresiones genéticas como el gen *ZmCBL9* que está relacionado con la síntesis de ABA bajo condiciones de estrés por sequía o salinidad en plantas *Arabidopsis* (Pandey et al., 2004). Sin embargo, se ha encontrado que cerca de 34 tipos de proteínas CDPKs están envueltas en las respuestas ante el estrés biótico y abiótico de las plantas, mismas que actúan como reguladores tanto de manera positiva como negativa con el ABA, por ejemplo la CPK10 regulan la acción de iones calcio y concentración de ABA en los estomas ante un estrés por sequía, mientras que CPK8 regula la homeostasis para evitar la deshidratación de la planta (Zou et al., 2015).

Finalmente, además que el ion calcio está involucrado en la síntesis y regulación de ABA a través de sus grupos de proteínas, también se ha demostrado que iones calcio, proteínas CAMs, así como proteínas quinasas y fosfatasas tienen relación con la síntesis de antocianinas en *Vitis vinifera* (Vitrac et al., 1999), además de la acumulación de iones calcio en *Vitis vinifera* que induce la acumulación de jasmonatos y fitoalexinas (Faurie et al., 2009).

2.4.3 El uso del calcio en la calidad de frutas y hortalizas

El Ca ha sido utilizado en la agricultura durante mucho tiempo y en algunos frutos se ha clasificado como un macro elemento, el cloruro de calcio (CaCl_2), ha sido utilizado una de las fuentes más utilizada sobre todo durante la cosecha para incrementar la calidad de sus frutos, por ejemplo se ha visto incremento de antocianinas como la cianidina tanto en fresas como en cerezas (Wang et al., 2014; Xu et al., 2014), mientras que se ha observado el incremento de fenoles totales en uvas de mesa (Al-Qurashi & Awad, 2013) y en frutos de olivo, donde utilizaron carbonatos de calcio (CaCO_3) como fuente de calcio en los olivos (Squeo et al., 2016). Por lo tanto ésta fuente de Ca, ha sido muy prometedora en la utilización e incrementos en frutos de calidad ya que es una fuente de Ca, segura para el ambiente.

2.5 Influencia del Ácido Abscísico Sobre la Síntesis de Metabolitos Importantes Para la Calidad de la Baya.

El ácido abscísico es una fitohormona de origen terpeno que se sintetiza a partir de la vía carotenoides o a partir del ácido mevalónico. A partir de la vía carotenoides su precursor es la 9'-cis-neoxantina y la 9-cis-violaxantina metabolizada por enzimas de la familia 9-cis-epoxycarotenoides-dioxigenasas. Se ha demostrado que el catabolismo del ABA es mediante genes CYP73A que codifican la presencia de ABA-8'-hidroxilasas (Nambara & Marion-Poll, 2005).

2.5.1 El ácido abscísico y proteínas p450 sobre la ruta fenilpropanoide

Existe un complejo proteico de monooxigenasas con grupo hemo conocidos como citocromo p450 o CYP450 que se activan en presencia de radiación UV. De los cuales se ha logrado identificar cerca de 45 familias (González-Mendoza, 2007). De las 45 familias se dividen en dos grupos, las p450 tipo A y las p450 no tipo A. Las p450 no tipo A, se encargan del catabolismo de la fitohormona ABA, donde las CYP707A codifican a la enzima clave ABA-8' hidroxilasa y obtener ácidos tanto faseico como dihidrofaseico que regulan otro tipo de respuestas fisiológicas como

contrarias a la función del ácido abscísico, pues se ha demostrado que el ácido salicílico evita el cierre estomático (Sharkey & Rashke, 1980; Saito et al., 2004).

Por otro lado, las p450 tipo A, están más relacionadas con el metabolismo oxidante de compuestos como la L-Fenilalanina o la L-tirosina, la L-fenilalanina es el aminoácido sustrato para la vía fenilpropanoide, sin embargo en parte la actividad o inicio de la vía fenilpropanoide, responde a mecanismos de respuesta para la protección de las plantas ante la luz UV, además de las subsecuentes respuestas fisiológicas inducidas a través de genes CYP73A5, con la síntesis de metabolitos secundarios como chalconas, flavonoides y fitoalexinas.

2.5.2 El ácido abscísico sobre la expresión de compuestos volátiles

El ABA aplicado de manera exógena en vid, permite la expresión del gen *VvPG* (Jia et al., 2017). Este gen es el que permite la expresión de enzimas poligalacturonasas, enzimas hidrolíticas sobre enlaces (α 1-4) ocurriendo una despolimerización de pectinas, aunado a la expresión de enzimas con actividad hemicelulosas como las β-galactosidasas, degradan la pared celular e inducen su ablandamiento (Romero-Casales et al., 2008). Cuando ocurre el ablandamiento de paredes celulares, las membranas están más expuestas, y por lo tanto los sustratos para enzimas lipasas también. Las lipasas cataboliza los lípidos, dejando libres ácidos grasos. A partir del catabolismo de los ácidos grasos vía Lipooxigenasa o β-oxidación, se sintetizan grandes grupos de aldehídos, alcoholes y ésteres como compuestos volátiles, mientras que a través del metabolismo de carbohidratos y lípidos, se sintetizan compuestos volátiles de origen terpeno a través de la vía mevalonato, los carbohidratos hidrolizados entran a glucólisis dejando moléculas libres de acetil CoA, dos moléculas de acetil CoA, son utilizadas para iniciar la vía ácido mevalónico mediante diversas reacciones enzimáticas para sintetizar moléculas monoterpenos como el geraniol y linalol (Maya-Meraz y Pérez-Leal, 2019).

2.5.3 El uso de ácido abscísico sobre la calidad de bayas y vinos

El uso del ABA en *Vitis vinifera* ha tomado gran auge la última década sobre el incremento de metabolitos que inducen la calidad en las bayas y el vino. Se ha demostrado que el uso de ABA durante precosecha, incrementan el contenido de antocianinas, principalmente en variedades Malbec, Crimson seedless, Beihong, Gamay, Cabernet Sauvignon, entre otras (Coelho de Souza-Leaño et al., 2014; Alonso et al., 2016; Ju et al., 2016; Wang et al., 2016; Martins et al., 2018), sin embargo el incremento de flavanoles o resveratrol, no ha sido igual de satisfactorio como las antocianinas, además de no mostrar incremento en el rendimiento de las bayas o un incremento de contenido de azúcares en todos los trabajos y hasta la fecha no parece estar del todo claro si el incremento de antocianinas y de azúcares encontradas se deba a una reducción del peso o tamaño de los frutos.

2.6 Influencia del Manejo del Dosel Sobre el Metabolismo Primario y Secundario de la Vid

Existen diferentes manejos sobre el dosel o la parte área de la vid que se aplican con la finalidad de generar microclimas, balancear carga entre frutos y hojas o incrementar la cantidad de fotosintatos en la parte área del frutal (Viguié et al., 2014). Técnicas como de raleo de hoja y de fruto, ocasionan incremento a la exposición de la luz y por lo tanto la síntesis de diversos metabolitos precursores de carbohidratos, lípidos y otras moléculas involucradas en gran medida a la calidad de uva y sus vinos (Song et al., 2015). Sin embargo también existen otras técnicas como los anillados que consisten en hacer una incisión o corte al rededor del tronco o brazo de la vid, para bloquear el flujo floemático hacia la parte inferior del frutal (Ferrara et al., 2014; Soltekin et al., 2015) esto con el propósito de incrementar la cantidad de fotosintatos en la parte área de la vid y que sea aprovechado por los frutos para la elaboración principalmente de azúcares y otros metabolitos. A pesar de que existe información de los efectos que las diferentes técnicas sobre el dosel tienen sobre los frutos, es interesante evaluar más a cerca de uno de los atributos de calidad en uvas y vino, como los compuestos volátiles que solamente se han estudiado en condiciones de raleos basales (Gatti et al., 2012; Nogales-Bueno et

al., 2013; Palliotti et al., 2013; Zhang et al., 2017), pero no se presenta información del anillado sobre este parámetro e calidad.

2.7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Posible elucidación del efecto del calcio sobre el ácido abscísico, la vía fenilpropanoide y síntesis de compuestos volátiles en *Vitis vinifera*, además de elucidar posibles efectos positivos sobre los compuestos volátiles con técnicas de manejos sobre el dosel de la vid, como los anillados o combinación de anillado con raleos. Finalmente, con la revisión realizada, aunado a los resultados de la investigación, se tiene propuesto un esquema general de los efectos que puede desencadenar los iones calcio para la síntesis de polifenoles y la síntesis de compuestos volátiles (Fig. 1.5). Con todo esto, proponiendo como nueva generación de conocimiento que el calcio puede dominar diversas respuestas fisiológicas y genéticas en algunas plantas, para la síntesis de metabolitos secundarios como los polifenoles, además de que también las técnicas sobre el dosel de la vid, impactan en los compuestos volátiles, todo con el propósito de incrementar la calidad de las bayas y sus vinos.

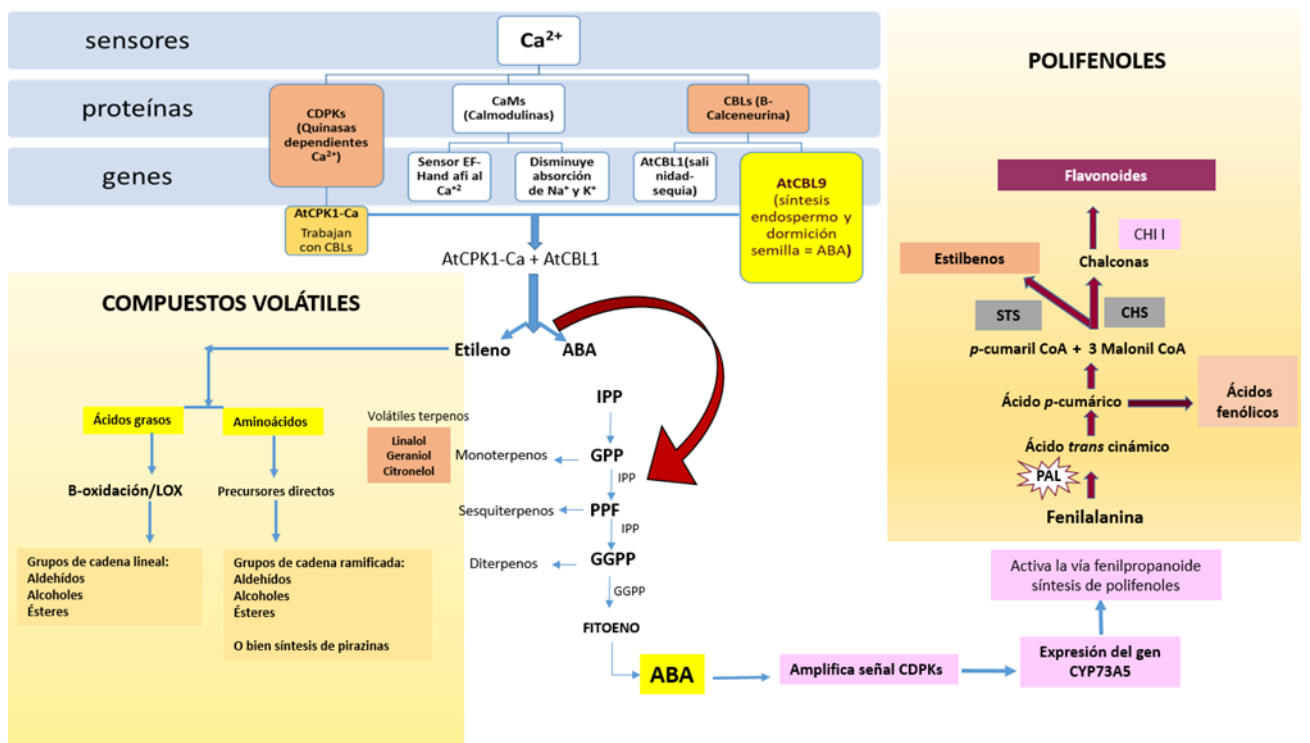


Figura 1.5. Esquema general del posible efecto del calcio sobre el ácido abscísico, la vía fenilpropanoide y la síntesis de compuestos volátiles.

2.8 LITERATURA CITADA

- Alonso, R., Berli, F. J., Fontana, A., Piccoli, P., & Bottini, R. (2016.). Malbec grape (*Vitis vinifera* L.) responses to the environment berry phenolics as influenced by solar uv-b, water deficit and sprayed abscisic acid. *Plant Physiology and Biochemistry.*, *109*, 84-90.
- Al-Qurashi, A., & Awad, A. (2013.). Effect of pre-harvest calcium chloride and ethanol spray on quality of 'El-Bayadi' table grapes during storage. *Vitis.*, *52*(2), 61-67.
- Antionioli, A., Fontana, A., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry.*, *178*, 172-178.
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylos, A., Lin, Z., & Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology.*, *136*, 2641-2651.
- Coelho de Souza-Leaño, P., Coelho-Lima, M., Dias-Costa, J., & Gomes-da Trindade, D. (2014). Abscisic acid and ethephon for improving red color and quality of crimson seedless grapes grown in a tropical region. *American Journal of Enology and Viticulture.*, *66*, 37-45.
- Conde, C. S. (2007.). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. . *Global Science Books.*, *1*(1), 1-22.
- Coombe, B. (2001.). Ripening berries-a critical issue. *Australian Viticulture.*, *5*, 28-33.
- Faurie, b., Cluzet, S., & Mérillon, J. (2009.). Implications of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology.*, *17*, 1863-1877.
- Ferrara, G., Mazzeo, A., Netti, G., Pacucci, C., Matarrese, A., Cafagna, I., . . . Vezzoso, M. G. (2014.). Girdling, gibberlic acid, and forchlorfenuron: Effects on yield, quality, and metabolic profile of table grape cv. Italia. *American Journal of Enology and Viticulture.*, *65*(3), 381-387.
- Flores-Córdova, M., Soto-Parra, J., Salas-Salazar, N., Sánchez-Chávez, E., & Piña-Ramírez, F. (2018.). Efecto del subproducto industrial CaCO₃ en los atributos de calidad, contenido fenólico y capacidad antioxidante de manzanas cvs Golden Delicious y

Top Red. *Revista de Investigación de la Universidad de la Salle Bajío Nova Scientia.*, 10(1), 64-82.

- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols – a chemical perspective. *Food Research International.*, 54, 1844-1858.
- Gatti, M., Bernizzoni, F., Civardi, S., & S., P. (2012.). Effects of clusters thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *American Journal of Enology and viticulture.*, 63(3), 325-332.
- Gil, G., & Pszczolkowski, P. (01 de Mayo de 2015). *Viticultura: fundamentos para optimizar producción y calidad* (Segunda ed., Vol. 1). (G. Gil, Ed.) Santiago, Macul, Chile: Ediciones UC. Recuperado el 10 de Septiembre de 2019, de Viticultura: Fundamentos para optimizar producción y calidad: <https://books.google.com.mx/books?id=4myBDwAAQBAJ&pg=PA108&dq=fenologia+vid&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjs9ZC4o7jkAhVCKKwKHX1qDfUQ6AEIMjAC#v=onepage&q=fenologia%20vid&f=false>
- González-Mendoza, D. (2007.). El complejo enzimático citocromo p450 en las plantas. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 23(4), 177-173.
- González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., & Ferrer, M. (2011). Potencial polifenólico de la uva: índices propuestos y posibles aplicaciones. *Comunicata Scientiae.*, 2(2), 57-69.
- Grenan, S., Renault-Spilmont, A., & Boursiquot, J. (2007). Syrah decline in France: historical background and first approaches. Proceedings of the Syrah vine health symposium. *University of California Agriculture & Natural Resources.*, 1-25. Obtenido de <http://www.ucanr.org/sites/intvit/files/24497.pdf#page=8>
- Hardy, P. (1968). Metabolism of sugars and organic acids in immature grape berries. *Plant physiology.*, 43, 224-228.
- He, F., He, J., Pan, Q., & Duan, C. (2010.). Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and wine Research.*(16), 464-468.
- Hernández, M., Song, S., & Menéndez, C. (2016.). Influence of genetic and vintage factors in flavan-3-ols composition of grape seeds of a segregating *Vitis vinifera* population. 97, 236-243.

- Hidalgo-Togores, J. (2011). Capítulo II. Morfología, maduración y composición del racimo. En J. Hidalgo-Togores, *Tratado de enología* (págs. 57-133). Madrid, España: Mundi-Prensa. Recuperado el 15 de Agosto de 2019, de <https://books.google.com.mx/books?id=CxtfAwAAQBAJ&pg=PA57&dq=vitis+vinifera+morfologia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjGpYza1rPkAhVBX60KHW8XDVUQ6AEIQzAE#v=onepage&q=vitis%20vinifera%20morfologia&f=false>
- Huglin, P. (1986). *Biologie et écolgie de la vigne*. . Colmar, France.: Editions Payot Lausanne Suisse.
- Jia, H., Wang, S., L. H., Satio, T., Ampa, K., Todoroki, Y., & Kondo, S. (2017.). Effects of abscisic acid agonist or antagonist application on aroma volatiles and anthocyanins biosynthesis in grapes berries. *The journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(4), 392-399.
- Jones, G., & Davis, R. (2000.). Climate influences on grapevine phenology, grape composition and wine production and quality for Bordeaux, France. *American Journal of Enology and Viticulture.*, 51(3), 249-251.
- Ju, Y., Liu, M., Zhao, H., Meng, J., & Fang, Y. (2016). Effect of exogenous abscisic acid and methyl jasmonate on anthocyanin composition, fatty acids, and volatile compounds of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape berries. *Molecules.*, 21, 2-15.
- Kliwer, W., Howart, L., & Omori, M. (1967.). Concentrations of tartaric acid and malic acids and their salts in *Vitis vinifera* grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 18, 42-54.
- Liang, Z., Yang, Y., Cheng, L., & and Zhong, G. (2012). Characterization of polyphenolic metabolites in the seed of *Vitis* germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 60, 1291-1299.
- Martínez de Toda, F. (2019). *Técnicas vitícolas frente al cambio climático*. Madrid España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Martins, V., García, A., Costa, C., Sottomayor, M., & Gerós, H. (2018). Calcium- and hormone-driven regulation of secondary metabolism and cell wall enzymes in grape berry cells. *Journal of Plant Physiology.*, 231, 57-67.
- Maya-Meraz, I., & Pérez-Leal, R. (2019). ¿Qué relación existe entre la calidad aromática del vino y la bioquímica de la vid?. *Tecnociencia Chihuahua.*, 12(3), 134-142.

- Mullins, M. G., Bouquet, A., & Williams, L. E. (1992). *Biology of the grapevine*. . Cambridge Great Britain : Cambridge University Press.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, *56*, 165-185.
- Nogales-Bueno J, H.-H. J.-P. (2013). Nogales-Bueno J, Hernández-Hierro JM, Rodríguez-PuDeterminación of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skin in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach. *Food Chemistry*, *221*, 1685-1690.
- OIV. (13 de Julio de 2019). *Organización Internacional de la Viña y el Vino*. Obtenido de El balance trata sobre la superficie plantada de viñedos, la producción de uva, la producción y el consumo de vino, los volúmenes de exportación e importación de vino: <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/balance-2019-de-la-oiv-sobre-la-situacion-vitivinicola-mundial>
- Pallioti, A., Panara, F., Silvestrini, O., Lanari, V., Sabbatini, P., Howell, G., . . . Poni, S. (2013). Influence of mechanical postveraison leaf removal apical to cluster zone on delay of fruit ripening in Sangiovese (*Vitis vinifera* L.) grapevines. *Australian Society of Viticulture and Oenology.*, *19*, 369-377.
- Pandey, K., Cheong, Y., Kim, K., Grant, J., Li, L., H. W., . . . Luan, S. (2004). The calcium sensor calcineurins B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, *16*, 1912-1924.
- Portu, J., López, R., Santamaría, P., & Garde-Cerdán, T. (2017). Elicitation with methyl jasmonate supported by precursors feeding with phenylalanine: effect on Garnacha grape phenolic content. *Journal of Food Chemistry*, *237*, 416-422.
- Quijada-Morín, N., Hernández-Hierro, J., Rivas-Gonzalo, J., & Escribano-Bailón, M. (2015). Extractability of low molecular mass flavanols and flavonols from red grape skin. Relationship to cell wall composition at different ripeness stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 7654-7662.
- Rajha, H., Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobieb, E., Maroun, R., & G., L. N. (2014). Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid

- ratio, particle size, time, temperature, and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Science*, 5, 397-409.
- Ranty, B., Aldon, D., Cotelle, V., Galaud, J., Thuleau, P., & Mazars, C. (2016). Calcium sensors as key hub in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-7.
- Reyes, A. J., J.G., Á.-H., & Fernández, J. (2013). Papel del calcio en la apertura y el cierre estomático y sus interacciones con solutos compatibles, una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1), 111-122.
- Robinson, J. (2006). *The oxford companion to wine* (Tercera ed.). Oxford, USA.: Oxford University Press.
- Romero-Casales, M. (23 de Mayo de 2008). Tesis Doctoral. *Extracción de compuestos fenólicos de la uva alvino. Papel de enzimas de maceración*. Universidad de la Murcia, España.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., & Mizutani, M. (2004). Arabidopsis CYP707As encode abscisic acid 8' hydroxylase a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology*, 134, 1439-1449.
- Sanz, C. O. (1997). Aroma biochemistry of fruits and vegetables. En F. Tomas-Barberan, & R. Robins, *Phytochemistry of Fruits and Vegetables*. (págs. 125-155). Clarendon. Oxford.: Oxford University Press.
- Sharkey, T. (1980). Effects of phaseic acid and dihydrophaseic acid on stomata and the photosynthetic apparatus. *Plant Physiology*, 65(2), 291-297.
- Shi, P., Song, C., Chen, H., Duan, B., Zhang, Z., & Meng, J. (2018). Foliar application of iron promote flavonoids accumulation in grape berry of *Vitis vinifera* cv. Merlot grown in the iron deficiency soil. *Food Chemistry*, 253, 164-170.
- Shultz, H., & Jones, G. (2010). Climate induced historic and future changes in viticulture. *Journal of Wine Research*, 21, 137-145.
- Soltekin, O., Teker, T., Erdem, A., Kacar, E., & Altindisli, A. (2015). Response of 'Red Globe' (*Vitis vinifera* L.) to cane girdling. *BIO Web of Conferences*, 5, 1-4.
- Song, J., Smart, R., Wang, R., Wang, H., Damberg, B., Sparrow, A., & Qian, M. (2015). Effect of grape bunch sunlight exposure and uv radiation on phenolics and volatile composition of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir wine. *Food Chemistry*, 17, 421-431.

- Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso, V., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europea* L. cv. Coratina). *Food Chemistry*, 209, 65-71.
- Veremeichik, G., Grigorchuk, V., Shkryl, Y., Bulgakov, D., Silantieva, S., & Bulgakov, V. (2017). Induction of resveratrol biosynthesis in *Vitis amurensis* cell by heterologous expression of the *Arabidopsis* constitutively activate, Ca²⁺ -dependent form of the AtCPK1 gene. *Process Biochemistry*, 54, 144-155.
- Viguié, V., Lecocq, F., & Touzard, J. (2014). Viticulture and adaptation to climate change. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.*, 55-60. Obtenido de <https://hal-enpc.archives-ouvertes.fr/hal-00982086/document>
- Vila, H., & Catania, C. (2005). Influencia del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec de argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo*, 1, 97-111.
- Villa, P. (2018). *Cultivar la vid*. Editorial de Vecchi S. A. U. Recuperado el 15 de Agosto de 2019, de <https://books.google.com.mx/books?id=EA9dDwAAQBAJ&pg=PT20&dq=el+tronco+de+la+vid&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjbtIC4rbjkAhUIUa0KHQSyBOYQ6AEILjAB#v=onepage&q=el%20tronco%20de%20la%20vid&f=false>
- Vishwakarama, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R., . . . Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8(161), 1-12.
- Vitrac, X., Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G., & Mérillon, J. (1999). Sugar sensing and Ca²⁺- calmodulin requeriment in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry*, 55, 659-665.
- Wang, J., Wang, S., Liu, G., Edwards, E. J., Duan, W., Li, S., & Wang, L. (2016). The synthesis and accumulation of resveratrol are associated with veraison and abscisic acid concentration in Beihong (*Vitis vinifera* × *Vitis amurensis*) berry skin. *Frontiers in Plant Science.*, 1605, 1-11.
- Wang, Y., Xie, X., & Long, L. (2014). The effect of postharvest calcium application in hydro-cooling water on tissue calcium content, biochemical changes, and quality attributes of sweet cherry fruit. *Food Chemistry*, 23-30.

- Wink, M. (2010). Chapter 1. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. En M. Wink, *Annual Plants Reviews* (Second Edition ed., Vol. 40, págs. 1-19). Germany : Wiley Blackwell. doi: Doi: 10.1002/9781444320503.ch1.
- Xing, R. R., He, F., Xiao, H., Duan, C. Q., & Pan, Q. (2015). Accumulation pattern of flavonoids in Cabernet Sauvignon grapes grown in a low-altitude and high altitude region. *South African Journal of Enology and Viticulture.*, 36, 32-43.
- Xu, W., Peng, H., Yang, T., Whitaker, B., Huang, L., Sun, J., & Chen, P. (2014). Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry.*, 82, 289-298.
- Yang, T., Peng, H., Whitaker, B., & Conway, W. (2012). Characterization of calcium/calmodulin-regulated SR/CAMTA gene family during tomato fruit development and ripening. *Plant Biology*, 12(19), 2-13.
- Zhan, W., León, C., Feil, R., Lunn, J., Delrot, S., & Gomés, E. (2013). Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1345-1355.
- Zhang, P., Wu, X., Needs, S., Liu, D., Fuentes, S., & Howell, K. (2017). The influence of apical and basal defoliation on the canopy structure and biochemical composition of *Vitis vinifera* cv. Shiraz grapes and wine. *Frontiers in Chemistry*, 5, 1-48.
- Zou, J., Li, X., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W., Song, L., Wu, W. (2015). Arabidopsis calcium-dependent protein kinases8 and catalase3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell.*, 5, 1445-1460.

**CAPÍTULO II. EFECTO DE RESIDUOS DE CARBONATO DE CALCIO DE
INDUSTRIAS CEMENTERAS SOBRE COMPOSICIÓN FENÓLICA Y EL
RENDIMIENTO EN UVAS SHIRAZ**

Effect of Calcium Carbonate Residues from Cement Industries on the Phenolic Composition and Yield of Shiraz Grapes

I.O. Maya-Meraz¹, R. Pérez-Leal^{1*}, J.J. Ornelas-Paz², J.L. Jacobo-Cuellar³, M.J. Rodríguez-Roque¹, R.M. Yañez-Muñoz¹, A. Cabello-Pasini^{1*}

(1) Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Área de Fisiología Vegetal y Frutales de Clima Templado, Chih., Chihuahua, México

(2) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrientes, Cuahutlán, Chih., México

(3) Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Ensenada, Baja California, México

Submitted publication: April 2019

Accepted for publication: October 2019

Key words: abiotic stress, biotic stress, calcium, grapevines, polyphenols, ripening

Phenolic compounds are secondary metabolites synthesised in response to biotic or abiotic stress in plants. This stress-induced increase in phenolic compound concentrations is generally activated by internal levels of abscisic acid (ABA). The exogenous application of ABA or calcium chloride on grapevines is also known to increase grape yield and alter the phenolic composition of grapes. Residues of cement industries such as calcium carbonates (CaCO₃) are a safe environmental source of calcium that could be used to induce the synthesis of phenolic compounds and act as a yield promoter in grapes and other crops. Consequently, the objective of this study was to evaluate the effect of cement industries' CaCO₃ residues (CaCO₃R) on the yield and concentration of phenolic compounds in Shiraz grapes. Thirteen phenolic compounds were identified and quantified by HPLC-DAD. Malvidin-3-O-glucoside was the major anthocyanin found in Shiraz grapes, and its concentration increased by more than 200% in CaCO₃R-treated vines. Similarly, the concentration of cinnamic acid, the main precursor of phenolic compounds, increased by more than 900% in grapes treated with CaCO₃ residues at harvest time. Finally, catechin, epicatechin and procyanidin B1 and B2 increased significantly at harvest time in CaCO₃R-treated grapes relative to the controls. In general, it was found that foliar application of CaCO₃ residues from the cement industry at véraison induced an increase in yield, and in the concentration and composition of phenolic compounds in grapes.

INTRODUCTION

Calcium (Ca) is a secondary messenger that triggers environmental adaptive mechanisms in plants as a response to biotic and abiotic stress (Ranty *et al.*, 2016). Biotic stress, resulting from the presence of insects or pathogens in grapevines, for example, triggers jasmonic acid synthesis in the tendrils. Similarly, abiotic stress due to exposure to extreme cold, high UV-B radiation, high levels of metal in the soil, high salinity or drought activates abscisic acid (ABA) synthesis in the leaves and results in stomatal closure (Tassinari *et al.*, 2015; Vishwakarma *et al.*, 2017).

It has been demonstrated that Ca regulates at least three groups of Ca-dependent proteins in *Arabidopsis* and other plants. Proteins such as calmodulins (CMs), calcineurin B-like proteins (CBLs) and calcium-dependent protein kinases (CDPKs) can play a critical role in cellular signalling cascades. These Ca-dependent proteins operate as sensors and signal transmitters in response to salinity or drought stress, and can induce gene expression that activates ABA

synthesis and stomatal closure (Yang *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2015). In vineyards, regulated deficit irrigation is a common practice to induce drought stress in the plant at the onset of ripening or véraison in order to stimulate ABA synthesis and enhance pigment accumulation. However, this irrigation practice commonly reduces grape yield at harvest time (De-la-Hera-Ots *et al.*, 2005; Kyriakou *et al.*, 2017). Recent studies show that foliar ABA application enhances pigment concentration in tomatoes, strawberries, litchis and grapes (Singh *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016). It was demonstrated that these ABA applications induce the expression of structural genes and transcription factor genes that activate the phenylpropanoid pathway and anthocyanin synthesis through their effect on the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chalcone synthase (CHS) enzymes (Ferrandino & Lovisolo, 2014; Koyama *et al.*, 2014; Villalobos-González *et al.*, 2016). However, exogenous applications in commercial farming

*Corresponding author: E-mail address: acabello@uaeh.edu.mx; rleal@uaeh.mx

Acknowledgments: We would like to thank the Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrientes of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. of Cd. Cuahutlán, Mexico. The CaCO₃ residues were supplied by Grupo Cementos Chihuahua. This research was partially supported by CONACYT, Mexico

From: **Prof Leon M.T. Dicks** <LMTD@sun.ac.za>
Date: Mon, Oct 7, 2019 at 3:31 AM
Subject: [sajev 3517] Editor Decision
To: Dr. Alejandro Cabello-Pasini <acabello@uabc.edu.mx>

Dr. Alejandro Cabello-Pasini:

We have reached a decision regarding your submission to South African Journal of Enology and Viticulture, "Effect of Calcium Carbonate on the Phenolic Composition and Yield of Shiraz Grapes".

Our decision is to: Accept Submission

Prof Leon M.T. Dicks
Stellenbosch University
Phone +27-21-8085849
LMTD@sun.ac.za

Prof Leon M.T. Dicks
Chief Editor: SAJEV
Distinguished Professor in Microbiology
Department of Microbiology
Stellenbosch University
Private Bag X1
7602 Matieland (Stellenbosch)
South Africa
E-mail: LMTD@sun.ac.za

South African Journal of Enology and Viticulture

<http://www.journals.ac.za/index.php/sajev>

The integrity and confidentiality of this e-mail is governed by these terms / Die integriteit en vertroulikheid van hierdie e-pos word deur die volgende bepalings gereël. <http://www.sun.ac.za/emaildisclaimer>

RESUMEN

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados en respuesta al estrés biótico o abiótico en las plantas. Este aumento inducido por el estrés en las concentraciones de compuestos fenólicos generalmente se activa por niveles internos de ácido abscísico (ABA). También se sabe que la aplicación exógena de ABA o cloruro de calcio (CaCl_2) en las vides aumenta el rendimiento de la uva y altera la composición fenólica en las uvas. Los residuos de las industrias cementeras como los carbonatos de calcio (CaCO_3) son una fuente ambiental segura de calcio que podría usarse para inducir la síntesis de compuestos fenólicos y actuar como un promotor del rendimiento en uvas y otros cultivos. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de CaCO_3 sobre el rendimiento y la concentración de compuestos fenólicos en las uvas Shiraz. Trece compuestos fenólicos fueron identificados y cuantificados por HPLC-DAD. La malvidina-3-O-glucósido fue la principal antocianina encontrada en las uvas Shiraz, y su concentración aumentó en más del 200% en las vides tratadas con CaCO_3 . Del mismo modo, la concentración de ácido cinámico, el principal precursor de los compuestos fenólicos, aumentó en más del 900% en las uvas tratadas con CaCO_3 en el momento de la cosecha. Finalmente, la catequina, la epicatequina y la procianidina B1 y B2 aumentaron significativamente al momento de la cosecha en las uvas tratadas con CaCO_3 en relación con los controles. En general, se encontró que la aplicación foliar de CaCO_3 de la industria del cemento en el envero indujo un aumento en el rendimiento, y la concentración y composición de compuestos fenólicos en las uvas.

ABSTRACT

Phenolic compounds are secondary metabolites synthesized in response to biotic or abiotic stress in plants. This stress-induced increase in phenolic compound concentrations is generally activated by internal levels of abscisic acid (ABA). Exogenous application of ABA or calcium chloride (CaCl_2) on grapevines, are also known to increase grape yield and alter the phenolic composition in grapes. Residues of cement industries such as calcium carbonates (CaCO_3) are a safe environmental source of calcium that could be used to induce synthesis of phenolic compounds and act as a yield promoter in grapes and other crops. Consequently, the objective of this study was to evaluate the effect of CaCO_3 on yield and the concentration of phenolic compounds in Shiraz grapes. Thirteen phenolic compounds were identified and quantified by HPLC-DAD. Malvidin-3-O-glucoside was the major anthocyanin found in Shiraz grapes, and its concentration increased by more than 200% in CaCO_3 -treated vines. Similarly, the concentration of cinnamic acid, the main precursor of phenolic compounds, increased by more than 900% in CaCO_3 -treated grapes at harvest time. Finally catechin, epicatechin and procyanidin B1 and B2 increased significantly at harvest time in CaCO_3 -treated grapes relative to controls. In general, it was found that foliar application of CaCO_3 from the cement industry at veraison induced an increase in yield, and concentration and composition of phenolic compounds in grapes.

2.1 INTRODUCCIÓN

Calcium (Ca) is a secondary messenger that triggers environmental adaptive mechanisms in plants as a response to biotic and abiotic stress (Ranty *et al.*, 2016). The former, resulting from the presence of insects or pathogens in grapevines, for example, triggers jasmonic acid synthesis in tendrils. Similarly, abiotic stress due to exposure to extreme cold conditions, high UV-B radiation, high metal levels in the soil, high salinity or drought, activates abscisic acid (ABA) synthesis in leaves and results in stomatal closure (Taurino *et al.*, 2015; Vishwakamara *et al.*, 2017).

It has been demonstrated that Ca regulates at least three groups of Ca-dependent proteins in *Arabidopsis* and other plants. Proteins such as calmodulins (CMs), calcineurin B-like proteins (CBLs) and Calcium-dependent protein kinases (CDPKs) can play a critical role in cellular signaling cascades. These Ca-dependent proteins operate as sensors and signal transmitters in response to salinity or drought stress, and can induce gene expression that activates ABA synthesis and stomatal closure (Yang *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2015). In vineyards, regulated-deficit irrigation is a common practice to induce drought stress in the plant at the onset of ripening or veraison to stimulate ABA synthesis and enhance pigment accumulation. However, this irrigation practice commonly reduces grape yield at harvest time (De-la-Hera-Orts *et al.*, 2005; Kyraleou *et al.*, 2017). Recent studies show that foliar ABA application enhances pigment concentration in tomatoes, strawberries, litchis and grapes (Singh *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016). It was demonstrated that these ABA applications induce the expression of structural genes and transcription factor genes that activate the phenylpropanoid pathway and anthocyanin synthesis through their effect on the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and chalcone synthase (CHS) enzymes (Ferrandino & Lovisolo, 2014; Koyama *et al.*, 2014; Villalobos-González *et al.*, 2016). However, exogenous applications in commercial farming are not economically feasible due to the high cost of ABA. Consequently, other studies have explored the use of calcium chloride (CaCl₂) to increase the synthesis of total phenolic compounds and anthocyanins in plants (Al-Qurashi & Awad, 2013; Xu *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2018). It has been shown that the use of foliar CaCO₃ applications as a source of Ca increases the total

content of phenolic compounds in olives (Squeo *et al.*, 2016). Moreover, CaCO₃ application also increase grape yield in commercial vineyards (Sabir *et al.*, 2014). Overall, phenolic compounds from grapes play a key role in determining wine organoleptic characteristics and quality. Anthocyanins and stilbenes, for example, provide the red or purple coloration in wines, while phenolic acids and flavan-3-ols are responsible for astringency and bitterness. In addition to polyphenols, the overall characteristics and balance of the wine is provided by the physicochemical characteristics of the grape at harvest. These include the concentration of total soluble solids (TSS), pH, total titratable acidity (TA), organic acid composition, and positive and negative aromas, among other (Nogales-Bueno *et al.*, 2013; Olivares *et al.*, 2017). Thus, the addition of various compounds to improve yield in commercial vineyards must maintain the balance among physicochemical characteristics and phenolic compounds. It is hypothesized in this study that foliar pre-harvest applications of CaCO₃ in grapevines will increase yield and enhance phenolic compounds accumulation in grapes, without affecting physicochemical parameters. Climate change has been associated with high anthropogenic carbon dioxide (CO₂) emissions into the environment. To mitigate this environmental impact, cement industries use different processes to capture CO₂ emissions and generate residues as CaCO₃ (Anbu *et al.*, 2016). These could be used as a source of Ca in commercial farming operations. Particularly, CaCO₃ from cement industry residues could provide an inexpensive source of Ca to increase grape yield and polyphenol concentrations in viticulture operations. Consequently, the objective of this study was to evaluate the effect of foliar CaCO₃ applications on the yield, and the total and individual concentrations of phenolic compounds of Shiraz grapes.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Chemicals and solvents

Malvidin-3-O-glucoside chloride, pelargonidin-3-O-glucoside chloride, cyanidin 3-O-glucoside chloride, cyanidin-3-O-galactoside, gallic acid, *trans*-cinnamic acid, *trans*-caftaric acid, protocatechuic acid, *trans*-resveratrol, +(-)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin dimers B1 and B2 standards were used for molecule identification and quantification. All reagents and solvents used were of analytical or HPLC grade, and were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA), J.T. Baker (Baker-Mallinckrodt Inc, Mexico), and Merck (Merck, Germany).

2.2.2 Study site and treatments

Experiments were conducted in 2017 at an experimental vineyard (28° 25' N and 106° 51' W, 2010 m above sea level) owned by the Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Mexico. The vineyard consisted of eight-year-old Shiraz vines (1103P rootstock) planted at a 3 m distance between rows and 1 m between grapevines. Vines were trained using a Royat system with rows oriented north-south on sandy loam soils. Drip irrigation was applied from bud break to veraison, and a 15.6% humidity was maintained throughout the experimental period. Climatic conditions were monitored at a meteorological station (Quintas Lupitas of Unifrut). Rainfall is frequent during the ripening period at the study site, and the accumulation from the time of CaCO₃ application until harvest time was 201.4 mm. The average maximum and minimum temperatures were 23.9 °C and 13.6 °C, respectively. Calcium carbonate residues (Table 1) from a cement industry were used as a source of Ca in the experimental treatments.

Table 1. Characterization of CaCO₃ from cement industries of Chihuahua.

Molecule	Concentration (%)
Calcium (Ca)	20.4
Magnesium (Mg)	0.32
Calcium Carbonate (CaCO ₃)	45.50
Silicon dioxide (SiO ₂)	33.77

A CaCO₃ (1% w/w) solution was prepared with tween-20 (0.05 mL L⁻¹) as adherent agent. The solution concentration was selected after conducting preliminary field tests. The CaCO₃ solution was applied to the grapevine leaves when clusters reached >90% veraison using a backpack piston sprayer at a rate of 1 L plant⁻¹ (Table 2). Grape sampling started fifteen days after the CaCO₃ foliar application. Approximately 200 berries were randomly collected from each treatment once a week from veraison to harvest time.

Table 2. Phenological stages from dormancy to leaf fall and CaCO₃ application on Shiraz grapes.

Phenological stage	Gregorian day	Degree days (°C)
Dormancy	60	108.02
Bud swelling	73	152.44
Bud burst	78	178.80
Beginning of foliar development	83	205.37
Foliar development (>3 leaves unfolded)	88	223.83
Inflorescence clearly visible	95	245.38
Inflorescence fully developed	99	268.74
Flower separating	110	339.03
Flowering	121	410.16
Fruit set	132	473.99
Beginning of veraison	185	990.15
*Veraison (>90%)	198	1096.63
Berries ripe for harvest	242	1445.10
Leaves falling	293	1784.27

*Timing of foliar application of CaCO₃.

2.2.3 Foliar analysis

Forty grapevine leaves were randomly collected once a week before harvest. Leaves were rinsed with deionized water and oven-dried for 72 h at 70°C oven to constant weight. The concentration of calcium (Ca), potassium (K), phosphorus (P), magnesium (Mg), manganese (Mn), iron (Fe), copper (Cu) and zinc (Zn) in the leaves was determined using flame atomic absorption spectrometry with oxygen-acetylene flow (PinAAcle 900H, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) (Oliveira *et al.*, 2009). The flame emission measurements were determined at 422.7 nm (Ca), 766.5 nm (K), 285.2 nm (Mg), 327 nm (Cu), 372 nm (Fe), 403.1 nm (Mn) and 213.9 nm (Zn). Standards (0-20 ppm) were used to calibrate the instrument, and four replicates were analyzed per sample.

2.2.4 Grape Analysis

2.2.4.1 Physicochemical analysis

Fresh berries (50 per sample) were randomly collected (4 replicates) from each treatment and control to conduct physicochemical and phenolic analysis. Samples were used to determine tristimulus color (lightness value L^* , color channels a^* and b^*) using a tabletop colorimeter (CR-300 model, Minolta Co. Ltd, Osaka, Japan). Fruit firmness was determined using a TA-XT2i texture analyzer (Texture Technology Corp., Scarsdale, N.Y., USA. and Stable Micro System Ltd, Godalming, UK). The texture analyzer was equipped with a 7 mm diameter stainless steel striker pin which punctured the grape skin at a rate of 10 mm s⁻¹. The maximum puncturing force (in Newtons) was determined for 20 berries per treatment (4 replicates). Berries were crushed and macerated for 1 h to evaluate pH (HANNA instruments Inc., Woonsocket, USA), TA, TSS and phenolic compounds according to international methods for grapes and wine (OIV, 2017). Total soluble solids in the must were determined using a digital refractometer (ATAGO, Co, Ltd., Osaka, Japan), and TA was determined by titration of the sample with 0.1N NaOH.

2.2.4.2 Analysis of polyphenols

Polyphenols were extracted from grapes in a dark room with a red safety light. Crushed berries (~3 g) were mixed with 40 mL of acetone/water/trifluoroacetic acid (AWTA, 70:29.9:0.1 v/v) and homogenized using an Ultra Turrax (IKA T18) at 1000 rpm for 1 min. The sample was vortexed for 5 min, sonicated on ice for 5 min, and then filtered through a Whatman filter paper No. 4. Material on the filter was further rinsed with 40 mL AWTA until the tissue was decolorized. The acetone phase was eliminated in a rotavapor (39 °C) and the solution was brought up to 50 mL with 0.01% TA. Finally, the extracts were filtered through a 0.45 µm membrane filter and stored in borosilicate amber vials for subsequent polyphenol analysis.

Total phenolic compounds were determined spectrophotometrically after Folin-Ciocalteu reactions, and quantified with gallic acid calibration curves. Individual phenol analysis was performed in an Agilent 1200 series high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent, Palo Alto, Ca, USA) with a diode array detector (Ymc Inc. Miliford, Ma, USA) according to standard protocols (Ornelas-Paz *et al.*, 2017). Separation of phenolic compounds was performed with an XDB-C18 column (Agilent, Zorbax eclipse 4.6 x 150 mm 5 µm). The column was operated at 30 °C with mobile phases consisting of 2% (v/v) acetic acid (A) and acetonitrile (B). Flow rate was maintained at 1.0 mL min⁻¹ with the following gradient: 100% A/0% B at 0 min; 93% A/7% B at 12 min; 89% A/11% B at 20 min; 86% A/14% B at 35 min; 84% A/16% B at 36 min; 82% A/18% B at 41 min; 76% A/24% B at 48 min; 70% A/30% B at 54 min; 65% A/35% B at 59 min; 50% A/50% B at 65 min; 35% A/65% B at 70 min; 25% A/85% B at 75 min; 15% A/85% B at 80 min; 5% A/95% B at 85-90 min and 100% A at 95 min. Polyphenols were monitored with UV-visible spectra ($\lambda = 520$ nm) for anthocyanins and stilbene groups, and using $\lambda = 320$ nm and 280 nm for phenolic acids and flavan-3-ols groups, respectively. Individual polyphenols were identified and quantified using standards and calibration curves.

2.2.5 Statistical analysis

Results were statistically evaluated based on a split-plot in time design. Analysis of variance and a least square means test were used to detect significant differences among treatments, and were conducted using SAS System for Windows 9.0 (SAS Institute. Inc. Cary, N.C., USA, 2002) after testing for normality and homoscedasticity

of the data. Significance level was set at 0.05 and the experiments were conducted using four replicates.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Effect of grapevine leaf CaCO_3 application on yield and physicochemical characteristics of grapes

Several macro- and micronutrient concentrations in grapevine leaves varied significantly as a result of CaCO_3 application relative to controls (Fig. 1). Thus, the relative concentration of Ca increased ~25% in CaCO_3 -treated grapevine leaves compared to controls (Fig. 1A). In contrast, absolute or relative concentrations of K, Mg, Fe, and Mn in CaCO_3 -treated grapevine leaves decreased significantly but only by up to approximately 10% relative to controls (Fig. 1A, 1B). Finally, the concentration of P, Cu and Zn in the leaves did not change significantly in CaCO_3 -treated vines relative to the controls.

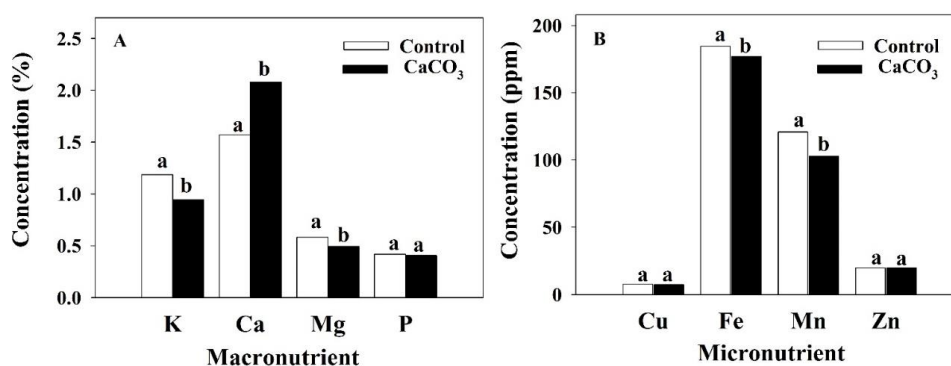


Figure 1. Effect of foliar CaCO_3 application on the mean? Relative concentration (%) of potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), and phosphorous (P), and concentrations (in ppm) of copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mg) and zinc (Zn) in leaves of Shiraz grapes. Different letters above bars indicate statistically significant differences.

The grape yield and cluster weight of the Shiraz vines also varied as a result of CaCO_3 application (Fig. 2). While there was no significant increase in the number of clusters per vine (Fig. 2A), the cluster weight and yield increased significantly, by more than 50%, in CaCO_3 -treated grapevines relative to the controls (Fig. 2B and 2C).

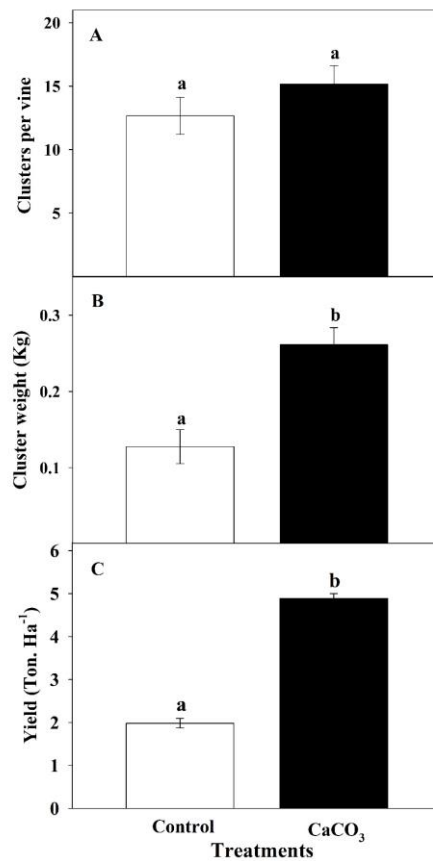


Figure 2. Effect of foliar applications of CaCO₃ on the average of number of clusters per grapevine (\pm SE), cluster weight and grape yield at harvest time in Shiraz grapes. Different letters above bars indicate statistically significant differences.

In general, there were no significant changes in the physicochemical composition of the grapes as a result of CaCO₃ application (Table 3). The percentage of total soluble solids, %TA, and pH of the grapes did not vary significantly as a result of CaCO₃ application relative to the control at harvest time. Similarly, firmness and the color of the grapes was statistically similar between the control and treated vines at harvest time.

Table 3. Effect of foliar CaCO₃ application on physicochemical parameters of Shiraz grapes during ripening. TSS = total soluble solids, TA=titratable acidity. Values indicate the means of four samples. CIELab = color as defined by the International Commission on Illumination (CIE), L* = lightness value, a* and b* = color channels.

Days after application (DDA)	TSS (°Brix)		TA (g·L ⁻¹ of tartaric acid equivalents)		pH		Firmness (N)		Color (CIELab)					
	control	CaCO ₃	control	CaCO ₃	Control	CaCO ₃	Control	CaCO ₃	control			CaCO ₃		
									L*	a*	b*	L*	a*	b*
15	16.07	16.14	11.13	11.42	2.89	2.88	2.02 ^b	2.32 ^a	32.58	3.11	1.65 ^a	30.10	3.16	0.097 ^b
22	19.17 ^a	17.24 ^b	11.00	11.00	3.08	3.06	2.07	2.13	30.39	3.35	1.35 ^a	28.58	3.56	0.83 ^b
29	19.36	19.30	10.46	10.19	2.90 ^b	2.99 ^a	1.23	1.31	29.39	3.44	0.84 ^b	28.54	3.48	1.28 ^a
36	20.39 ^a	19.51 ^b	8.21	8.35	3.23	3.26	1.56	1.61	30.39	3.02	-0.85	31.46	2.88	-0.76
44	20.24	20.15	7.57	7.35	3.34	3.30	1.89	1.89	29.81	2.87	-0.47	31.12	2.77	-0.46
S.E.	0.159		0.190		0.0241		0.0765		0.701	0.145	0.275	0.701	0.145	0.275

Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between treatment and control. Standard error = S.E..

2.3.2 Influence of pre-harvest CaCO₃ on the concentration of phenolic compound in grapes

2.3.2.1 Total phenolic compounds, stilbene and anthocyanins

Total phenolic concentration as well as that of specific phenolic compounds in berries varied significantly between treated and control vines (Table 4). Thus, the total phenolic concentration was approximately 3-fold greater in CaCO₃-treated vines relative to the controls at harvest time, whereas trans-resveratrol did not differ significantly at harvest time between CaCO₃-treated vines and controls. The most abundant anthocyanin found in Shiraz grapes was malvidin-3-O-glucoside, which increased nearly 3-fold at harvest time in CaCO₃-treated vines relative to the controls. Similar to malvidin-3-O-glucoside, the mean concentrations of cyanidin-3-O-galactoside, cyanidin-3-O-glucoside and pelargonidin-3-O-glucoside increased 2- to 3-fold in CaCO₃-treated vines relative to the controls.

Table 4. Mean concentrations of total phenolic compounds concentration, and stilbene and anthocyanin in CaCO₃-treated Shiraz grapes during ripening (mg.g⁻¹ dry weight).

Compound and treatment	Days after application (DDA)				
	15	22	29	36	44 †
<i>Total phenolic compounds</i>					
+ CaCO ₃	5.673	5.710 ^{a*}	1.855	3.340 ^{a*}	4.560 ^{a*}
Control	5.050	3.343 ^b	2.295	1.540 ^b	1.452 ^b
S.E.	0.635	0.635	0.635	0.550	0.078
<i>Stilbene</i>					
<i>Trans-resveratrol</i>					
+ CaCO ₃	0.086	0.105	0.102	0.148 ^{a*}	0.076
Control	0.072	0.090	0.079	0.063 ^b	0.052
S.E.	0.017	0.017	0.017	0.017	0.015
<i>Anthocyanins</i>					
<i>Malvidin-3-O-glucoside</i>					
+ CaCO ₃	1.690	3.152	2.291	5.787 ^{a**}	6.093 ^{a**}
Control	1.761	3.331	2.038	1.505 ^b	2.212 ^b
S.E.	0.361	0.312	0.361	0.361	0.442
<i>Cyanidin-3-O-galactoside</i>					
+ CaCO ₃	0.518	0.629	0.519	1.160 ^{a*}	1.108 ^{a*}
Control	0.442	0.618	0.582	0.435 ^b	0.494 ^b
S.E.	0.121	0.121	0.148	0.121	0.121
<i>Cyanidin-3-O-glucoside</i>					
+ CaCO ₃	0.321	0.412	0.320	0.540 ^{a*}	0.621 ^{a*}
Control	0.340	0.428	0.363	0.206 ^b	0.283 ^b
S.E.	0.050	0.061	0.050	0.050	0.050
<i>Pelargonidin-3-O-glucoside</i>					
+ CaCO ₃	0.204	0.299	0.157	0.477 ^{a*}	0.443 ^{a*}
Control	0.181	0.229	0.249	0.172 ^b	0.257 ^b
S.E.	0.040	0.032	0.032	0.032	0.032

† Harvest date with 1445.1 degree days accumulated (242 gregorian days)

Different letters indicate significant differences between treatments (* = at $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. S.E. = standard error.

2.3.2.2 Phenolic acids and flavan 3-ols

At harvest time the concentration of most phenolic acids and flavan-3-ols significantly increased in grapes of CaCO₃-treated vines relative to the controls (Table 5). The concentration of gallic acid in grapes was 10- to 70-fold greater than the rest of the phenolic acids. In most cases, the concentration of phenolic acids and flavan-3-ols increased sharply 36 days after CaCO₃ application. The concentration of the phenolic acid *trans*-cinnamic acid significantly increased 12-fold while the concentration of caftaric acid increased 2-fold at harvest time in berries of CaCO₃-

treated vines relative to those in the controls. In contrast, the concentration of gallic acid remained the same in the treatment and controls at harvest time. The sharp decrease in total and specific phenolic compounds 29 days after CaCO₃ application coincided with rainfall in the area.

Table 5. Phenolic acids and flavan-3-ols identified and quantified in CaCO₃-treated Shiraz grapes and controls during ripening (mg.g⁻¹ dry weight).

Compound and treatment	Days after application (DDA)				
	15	22	29	36	44†
<i>Phenolic acids</i>					
<i>Trans-cinnamic acid</i>					
+ CaCO ₃	0.021	0.030	0.041	0.155 ^{a**}	0.169 ^{a**}
Control	0.003	0.041	0.027	0.004 ^b	0.014 ^b
S.E.	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
<i>Gallic acid</i>					
+ CaCO ₃	30.558 ^{a*}	23.470 ^{a*}	26.420 ^{a*}	22.145 ^{a*}	4.299
Control	13.644 ^b	15.439 ^b	13.723 ^b	5.346 ^b	4.541
S.E.	3.885	3.885	3.884	2.800	3.205
<i>Caftaric acid</i>					
+ CaCO ₃	0.519	0.698 ^{a*}	0.317	0.549 ^{a*}	0.473 ^{a*}
Control	0.631	0.383 ^b	0.459	0.319 ^b	0.240 ^b
S.E.	0.073	0.074	0.074	0.074	0.064
<i>Protocatechuic acid</i>					
+ CaCO ₃	0.048	0.056	0.050	0.069 ^{a*}	0.061 ^{a*}
Control	0.044	0.044	0.039	0.034 ^b	0.036 ^b
S.E.	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006
<i>Flavan-3-ols</i>					
<i>Catechin</i>					
+ CaCO ₃	0.253	0.214	0.378	0.403 ^{a*}	0.619 ^{a*}
Control	0.187	0.188	0.387	0.145 ^b	0.219 ^b
S.E.	0.039	0.039	0.045	0.045	0.039
<i>Epicatechin</i>					
+ CaCO ₃	1.583	1.916	1.195 ^{b*}	3.998	2.639 ^{a*}
Control	2.234	1.838	2.342 ^a	2.905	1.270 ^b
S.E.	0.275	0.275	0.318	0.389	0.318
<i>Procyanidin B1</i>					
+ CaCO ₃	0.904	0.356	0.732	0.424	1.106 ^{a*}
Control	0.908	0.228	0.886	0.454	0.421 ^b
S.E.	0.092	0.076	0.092	0.076	0.076
<i>Procyanidin B2</i>					
+ CaCO ₃	0.070	0.334 ^{a*}	0.366	0.636 ^{a*}	0.779 ^{a*}
Control	0.032	0.033 ^b	0.284	0.379 ^b	0.501 ^b
S.E.	0.082	0.099	0.099	0.099	0.082

† Harvest date with 1445.1 degree days accumulated (242 gregorian days)

Different letters indicate significant differences between treatments (* = $p < 0.05$ and ** = $p < 0.001$. S.E. = standard error.

Catechin, epicatechin, and procyanidin B1 and B2 were identified in Shiraz grapes (Table 5). Epicatechin was the major flavan-3-ol in berries, and at harvest time its concentration was twice as high in CaCO_3 -treated vines than in controls. Similar to epicatechin, the concentration of catechin and procyanidin B1 was 2- to 3-fold greater at harvest time in CaCO_3 -treated vines compared to controls, whereas that of procyanidin B2 was only 35% greater in CaCO_3 -treated vines than in controls.

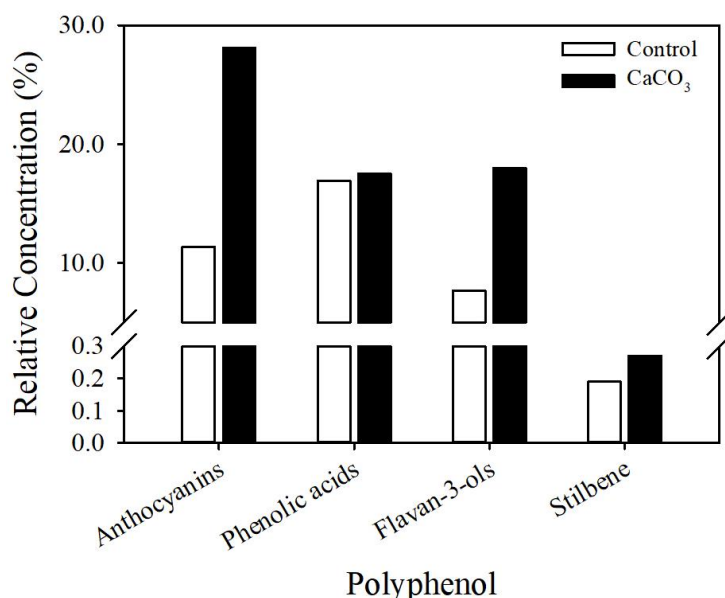


Figure 3. Effect of foliar CaCO_3 application on the relative concentration (%) of polyphenolic compounds in Shiraz grapes at harvest time.

Overall, there was a significant increase in the relative concentration of polyphenolic compounds in Shiraz grapes relative to controls at harvest time (Fig. 3). The relative concentration of anthocyanins and flavan-3-ols increased ~2-fold at harvest time in berries of CaCO_3 -treated vines compared to that in the controls. Finally, the relative concentration of stilbene in berries significantly increased ~30% in CaCO_3 -treated vines relative to that in controls. In contrast to these polyphenols, there was no detectable variation in the concentration of phenolic acids between treatments and controls at harvest time.

Results of the present study show that foliar CaCO_3 applications affect macro- and micronutrient concentrations, grape yield, and total and specific polyphenolic concentrations in vine and grape tissue. These results are consistent with the wide impact of calcium on plant physiology found in other studies. Increasing concentration of Ca, for example, increased the biomass of leaves but decreased root dry weight in tobacco plants (López-Lefebvre *et al.*, 2001). In contrast, respiration rates and ascorbic acid content in cherries decreased with increasing Ca concentration (Wang *et al.*, 2014). Finally, foliar applications of CaCl_2 increased total phenolic content, especially that of anthocyanin, in strawberries (Xu *et al.*, 2014). Clearly, Ca plays a key role in the assimilation of macro- and micronutrients, the activation/deactivation of specific enzymes and the expression of genes controlling key metabolic pathways. Similarly, results of this study suggest that foliar applications of Ca from CaCO_3 residues of produced by cement industries impact the overall physiology of wine-producing grapes.

The decrease in tissue K, Fe, Mg and Mn concentrations in CaCO_3 -treated grape leaves observed in this study is consistent with results of prior studies. The concentration of P, K and Mg in leaves and fruits of cherry trees, for example, decreased as a result of foliar applications of Ca (Mikiciuk *et al.*, 2015). In addition, the concentration of Mg, Na and P decreased in leaves and roots of tobacco plants as a result of increasing concentrations of Ca in the culture media (López-Lefebvre *et al.*, 2001). Changes in the absorption of these ions can affect stomatal aperture (Andrés *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 1993), the concentration of phenolic compounds, cell wall organization (Martins *et al.*, 2018), the accumulation of sugars and organic acids in fruit (Prasad *et al.*, 2015), and also impact overall plant physiology. For example, it has been observed, that a disruption in the accumulation of K in guard cells reduces cell turgidity and the opening of the stoma (López-Lefebvre *et al.*, 2001). Similar to K, the increase in Ca concentration in tissues was shown to reduce stomatal aperture in a number of plants (Ruiz *et al.*, 1993). The Ca-induced suppression of stomatal aperture recovers after Ca concentrations in the xylem decrease. Thus, increasing Ca concentration via foliar applications might reduce the K concentration in the leaves and reduce stomatal aperture. Furthermore, results of

the present study suggest that applications of foliar CaCO_3 could have a similar effect on stomatal closure as that observed in grapevines under restricted irrigation. Moreover, the low concentrations of Fe, Mg and Mn found in CaCO_3 -treated grapevine leaves, could be related to other physiological processes given that these elements function as cofactors in a number of key metabolic reactions such as photosynthesis.

Results of the effects of foliar ABA applications on the maturation of grapes are equivocal. On the one hand, some studies have found that the use of ABA and ethephon to enhance phenolic compounds in grapes do not increase grape yield and cluster weight (Peppi *et al.*, 2006; Coelho de Souza-Leaño *et al.*, 2014). However, other studies indicate that foliar ABA application can reduce grape yield and berry size (Alonso *et al.*, 2016). Results of the present study suggest that foliar applications of CaCO_3 positively impact the yield and cluster weight of Shiraz grapes. This is consistent with findings in 'Narince' grapes treated with fertilizers containing CaCO_3 (Sabir *et al.*, 2014). In contrast, the increase in yield and cluster weight in the present study could be attributed to the fact that treatment with CaCO_3 reduces the stomatal opening and prevents vine and grape dehydration.

External applications of chemical compounds can affect plant cell physiology and chemical fruit composition. Thus, foliar application of ABA can in some cases increase the concentration of TSS and anthocyanins in grapes and litchis (Singh *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2015). Other studies, however, have found that the same ABA application showed no differences in TSS, TA, pH or tristimulus color relative to controls (Peppi *et al.*, 2006; Coelho de Souza-Leaño *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2016). Results on the use of exogenous ABA applications are thus equivocal. The above physicochemical parameters are of great interest for winemaking since they determine the technological maturation of the grapes, potential alcohol content, and the balance between some organoleptic parameters of phenolic compounds in wines (Nogales-Bueno *et al.*, 2013). The increase in TSS and grape color, however, is likely an artifact of grape dehydration rather than an increase in the synthesis of sugars or anthocyanins (Santiago *et al.*, 2013). The use of CaCO_3 in the experiment reported in the present study did not affect TSS, TA or pH in Shiraz grapes. This

suggest that the use of CaCO_3 does not interact with the plant's maturation process and that the latter is regulated by climatic conditions. However, it is important to highlight that other characteristics such as the absolute and relative concentrations of phenolic compounds were positively affected in grapes treated with CaCO_3 .

Exogenous Ca application is used in the fruit industry to increase fruit firmness and shelf life. While the use of CaCl_2 was found to increase these characteristics in El-Bayadi' table grapes (Al-Qurashi & Awad, 2013), leaf ABA application decreased the firmness of Flame Seedless grapes. The use of CaCO_3 in the present study did not increase Shiraz grape firmness at harvest time. Further studies are thus necessary to determine the effect of these chemicals on the firmness and shelf life of different types of grapes. However, since Shiraz grapes are used in the production of wines, it is likely that the application of CaCO_3 does not play a critical role in the production of wine-producing grapes.

Abscisic acid plays a key role in the biosynthesis of phenols in plants, including grapevines. This acid triggers the biosynthesis of phenolic compounds that filter UV radiation in grapevine leaves (Berli *et al.*, 2011). For example, total phenolic compounds, were shown to increase as a result of foliar applications of ABA (Coelho de Souza-Leaño *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Similarly, foliar applications of CaCl_2 led to an increase in the concentration of total phenolic compounds in grapes (Al-Qurashi & Awad, 2013; Wang *et al.*, 2013). The use of CaCO_3 also increased the concentration of total phenolic compounds in olives (Squeo *et al.*, 2016). Therefore, results of the present study agree with findings of previous studies that showed an increase in total phenolic compounds as a result of the application of CaCO_3 . Calcium is a secondary messenger that regulates the groups of Ca-dependent proteins related to the synthesis of ABA and stomatal closure (Yang *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2015; Ranty *et al.*, 2016). Consequently, our results suggest that the use of CaCO_3 as a source of Ca, could be more economical than the use of ABA or other exogenous compounds to regulate the phenolic concentration in grapes. Additionally, the application of Ca could be used to regulate the concentration of specific stilbenes, anthocyanins, phenolic acids and flavan-3-ols.

Stilbenes are phytoalexins synthesized as a defense mechanism against biotic stress in plants. The stilbene most commonly studied in *Vitis* species is trans-resveratrol. The application of a number of chemical compounds is known to affect the accumulation of stilbenes in vine tissue, including grapes. Exogenous applications of ABA on vines, for example, increase the concentration of trans-resveratrol in 'Beihong' grapes. This increase was only observed 20 d after ABA application and rapidly decreased thereafter (Wang *et al.*, 2016). Furthermore, applications of CaCl₂ on 'Beihong' and 'Hongbaladuo' vines increased trans-resveratrol concentrations in leaves and berry skins relative to controls (Wang *et al.*, 2013). In agreement with these studies, foliar applications of CaCO₃ in the present study resulted in an increase in the concentration of trans-resveratrol as grapes matured. However, the concentration decreased to similar levels as those measured in the controls at harvest time. The initial increase of trans-resveratrol as a result of CaCO₃ application might be a direct response to increased Ca availability. Calcium-dependent proteins such as CDPKs, CMs, and CBLs trigger the synthesis of ABA (Boss *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2012; Zou *et al.*, 2015; Vandelle *et al.*, 2018). Thus, it is likely that foliar applications of CaCO₃ activates some Ca-dependent proteins. In turn, the decrease of trans-resveratrol at harvest time might be the result of substrate competition between stilbene and chalcone synthases as both use the same substrate. Therefore, the competition for substrate could explain the relationship between higher concentrations of anthocyanins and lower trans-resveratrol concentrations in CaCO₃-treated grapes observed at harvest time in the present study.

Anthocyanins in grapes are extracted during maceration and play a key role in the production of red wines. Thus, in the last decade, exogenous substance applications on plants have been used to increase the synthesis of anthocyanins in fruits. Applications of ABA, for example, increased the anthocyanin content in liches and grapes by 50% (Singh *et al.*, 2014; Koyama *et al.*, 2014). Similarly, exogenous applications of ABA increased the concentration of malvidin-3-O-glucoside and cyanidin in Crimson seedless and Malbec grapes (Coelho de Souza-Leaño *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2016). External application of CaCl₂ was also shown to increase

the concentration of cyanidin in strawberries and cherries (Wang *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). The present study demonstrates for the first time that foliar CaCO_3 application increases the concentration of anthocyanins. Thus, this study suggests that exogenous application of 1% CaCO_3 is as effective as ABA or CaCl_2 in increasing the synthesis of anthocyanins. This further suggests that there are a number of factors involved in the ripening of grapes, including climate conditions and the effects of calcium on leaves. Grapevines have varying and complex responses to abiotic or biotic stress. Thus, our results suggest that CaCO_3 might be a source of Ca that acts as the secondary messenger and activates the response to abiotic stress, and possibly triggers ABA synthesis or expression in leaves.

Phenolic acids are the first phenolic compounds synthesized mainly in tissues of flowers and fruits. The phenylalanine ammonia-lyase enzyme catalyzes the conversion of the amino acid phenylalanine to trans-cinnamic acid, the first phenolic acid (Abdel-Salam & Hassan, 2015). Foliar application of ABA and CaCl_2 on vines, has been shown to change the concentration of phenolic acids in fruits. Thus, application of ABA led to a decrease in the concentration of gallic acid in grapes (Alonso *et al.*, 2016). It was also demonstrated that CaCl_2 application increased the concentration of trans-cinnamic acid, yet other phenolic acids such as trans-caftaric acid and protocatechuic acid were not affected (Kiselev *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2018). In agreement with findings obtained with CaCl_2 applications, results of the present study show that foliar applications of CaCO_3 increase the concentration of trans-cinnamic, acid trans-caftaric acid and protocatechuic acid in Shiraz grapes at harvest time. In contrast, gallic acid increases only during early grape maturity. These results suggest that foliar application of CaCO_3 induces the synthesis of the main phenolic compound precursors.

Flavan-3-ols are responsible for the bitterness and astringency of wines (Kyrleou *et al.*, 2017). Monomeric and oligomeric forms in grapes are known to be affected by ABA application, e.g. the latter resulted in high concentrations of catechin and epicatechin in Yan and Cabernet Sauvignon grapes (Luan *et al.*, 2014). These studies demonstrated that the application of ABA on Cabernet Sauvignon grapes,

increases the activity of the leucoanthocyanidin reductase, the enzyme responsible for the synthesis of catechins (Lacampagne *et al.*, 2010). Furthermore, foliar application of CaCl_2 increased the concentration of epicatechin and procyanidin B1, while leading to a decrease in catechin and procyanidin B2 on 'Tempranillo' and 'Graciano' grapes (Abdel-Salam & Hassan, 2015). In the present study the concentration of catechin, epicatechin and procyanidin B1 and B2 increased in grapes treated with CaCO_3 . This suggests that the application of CaCO_3 increases ABA expression in leaves and triggers leucoanthocyanidin reductase activity resulting in an increase in monomeric and oligomeric forms of flavan-3-ols. In general, our results suggest that CaCO_3 treatment strongly impacts the production of all phenolic compounds, including anthocyanins, stilbene, phenolic acids and flavan-3-ols. This further suggests that CaCO_3 could be used to enhance phenolic compounds such as anthocyanins, and flavan-3-ols in grapes and others fruits.

2.4 CONCLUSIONES

The present study evaluated the impact of foliar applications of CaCO_3 on the concentration of phenolic compounds in Shiraz grapes. Results demonstrate that foliar applications of CaCO_3 increase grape yield and modify the concentration of ions that regulate stomatal closure in treated vines. Furthermore, the increase in phenolic compound concentration in grapes from treated vines suggests that CaCO_3 activates the expression of genes involved in the synthesis of ABA or jasmonic acid. Finally, the use of CaCO_3 residues from the cement industry offers an effective and economical alternative to increase total phenolic compounds, including anthocyanins, in wine grapes.

2.5 LITERATURA CITADA

Abdel-Salam, M.M. & Hassan, M.A.M., 2015. Effect of CaCl_2 sprays on anthocyanins, pectin and phenolic acids fractionation in berry skin of two red grape

(*Vitis vinifera* L.) cultivars during ripening. International Journal of Academic Research 7(1), 159-167.

Alonso, R., Berli, F.J., Fontana, A., Piccoli, P. & Bottini, R., 2016. Malbec grape (*Vitis vinifera* L.) responses to the environment: berry phenolic as influenced by solar uv-b, water deficit and sprayed abscisic acid. Plant Physiology and Biochemistry 109, 84-90.

Al-Qurashi, A.D. & Awad, A., 2013. Effect of pre-harvest calcium chloride and ethanol spray on quality of 'El-Bayadi' table grapes during storage. Vitis 52(2), 61-67.

Anbu, P., Kang, CH., Shin, Y.J. & So, J.S., 2016. Formation of calcium carbonate mineral by bacteria and its multiple applications. Springer Plus 5(1), 1-26.

Andrés, Z., Pérez-Hormanche, J., Leidi, E.O., Schlücking, K., Steinhorst, L., McLachlan, D.H., Schumacher, K., Hetherington, A.M., Kudla, J., Cubero, B. & Pardo, J.M., 2014.

Control of vacuolar dynamics and regulation of stomatal aperture by tonoplast potassium uptake. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA early edition, 1-9.

Berli, F. J., Fanzone, M., Piccoli, P. & Bottini, R., 2011. Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of *Vitis vinifera* L. Increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(9), 4874-4884.

Boss, P.K., Davies, C. & Robinson, S.P., 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv 'Shiraz' grape berries and the implications for pathway regulation. Plant Physiology 111(4), 1059-1066.

Coelho de Souza-Leaño, P., Coelho-Lima, M. A., Días-Costa, J.P. & Gomes-da Trindade, D.C., 2014. Abscisic acid and ethephon for improving red color and quality of crimson seedless grapes grown in a tropical region. *American Journal of Enology and Viticulture* 66(1), 37-45.

De-la-Hera-Orts, M.L., Martínez-Cutillas, A., López-Roca, J.M. & Gómez-Plaza, E., 2005. Effect on moderate irrigation on grape composition during ripening. *Spanish Journal of Agricultural Research* 3(3), 352-361.

Ferrandino, A. & Lovisolo, C., 2014. Abiotic stress effects on grapevine (*Vitis vinifera* L.): focus on abscisic acid-mediated consequences on secondary metabolism and berry quality. *Environmental and Experimental Botany* 103, 138-147.

Jia, H., Jiu, S., Zhang, Ch., Wang, Ch., Tariq, P., Liu, Z., Wang, B., Cui, L. & Fang, J., 2016. Abscisic acid and sucrose regulate tomato and strawberry fruit ripening through the abscisic acid-stress-ripening transcription factor. *Plant Biotechnology Journal* 14(10), 2045-2065.

Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Shumakova, O.A., Karetin, Y.A. & Manyakhin, A.Y., 2013. Structure and expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene, CDPK3a, in leaves, stems, grapes, and cell cultures of wild-growing grapevine *Vitis amurensis* Rupr. *Plant Cell Rep.* 32, 431-442.

Koyama, R., Marinho de Assis, A., Yamamoto, L.Y., Borges, W.F. & Borges, R.S., 2014. Exogenous abscisic acid increases the anthocyanin concentration of berry and juice from 'Isabel' grapes (*Vitis labrusca* L.). *Hortscience* 49(4), 460-464.

Kyraleou, M., Kallithraka, S., Theodorou, N., Teissedre, P.L., Kotseridis, Y. & Kondouras, S., 2017. Changes in tannin composition of Syrah grape skins and seeds during fruit ripening under contrasting water conditions. *Molecules* 22, 1453.

Lacampagne, S., Gagné, S. & Gény, L., 2010. Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regul.* 29(1), 81-90.

López-Lefebvre, L.R., Rivero, R.M., García, P.C., Sánchez, E., Ruiz, J.M. & Romero, L., 2001. Effect of calcium on mineral nutrient uptake and growth of tobacco. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(4), 1334-1338.

Luan, L.Y., Zhang, Z.W., Xi, Z. M., Huo, S.S. & Ma, L.N., 2014. Comparison the effects of exogenous abscisic acid on the phenolic composition of 'Yan' and 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) wines. *Eur. Food Res Technol.* 239 (2), 203-213.

Martins, V., García, A., Costa, C., Sottomayor, M. & Gerós, H., 2018. Calcium- and hormone-driven regulation of secondary metabolism and cell wall enzymes in grape berry cells. *Journal of Plant Physiology* 231, 57-67.

Mikiciuk, G., Mikiciuk, M., Możdżer, E., Statkiewicz, M. & Chylewska, U., 2015. The effects of foliar nutrition with UnCa fertilizers on the chemical composition of leaves and fruits of sweet cherries. *Journal of Ecological Engineering* 16(2), 116-119.

Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J.M., Rodríguez-Pulido, F.J. & Heredia, F.J., 2013. Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skin in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach. *Food Chemistry*, 221, 1685-1690.

OIV (International Organisation of Vine and Wine). Compendium of international methods of wine and musts analysis. Rue d'Aguesseau-75008 Paris. Available on line:

<http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/methods-of-analysis/compendium-of-international-methods-of-analysis-of-wines-and-musts-2-vol> (15/Jul/17).

Olivares, D., Contreras, C., Muñoz, V., Rivera, S., González-Agüero, M., Retamales, J. & Defilippi, B.G., 2017. Relationships among color development, anthocyanins and pigment-related gene expression in 'Crimson seedless' grapes with abscisic acid and sucrose. *Plant Physiology and Biochemistry* 115, 286-297.

Oliveira, S.R., Gomes-Neto, J.A., Nóbrega, J.A. & Jones, B.T., 2009. Determination of macro-and micronutrients in plant leaves by high resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and ample preparation strategies. *Spectrochimica Acta Part B* 65(4), 316-320.

Ornelas-Paz, J.J., Meza, M.B., Obenland, D., Rodríguez-Friscia, K., Jain, A., Thornton, S. & Prakash, A., 2017. Effect of phytosanitary irradiation on the postharvest quality of seedless kishu mandarins (*Citrus kinokuni mukaku kishu*). *Food Chemistry* 230, 712-720.

Peppi, M.C., Fidelibus, M.W. & Dokoozlian, N., 2006. Abscisic acid applications timing and concentration affect firmness, pigmentation, and color of 'Flame Seedless' grapes. *Hortscience* 41(6), 1440-1445.

Prasad, B., Dimri, D.C. & Bora, L., 2015. Effect of pre-harvest foliar spray of calcium and potassium on fruit quality of pear cv. Pathernakh. *Scientific Research and Essays* 10(11), 376-380.

Ranty, B., Aldon, D., Cotelle, V., Galaud, J.P., Thuleau, P. & Mazars, C., 2016. Calcium sensors as key hub in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-7.

Ruiz, L.P., Atkinson, C.J. & Mansfield, T.A., 1993. Calcium in the xylem and its influence on the behavior of stoma. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 341, 67-74.

Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M.A. & Goksu, N., 2014. Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Horticulturae* 175, 1-8.

Santiago, W.E., Dos-Reis-Tinini, R.C., Augustos-De-Oliveira, R. & Teruel, B.J., 2013. Partial dehydration of 'Niagara Rosada' grapes (*Vitis labrusca* L.) targeting increased concentration of phenolic compounds and soluble solids. *African Journal of Biotechnology* 12, 6474-6479.

Singh, S.P., Saini, M.K., Singh, J., Pongener, A. & Sidhu, G.S., 2014. Preharvest applications of abscisic acid promotes anthocyanins accumulation in pericarp of litchi fruit without adversely affecting postharvest quality. *Postharvest Biology and Technology* 96, 14-22.

Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso, V.M., Pasqualone, A. & Caponio, F., 2016. Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chemistry*. 209, 65-71.

Taurino, M., Ingrosso, I., D'amico, L., De Domenico, S., Nicoletti, I., Corradini, D., Santino, A. & Giovinazzo, G., 2015. Jasmonates elicit different sets of stilbenes in *Vitis vinifera* cv. Negramaro cell cultures. *Springer Plus* 4(49), 2-11.

Vandelle, E., Vannozzi, A., Wong, D., Danzi, D., Digby, A.M., Dal Santo, S. & Astegno, A., 2018. Identification, characterization, and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in grapevine (*Vitis vinifera*). Reveal likely roles in stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry* 129, 221-237.

Villalobos-González, L., Peña-Neira, A., Ibáñez, F. & Pastenes, C., 2016. Long-term effects of abscisic acid (ABA) on the grape berry phenylpropanoid pathway: gene expression and metabolite content. *Plant Physiology and Biochemistry* 105, 213-223.

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M. & Sharma, S., 2017. Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science* 8(161), 1-12.

Wang, J., Wang, S., Liu, G., Edwards, E. J., Duan, W., Li, S. & Wang, L., 2016. The synthesis and accumulation of resveratrol are associated with veraison and abscisic acid concentration in Beihong (*Vitis vinifera* × *Vitis amurensis*) berry skin. *Frontiers in Plant Science* 7, 1-11.

Wang, L., Ma, L., Xi, H., Duan, W., Wang, J. & Li, Sh., 2013. Individual and combined effects of CaCl₂ and uv-c on the biosynthesis of resveratrol in grape leaves and berry skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(29), 7135-7141.

Wang, Y., Xie, X. & Long, L.E., 2014. The effect of postharvest calcium application in hydro-cooling water on tissue calcium content, biochemical changes, and quality attributes of sweet cherry fruit. *Food Chemistry* 160, 23-30.

Xu, W., Peng, H., Yang, T., Whitaker, B., Huang, L., Sun, J. & Chen, P., 2014. Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 82, 289-298.

Yamamoto, L.Y., Marinho de Asis, A., Roberto, S.R., Bovolenta, Y.R., Nixdorf, S.N., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S. & Hermosín-Gutiérrez, I., 2015. Application of abscisic acid (s-ABA) to cv. Isabel grapes (*Vitis vinifera* *Vitis labrusca*) for color

improvement: effect on color, phenolic composition and antioxidant capacity of their grape juice. *Food International Research* 77(3), 579-583.

Yang, T., Peng, H., Whitaker, B.D. & Conway, W.S., 2012. Characterization of calcium/calmodulin-regulated SR/CAMTA gene family during tomato fruit development and ripening. *Plant Biology* 12(19), 2-13.

Zou, J.J., Li, X.D., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W.X., Song, L.F., Zhang, W.Z. & Wu, W.H., 2015. Arabidopsis calcium-dependent protein kinases8 and catalase3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell* 27(5), 1445-1460.

**CAPÍTULO III. CARBONATOS DE CALCIO COMO SUBPRODUCTO DE LA
INDUSTRIA CEMENTERA PARA INCREMENTAR LA COMPOSICIÓN
FENÓLICA EN UVAS Y VINOS CV. SHIRAZ**

Calcium Carbonates byproduct of Cement Industry to Increase Phenolic Composition in Grapes and Wines cv. Shiraz

Irma O. Maya-Meraz^a, José de Jesús Ornelas-Paz^b, Alejandro Cabello-Pasini^c, Ramona Pérez-Leal^{a*}

^a Departamento de Fisiología Vegetal y Frutales de Clima Templado, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Av. Universidad, Cd. Universitaria S/N, código postal 31110, Chihuahua, Chihuahua, México.

^b Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrientes, Centro de Investigación en Alimentación y desarrollo, A.C., Av. Río Conchos S/N, Parque Industrial, código postal 31570, Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

^c Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Km. 103 Carretera Tijuana-Ensenada, Parque Industrial Fondepport, el Sausal, código postal 453, Ensenada, Baja California, México.

Authors emails: irmaya.meraz@gmail.com (I.O. Maya-Meraz), jornelas@ciad.mx (J.J. Ornelas-Paz), acabello@uabc.edu.mx (A. Cabello-Pasini), nsalas@uach.mx (N. Salas-Salazar) rleal@uach.mx (R. Pérez-Leal)

Abbreviated Running Title: Calcium as inductor of phenols and volatile compounds in grapes and wines

***Corresponding author:** R. Pérez Leal

Phone:

Fax:

E-mails address: rleal@uach.mx

RESUMEN

La calidad de las uvas y los vinos depende de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos. Sin embargo, el cambio climático afecta negativamente la composición química de las bayas. Hoy en día, los potenciadores de compuestos fenólicos como el ácido abscísico o el jasmonato de metilo se han utilizado durante la precosecha en las vides para aumentar la composición fenólica de las uvas. Sin embargo, el uso del ácido abscísico, por ejemplo, es muy costoso. Por lo tanto, se ha demostrado que el calcio podría ser una solución para mejorar los compuestos fenólicos en las bayas y sus vinos, ya que el calcio es un mensajero secundario que domina grupos de proteínas dependientes del calcio que activan la vía fenilpropanoide. Por lo tanto, en este trabajo se utilizaron residuos de industrias de cemento con contenido de calcio durante la cosecha previa en las vides Shiraz para promover el aumento de compuestos fenólicos en las bayas y en sus vinos.

Palabras clave: Calcio, Vid, Polifenoles, Calidad.

ABSTRACT

Quality of grapes and wines depends of secondary metabolites such as phenolic compounds. Nevertheless the climate change affect negatively the chemical composition of the berries. Nowadays enhancers of phenolic compounds such as abscisic acid or methyl jasmonate have been used during preharvest on vines to increase phenolic composition in grapes. However the use of the abscisic acid for example is very expensive. Therefore, it has been shown that calcium could be a solution to improve phenolic compounds in berries and their wines since calcium is a secondary messenger that domain groups of calcium dependent proteins that activate phenylpropanoid pathway. Therefore, in this work was used residues of cement industries with calcium content during preharvest on Shiraz vines to promote the increase of phenolic compounds in berries and in their wines.

Keywords: Calcium, Grapevines, Polyphenols, Quality

3.1 INTRODUCCIÓN

El fruto y los productos de la *Vitis vinifera* han sido de los más consumidos a nivel mundial, alcanzando una producción de 73 millones de toneladas en fruto y 244 millones de hectolitros en consumo de vino (OIV, 2019). Sin embargo el cambio climático ha afectado negativamente la composición química de las bayas (Caprio & Quamme, 2002), especialmente el contenido de compuestos fenólicos como las antocianinas, flavanoles, flavonoles, estilbenos y ácidos fenólicos (Meng *et al.*, 2013). Por lo tanto, parte de la calidad organoléptica como color, amargor, astringencia o estabilización del color se ha visto comprometida (Bautista-Ortín *et al.*, 2014). Por esta razón, múltiples investigaciones se han enfocado en aplicaciones exógenas para incrementar la composición fenólica en las bayas y sus vinos, principalmente enfocadas en aplicaciones exógenas ácido abscísico (ABA) o de jasmonatos (Luan *et al.*, 2014; Gil-Muñoz *et al.*, 2017; Portu *et al.*, 2017). Tanto ABA como jasmonatos, son fitohormonas que responden a estímulos ante el estrés abiótico y biótico respectivamente, mientras que ABA responde a la sequía y salinidad en el suelo por ejemplo, los jasmonatos responden ante ataques por insectos o microorganismos (Kazan, 2015; Vishwakamara *et al.*, 2017). Estas fitohormonas actúan sobre la vía fenilpropanoide para sintetizar los compuestos fenólicos, donde han demostrado su efectividad en previos estudios, sobretodo en incremento de antocianinas y estilbenos (Kondo *et al.*, 2014; Portu *et al.*, 2017). Sin embargo aplicaciones exógenas de fitohormonas es caro (Koyama *et al.*, 2014). Actualmente se conoce que los mecanismos ante el estrés biótico y abiótico, responden por medio de señalizaciones donde se involucra el calcio, pues es el calcio quien domina a grupos de proteínas dependientes del calcio para activar las respuestas tanto del ABA como de jasmonatos (Saito *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2013; Zou *et al.*, 2015), por lo que también influyen la vía fenilpropanoide. Por lo tanto el objetivo de la presente investigación, fue evaluar el efecto de aplicaciones exógenas de un residuo industrial de CaCO_3 en precosecha en vides Shiraz, sobre el rendimiento y composición química, especialmente en el contenido de compuestos fenólicos tanto en bayas, como en los vinos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Sitio de estudio y tratamientos

El experimento se llevó a cabo en un viñedo experimental de la Universidad Autónoma de Chihuahua durante la temporada 2017 en uva *Vitis vinifera* de la variedad Shiraz sobre el portainjerto 1103P.

El viñedo experimental está localizado en Cuauhtémoc Chihuahua, México con una localización exacta de 28° 25' N y 106° 51' W y sobre una altitud por encima de los 2020 metros sobre el nivel del mar. Las vides fueron plantadas en 2009 con orientación de norte a sur con espacio de 3.0 m entre hileras y de 1.0 m entre planta con un sistema de conducción tipo Royat en suelos franco arenoso. El sistema de irrigación con goteo simple fue aplicado desde la brotación hasta el envero, manteniendo la humedad promedio del suelo en 15.6% durante el periodo experimental. Las condiciones climáticas se monitorearon con una estación meteorológica Quintas Lupitas propiedad de la Unión Agrícola Regional de Fruticultores del Estado de Chihuahua (UNIFRUT). En el sitio de estudio, son frecuentes las lluvias durante la etapa de envero a cosecha, teniendo una precipitación acumulada de 485.9 mm y con un promedio de temperaturas máximas y mínimas de 24.7 °C y 13.2 °C respectivamente (Fig. 1).

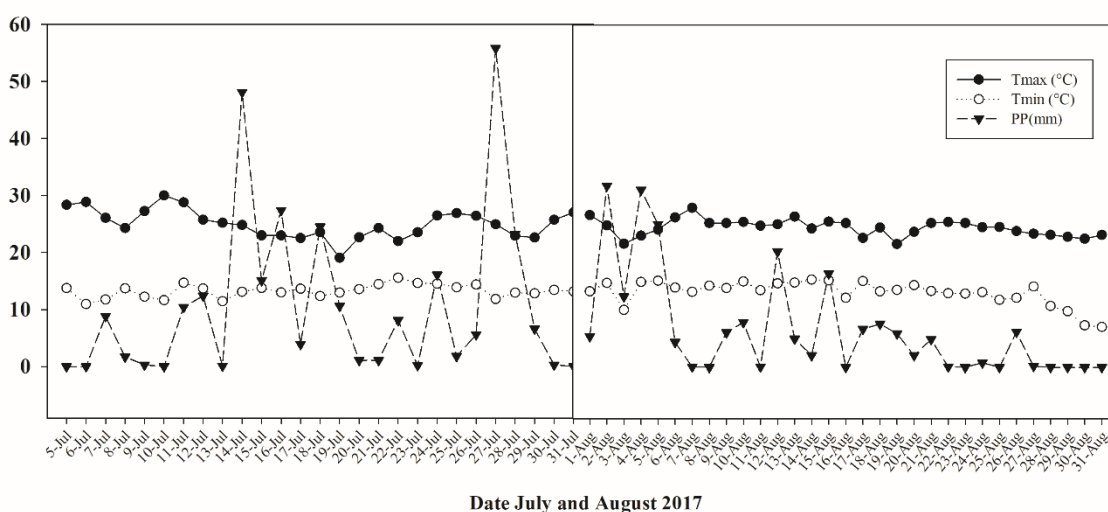


Figura 1. Temperaturas máximas y mínimas y precipitación pluvial ocurridas durante el envero y cosecha en la temporada 2017

El tratamiento utilizado en el experimento fueron carbonatos de calcio obtenidos como subproducto de industrias cementeras con un contenido total de calcio de 386000 ppm, el calcio fue preparado en una solución acuosa al 1% utilizando como agente adherente tween 20. La solución fue aplicada en hojas y racimos a razón de 1 L planta⁻¹ el 15 de Julio con un porcentaje de envero mayor al 90% con ayuda de un aspersor tipo mochila automática. Las bayas fueron cosechados 45 días después de la aplicación realizando análisis fisicoquímicos de las bayas y posteriormente 15 meses después de sus vinos.

3.2.2 Químicos y solventes

Malvidina-3-O-glucósido, cloruro de pelargonidin-3-O-glucósido, cloruro de cianidina 3-O-glucósido, cianidin-3-O-galactósido, ácido gálico, ácido trans-cinámico, ácido *trans*-caftárico, ácido protocatecuico, Ácido caféico, ácido clorogénico, quercetina-glucósido, quercetina b-glucósido, quercetina, mirecetina, kaempherol, isoramnetina, *trans*-resveratrol, + (-) - catequina, (-) - epicatequina, los dímeros de procianidina B1 y B2 se utilizaron para las moléculas. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos. Mientras que para los compuestos volátiles se utilizó el espectro de masas informado por la biblioteca NIST. Todos los reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico o HPLC, y se compraron de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EE. UU.), J.T. Baker (Baker-Mallinckrodt Inc, México) y Merck (Merck, Alemania).

3.2.3 Cosecha, parámetros fisicoquímicos de la uva y vinificación

3.2.3.1 Cosecha y fisicoquímicos

Las uvas se cosecharon con 20 ° brix alcanzado el 30 de agosto de 2017. Los sólidos solubles totales expresados en °brix se monitorearon con un refractómetro digital (ATAGO Co, Ltd., Osaka, Japón). El pH se determinó con pHmetro (HANNA instruments Inc., Woonsocket, EE. UU.) Mientras que la acidez titulable se evaluó mediante la valoración del mosto con NaOH 0,1N. Para determinar el color del triestímulo en las uvas (valor de luminosidad L *, canales de color a * y b *) se utilizó

un colorímetro de tableta (modelo CR-300, Minolta Co. Ltd, Osaka, Japón), mientras que para determinar la intensidad del color en los vinos y el total fenoles se utilizó el espectrofotómetro uv-vis (Thermo Scientific GENESYS 10S) por el método de Glories. Finalmente para calcular el rendimiento, los racimos cosechados fueron pesados y cuantificados por planta.

3.2.3.2 Vinificación

Las uvas cosechadas se vinificaron por tratamiento a una temperatura ambiente de 20 ° C y bajo luz roja. Se añadió metabisulfito de potasio a los mostos en una concentración de SO₂ de 50 mg.L⁻¹ y 24 h después se inoculó con *Saccharomyces cerevisiae* enológica (Lallemand, oenology BM 4X4) una proporción de 20 g.hL⁻¹. Durante la fermentación alcohólica, se monitorizó la temperatura y la disminución de ° brix hasta que se terminó la fermentación. Los vinos fueron prensados y sometidos a fermentación maloláctica a temperatura controlada a 20 ° C y sometidos a un proceso motorizado. Una vez terminada la fermentación maloláctica, se procedió a embotellar dejando en obscuridad las botellas durante 15 meses hasta su posterior análisis de polifenoles. A los vinos se les midió el contenido de alcohol, pH, acidez titulable e intensidad de color (CI) de acuerdo a métodos internacionales (OIV, 2013).

3.2.4. Determinación de polifenoles

3.2.4.1 Extracción y preparación

Para la extracción de polifenoles en baya, se homogenizaron en Ultra Turrax (IKA T18) 3.0 g de bayas trituradas con 40 mL de una mezcla de acetona/agua/ácido trifluoroacético (AWT) en proporciones 70.9:29.9: 0.1 v/v a una velocidad constante de 1000 rpm durante 1 minuto. Después las muestras se vortexearon por espacio de 5 minutos, para después someterlas a sonicación por espacio de 5 minutos. Después la mezclas se filtró a través de papel filtro Whatman No. 4 y adicionando otros 40 mL de AWT hasta decolorar la baya triturada. El extracto obtenido fue sometido a roto evaporación (39 °C) para eliminar la fase acetona. El extracto remanente se aforó a 50 mL con ácido trifluoroacético al 0.01%. Finalmente, el extracto fue filtrado a través de membranas (0.45 µm) y almacenados en viales ámbar para el subsecuente análisis.

Por otro lado, para los análisis del vino, se centrifugaron 9.0 mL a 5000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 25 °C. El sobrenadante fue recuperado y se realizaron diluciones de 1:50, después las muestras fueron filtradas a través de acrodiscos con membranas de 0.20 µm y almacenarlas en viales ámbar para su posterior análisis.

3.2.4.2 Análisis de polifenoles totales y por HPLC-DAD

Los fenoles totales se determinaron mediante espectrofotometría uv-vis utilizando para la técnica folin ciocalteau y curvas de ácido gálico para su cuantificación. Los fenoles individuales fueron analizados a través de HPLC-DAD (Agilent 1200 series HPLC, Agilent Palo Alto, Ca, USA) con un detector de arreglo de diodos (Ymc Inc. Miliford, Ma, USA), utilizando como fase móvil acetonitrilo y ácido acético a 2% con flujos de 1.0 mL/min y con gradientes reportados en Ornelas-Paz et al., (2017). Los fenoles se detectaron en un rango de λ de 280 hasta 520 nm y para la cuantificación se utilizaron curvas de calibración de con estándares de cada compuesto identificado.

3.2.5 Estadísticos

El diseño estadístico utilizado fue un bloques completamente al azar y análisis de varianza con comparación de medias, los resultados fueron analizados por cuadruplicado en el paquete estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute. Inc. Cary, N.C., USA, 2000), utilizando un nivel de significancia de 0.05.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Influencia del carbonato de calcio en rendimiento y fisicoquímicos de las bayas y sus vinos

El rendimiento de uvas Shiraz mostró variaciones como resultado de aplicación de CaCO₃ (Tabla 1). Incremento mayor al 50% en vides tratadas con CaCO₃ en comparación con las vides control. Por otro lado, el contenido de fenoles totales mostró incrementos superiores a 300% en vides tratadas con CaCO₃. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje probable de alcohol, los sólidos solubles totales, pH y acidez titulable.

Tabla 1. Efecto del CaCO₃ sobre Rendimiento y parámetros fisicoquímicos de las bayas.

		Uvas	
		CaCO ₃	Control
Rendimiento (Ton Ha⁻¹)		4.89 a	1.98 b
Color CIELab	<i>L*</i>	31.12 a	29.81 a
	<i>a*</i>	2.770 a	2.87 a
	<i>b*</i>	0.460 a	0.47 a
Sólidos solubles totales (°brix)		20.15 a	20.24 a
pH		3.30 a	3.34 a
Acidez titulable		7.35 a	7.35 a
Fenoles totales		4.56 a	1.45 b

Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos para el mismo parámetro evaluado.

La evaluación del vino mostró diferencias como resultado de la aplicación de CaCO₃ en las uvas (Tabla 2). Los vinos provenientes de uvas tratadas con CaCO₃, mostraron tener menor acidez y mayor pH, además de mayor contenido en fenoles y antocianinas totales en comparación con los vinos elaborados de uvas control.

Además, de la intensidad de color fue estadísticamente mayor en vinos CaCO_3 que en los vinos obtenidos del tratamiento control.

Tabla 2. Efecto de la aplicación de CaCO_3 en bayas sobre los parámetros fisicoquímicos del vino.

	Vinos	
	CaCO_3	Control
% Alcohol (v/v)	11.8 a	11.8 a
pH	3.54 a	3.32 b
Acidez titulable	7.48 b	7.72 a
Intensidad de Color	5.998 a	4.259 b
Tonalidad	0.0085 a	0.0080 b
Fenoles totales	3.10 a	2.72 b

Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas

3.3.2 Efecto del carbonato de calcio sobre los compuestos fenólicos individuales de las bayas y los vinos

Los compuestos fenólicos individuales mostraron en su mayoría incrementos en bayas tratadas con CaCO_3 y en sus vinos en comparación con bayas y vinos control (Tabla 3). Los ácidos fenólicos encontrados en bayas mostraron mayor concentración de los ácidos caftárico, protocatecuico y *trans*-cinámico en bayas cosechadas del tratamiento CaCO_3 , mientras que en el vino, el perfil de ácido fenólicos mostró la aparición de ácidos caféico, clorogénico y siríngico, aunque los que ácidos fenólicos que mostraron tener la mayor concentración en los vinos provenientes de uvas CaCO_3 , fueron los ácidos caftárico y caféico, mientras que los ácidos gálico, clorogénico y siríngico mostraron mayor concentración en vinos control.

Tabla 3. Efecto de la aplicación de CaCO₃ sobre los compuestos fenólicos individuales en bayas y en sus vinos.

Compuestos	Uva		Vino	
	CaCO ₃	Control	CaCO ₃	Control
Ácidos fenólicos				
Ácido gálico	556.4 a	598.2 a	28.44 b	42.63 a
Ácido caftárico	53.11 a	27.99 b	16.44 a	4.974 b
Ácido protocatecuico	6.445 a	4.340 b	Nd	Nd
Acido cinámico	19.15 a	1.564 b	Nd	Nd
Ácido caféico	Nd	Nd	14.06 a	12.63 a
Ácido cloro génico	Nd	Nd	0.710 b	1.138 a
Ácido siríngico	Nd	Nd	4.899 b	11.59 a
Flavonoles				
Quercetina-3-β-glc	Nd	Nd	1.508 a	1.481 a
Quercetina-3-glc	Nd	Nd	10.79 a	10.87 a
Quercetina	Nd	Nd	19.83 a	5.034 b
Mirecetina	Nd	Nd	4.897 a	6.712 a
Kaempferol	Nd	Nd	3.988 a	4.501 a
Isoranmetina	Nd	Nd	4.434 a	4.135 a
Flavanoles				
Catequina	88.84 a	34.87 b	26.37 a	24.15 a
Epicatequina	92.06 a	52.45 b	67.30 b	86.91 a
Procianidina B1	282.1 a	148.7 b	300.6 a	231.2 b
Procianidina B2	63.65 a	25.68 b	163.3 a	44.11 b
Antocianinas				
Malvidina-3-glc	688.6 a	242.2 b	123.2 a	105.8 b
Cianidina-3-Gal	124.1 a	42.56 b	Nd	Nd
Cianidina-3-glc	63.92 a	30.33 b	52.49 b	56.17 a
Pelargonidina-3-glc	50.14 a	23.94 b	8.961 a	4.784 b
Estilbeno				
Resveratrol	8.949 a	6.385 b	8.742 a	3.692 b

Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas entre tratamientos.

En el contenido de flavonoles no fueron detectados en las bayas, pero si en los vinos, de los seis compuestos identificados, solamente la quercetina mostró incrementos en relación 4:1 en la concentración de los vinos elaborado con bayas CaCO_3 .

Los flavanoles encontrados en las bayas, mostraron mayor concentración en las bayas tratadas con CaCO_3 en comparación con los controles, sin embargo en sus vinos, tanto la Catequina como la epicatequina mostraron mayor concentración en los vinos CaCO_3 y procianidina B2 en los vinos control. Sin embargo en el perfil de antocianinas identificadas, solamente la malvidina-3-glucósido y la pelargonidina-3-glucosido mostraron mayor concentración en vinos CaCO_3 , mientras que la concentración de cianidna-3-glucósido fue mayor en vinos control. Finalmente el contenido de resveratrol se mantuvo con mayor concentración tanto en las bayas CaCO_3 y en sus vinos en comparación con el control.

Las bayas tratadas con solución de 1% de CaCO_3 y sus vinos, mostraron efectos sobre su rendimiento, fenoles totales e individuales. El incremento en el rendimiento de las bayas está relacionado con el incremento de peso de los racimos, similares resultados fueron reportados en uvas de mesa tratadas con fertilizantes foliares con contenidos de CaCO_3 en su formulación (Sabir et al., 2014). El Ca como parte de la pared celular, permite mayor rigidez a su estructura evitando la deshidratación de los frutos y la pérdida de peso.

A pesar de que los parámetros de SST, pH y AT no tuvieron efectos sobre las bayas para el tratamiento, ni el control, en el vino si mostraron diferencias. Los vinos CaCO_3 fueron estadísticamente menos ácidos y con mayor tonalidad que lo control, mientras que la intensidad de color, fue superior en vinos control, que puede estar relacionada con los resultados obtenidos de algunos fenoles individuales.

El contenido de fenoles totales en bayas, demostraron similitud con previas investigaciones realizadas sobre uvas de mesa, cerezas y frutos de olivos (Al-Qurashi & Awad, 2013; Wang et al., 2014; Squeo et al., 2016). Incremento en concentración de fenoles totales en frutos tratados con CaCl_2 o CaCO_3 . Además en

los vinos CaCO_3 de nuestra investigación, se mostró incremento también en fenoles totales, pesar de que no existe información del impacto del calcio sobre presencia d fenoles torales en los vinos, si hay información donde aplicaciones exógenas de ABA o jasmonatos sobre las vides, incrementan los fenoles totales en sus vinos (Xi et al., 2012; Zhu et al., 2016; Portu et al., 2018), demostrando que aplicaciones de ácido abscísico o jasmonatos incrementa la concentración de fenoles totales, principalmente antocianinas en aplicaciones de ABA y de resveratrol con jasmonatos.

El incremento de ácidos fenólicos en bayas CaCO_3 , se observó en los ácidos protocatecuico, *trans*-cinámico y caftárico, mientras que en sus vinos se presentó en los ácidos caftárico y caféico, estos resultados contrastan con los resultados obtenidos en investigaciones donde elaboraron vinos con bayas tratadas con ABA (Luan et al., 2014), ellos no encontraron incremento en este tipo de ácidos fenólicos en contraste con nuestra investigación, de manera común, se ha demostrado que el ácido caféico contribuye a la estabilización y protección contra la oxidación de los vinos tintos (Darias-Martín et al., 2002), mientras que el ácido caftárico es considerado como el mejor compuesto fenólico no flavonoide encontrado en jugos y vinos de uvas cuya maceración se realiza bajo presencia de sustancias antioxidantes como los sulfitos (Singleton et al., 1984), su concentración típica en uvas es de 100 mg.L^{-1} , aunque puede ser diferente debido a los varietales (Cheynier et al., 1986). Por lo que la presencia de ambos ácido fenólicos en mayor concentración en vinos CaCO_3 , pudiera demostrar que es de impacto positivo para la calidad de los vinos.

Por otro lado, el contenido de flavonoles solamente detectados en los vinos, mostraron incremento en el contenido de quercetina en vinos CaCO_3 . Similares a los resultados obtenidos en vinos obtenidos de uvas tratadas con ABA (Luan et al., 2014), ése flavonol, junto con otros flavanoles y resveratrol, ha sido de gran importancia en la salud ya que interactúan en conjunto con gran potencial antioxidante (Lacopini et al., 2008). Por lo tanto al analizar en contenido de

flavanoles, se observó que el mayor incremento de catequinas y procianidinas B1 y B2, se mantuvo en las bayas y vinos CaCO_3 en comparación con el control, similares a los resultados de vinos elaborados con uvas tratadas con ABA, o jasmonatos (Luan et al., 2014; Gil-Muñoz et al., 2017). Donde han demostrado que tiene efecto positivo al incrementar las concentraciones de algunos flavanoles en uvas con tratamiento en comparación con el control. Por lo tanto los resultados de nuestra investigación se pudieran atribuir a que existe la probabilidad de que el calcio actué sobre ABA y jasmonatos sintetizados en la planta y por lo tanto en los flavonoles y flavanoles antes mencionado.

Por otro lado, el perfil de antocianinas, fueron similares en las bayas Shiraz y en sus vinos, a excepción de la cianidina 3-galactósido que no fue detectada en los vinos, ya que posiblemente el perfil cambió a otro tipo de antocianina que aparece en el cromatograma pero no ha sido identificada. Sin embargo, las antocianinas malvidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido mantuvieron la mayor concentración en los vinos CaCO_3 que en control, aunque la antocianina cianidina 3-glucósido mostró mayor concentración en vinos control. Por lo tanto los resultados son similares a los reportados en diversas investigaciones, donde realizaron aplicaciones de ABA y CaCl_2 en uva, cerezas y fresas (Wang et al., 2014; Xu et al., 2014; Yamamoto et al., 2015), además similares a los resultados encontrados en vinos elaborados con frutos tratados con ABA y jasmonatos (Luan et al., 2014; Portu et al., 2018). Los resultados observados pudieran demostrar que aplicaciones exógenas del CaCO_3 pudieran estar afectando el contenido de ABA o jasmonatos y desencadenar a partir de estos, el incremento de síntesis de antocianinas. Por otro lado, el resultado de la intensidad de color mayor en los vinos control, puede estar relacionados con el color rojizo de las cianidinas (Negueruela et al., 1995), pues el método Glories utilizado para determinar la intensidad de color en esta investigación, incluye la zona roja del espectro en contraste con las coloraciones naranja teja de la pelargonidina o el morado de la malvidina.

Finalmente la concentración de resveratrol superior en uvas y vinos CaCO_3 es similar con los resultados obtenidos en previas investigaciones con aplicaciones

exógenas de ABA en vides (Ban et al., 1998), donde reportaron incremento en el contenido de resveratrol, pero solamente en las bayas, esto se puede atribuir a que existe la posibilidad de que el calcio afecte la síntesis de ABA de manera natural en la vid sin realizar aplicaciones exógenas de ésta fitohormona, sin embargo también se sabe que existen investigaciones (Wang et al., 2016) donde no se ha encontrado efecto de aplicaciones de ABA sobre el resveratrol, por lo que el efecto del ABA sobre la síntesis de resveratrol, no es aún clara, ya que no se ha reportado incremento de resveratrol en vinos, pero si en vinos cuyas bayas fueron tratadas con jasmonatos (Portu et al., 2018), esto es porque se conoce que los estilbenos como el resveratrol están más relacionados con la presencia de jasmonatos que al ABA (Righetti et al., 2007; Santamaria et al., 2011). Los jasmonatos se sintetizan en zarcillos ante respuesta de un estrés biótico y el ABA se encuentra tanto en raíces como en hojas ante un estrés abiótico, sin embargo, ambas fitohormonas pudieran responder a la presencia del calcio como mensajero secundario ante un estrés biótico y abiótico.

3.4 CONCLUSIONES

En conclusión, este trabajo demuestra que los residuos de la industria cementera con contenido de calcio, incrementaron la concentración de diversos compuestos fenólicos como antocianinas, flavanoles, ácidos fenólicos y estilbeno en sus bayas al momento de la cosecha, A pesar de que en los vinos se demostró que las antocianinas malvidina y pelargonidina fueron superiores en su concentración en los vinos CaCO_3 , mientras que la cianidina fue superior en los vinos control, lo que permitió proporcionarle al vino mayor intensidad de color. Sin embargo en el contenido de ácidos fenólicos como el caftárico y caféico, fue superior en los vinos CaCO_3 , proporcionando mayor protección contra la oxidación a este tipo de vinos, finalmente se demostró que la catequina y las procianidinas B1 y B2 mantuvieron su concentración mayor para las bayas y vinos CaCO_3 , así como la concentración de resveratrol mayor en bayas y vinos control. Por lo tanto se pudiera demostrar que los residuos de calcio de la industria cementera, tienen impacto positivo para incrementar los compuestos fenólicos tanto en baya como en sus vinos.

3.5 LITERATURA CITADA

- Al-Qurashi, A.D., & Awad, A. (2013). Effect of pre-harvest calcium chloride and ethanol spray on quality of 'El-Bayadi' table grapes during storage. *Vitis*, 52(2), 61-67.
- Ban, T., Shiozaki, S., Ogata, T., & Horiuchi, S. (1998). Effects of abscisic acid and shading treatments on the levels of anthocyanin and resveratrol in skin of Kyoho grape berry. *Acta Horticulturae*, 514, ISHS 2000. 83-89.
- Bautista-Ortín, A.B., Cano-Lechuga, M., Ruíz-García, Y., and Gómez-Plaza, E. (2014). Interactions between grape skin cell Wall material and commercial oenological tannins. Practical implications. *Food Chemistry*, 152, 558-565.
- Caprio, J.M., & Quamme, H.A. (2002). Weather conditions associated with grape production in the Okanagan valley of British Columbia and potential impact of climate change. *Canadian Journal of Plant Science*, 189, 755-763.
- Cheyrier, V.F., Trousdale, E.K., Singleton, V.L., Salguesm M.J., & Wylde, R. (1986). Characterization of 2-s-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Afric. Food Chem.*, 34(2), 217-221.
- Darias-Martín, J., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventos, R., Días-Romero, C., & Boulton, R. (2002). Effect of Caffeic acid on the color of red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2062-2067.
- Gil-Muñoz, R., Bautista-Ortín, A.B., Ruíz-García, Y., Fernández-Fernández, J.I., & Gómez-Plaza, E. (2017). Improving phenolic and chromatic characteristics of Monastrell, Merlot and Syrah wines by using methyl jasmonate and benzothiadiazole. *OENO One*, 51, 17-27.
- Jiang, Y., Wu, K., Lin, F., Qu, Y., Liu, X., & Zhang, Q. (2014). Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Planta*, 239, 565-575.
- Kazan, K. (2015). Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends Plant Science*. 20(4), 219-229.
- Kondo, S., Tomiyama, H., Rodyoung, A., Okawa, K., Ohara, H., Sugaya, S., Terahara, N., & Hirai, N. (2014). Abscisic acid metabolism and anthocyanin

synthesis in grape skin are effected by light emitting diode (LED) irradiation at night. *Journal of Plant Physiology*. 171, 823-829.

- Koyama, R., Marinho de Assis, A., Yamamoto, L.Y., Borges, W.F., & Borges, R.S. (2014). Exogenous abscisic acid increases the anthocyanin concentration of berry and juice from 'Isabel' grapes (*Vitis labrusca* L.). *Hortscience*, 49, 460-464.
- Lacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., & Sebastiani, L. (2008). Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 589-598.
- Luan, L.Y., Zhang, Z.W., Xi, Z. M., Huo, S.S., & Ma, L.N. (2014). Comparison the effects of exogenous abscisic acid on the phenolic composition of 'Yan' and 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) wines. *Eur Food Res Technol*, 239 (2), 203-213.
- Meng, J.F., Ning, P.F., Xu, T.F., & Zhang, Z.W. (2013). Effect of rain-shelter cultivation of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Gernischet on the phenolic profile of berry skins and the incidence of grape diseases. *Molecules*, 18, 381-397.
- Negueruela, A.I., Echávarri, J.F., & Pérez, M.M. (1995). A study of correlation between enological colorimetric indexes and CIE colorimetric parameters in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45 (3), 353-356.
- OIV. (2018). International Organisation of Vine and Wine. Statistical report on world vitiviniculture. 1-27. <http://www.oiv.int/public/medias/6371/oiv-statistical-report-on-world-vitiviniculture-2018.pdf>
- Ornelas-Paz, J.J., Quintana-Gallegos, B.M., Escalante-Minakata, P., Reyes-Hernández, J., Pérez-Martínez, J.D., Ríos-Velasco, C., & Ruiz-Cruz, S. (2017). Relationship between the firmness of Golden delicious apples and the physicochemical characteristics of the fruits and their pectin during development and ripening. *Journal of Food Science and Technology*.55, 33-41.
- Portu, J., Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., & Garde-Cerdán, T. (2015). Methyl jasmonate foliar applications to Tempranillo vineyard improved grape

- and wine quality phenolic content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63, 2328-2337.
- Righetti, L., Franceschetti, M., Ferri, M., Tassoni, A., & Bagni, N. (2007). Resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspensions treated with several elicitors. *Caryologia*, 60(1), 169-171.
- Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M.A. & Goksu, N. (2014). Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Horticulturae* 175, 1-8.
- Saito, Sh., Hirai, N., Matsumoto, Ch., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., & Mizutani, M. (2004). Arabidopsis CYP707As encode (+)- abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant physiology*, 133, 1439-1449.
- Santamaria, A. R., Mulinacci, N., Valletta, A., Innocenti, M., & Pasqua, G. (2011). Effects of elicitors on the production of resveratrol and viniferins in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9094-9101.
- Singleton, V.L., Zaya, J., Trousdale, E., & Salgues, M. (1984). Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis*, 23, 113-120.
- Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso, V.M., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europea* L. cv. Coratina). *Food Chemistry*, 209, 65-71.
- Vezzulli, S., Civardi, S., Ferrari, F., & Bavaresco, L. (2007). Methyl jasmonate treatment as trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 58(4), 530-533.
- Vishwakarama, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M., & Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8(161), 1-12.

- Wang, J., Wang, S., Liu, G., Edwards, E. J., Duan, W., Li, S., & Wang, L. (2016). The synthesis and accumulation of resveratrol are associated with veraison and abscisic acid concentration in beihong (*Vitis vinifera* × *Vitis amurensis*) berry skin. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-11.
- Wang, Y., Xie, X., & Long, L.E. (2014). The effect of postharvest calcium application in hydro-cooling water on tissue calcium content, biochemical changes, and quality attributes of sweet cherry fruit. *Food Chemistry*, 160, 23-30.
- Xi, Z.M., Meng, J.F., Huo, S.S., Luan, L.Y., Ma, L.N., Zhang, Z. W. (2012). Exogenously applied abscisic acid to Yan73 (*V. vinifera*) grapes enhances phenolic content and antioxidant capacity of its wine. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(4), 444-451.
- Xu, W., Peng, H., Yang, T., Whitaker, B., Huang, L., Sun, J., & Chen, P. (2014). Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 289-298.
- Yamamoto, L.Y., Marinho de Asis, A., Roberto, S.R., Bovolenta, Y.R., Nixdorf, S.N., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2015). Application of abscisic acid (s-ABA) to cv. Isabel grapes (*Vitis vinifera* *Vitis labrusca*) for color improvement: effect on color, phenolic composition and antioxidant capacity of their grape juice. *Food International Research*, 77(3), 579-583.
- Zhu, L., Zhang, Y., Zhang, W., & Lu, J. (2016). Effects of exogenous abscisic acid on phenolic characteristics of red *Vitis vinifera* grapes and wines. *Food Science and Biotechnology*, 25, 361-370.
- Zou, J.J., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W.X., Song, L.F., Zhang, W.Z., & Wu, W.H. (2015). Arabidopsis calcium-dependent protein kinase8 and catalase3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell*, 27(5), 1445-146.

**CAPÍTULO IV. EFECTO DEL ANILLADO Y LA ELIMINACIÓN DE HOJAS EN EL
RENDIMIENTO Y LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DE LAS UVAS CABERNET
SAUVIGNON**

Effect of girdling and leaf removal on the yield and volatile composition of Cabernet Sauvignon grapes

IRMA O. MAYA-MERAZ¹), JOSÉ DE JESÚS ORNELAS-PAZ²), ALEJANDRO CABELLO-PASINI³), NORA A. SALAS-SALAZAR¹), JUAN-LUIS JACOBO-CUÉLLAR¹), MARITZA RAMÍREZ-CORIA¹), JUAN MANUEL SOTO-PARRA¹), RAMONA PÉREZ-LEAL¹)*

¹Laboratorio de Fisiología Vegetal y Frutales de Clima Templado, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Chihuahua, Chihuahua, México.

²Laboratorio de Fitoquímicos y Nutrientes, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

³Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Ensenada, Baja California, México.

(*corresponding author); Dr. RAMONA PÉREZ-LEAL, Departamento de Fisiología Vegetal y Frutales de Clima Templado, Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Chihuahua, Chihuahua, México. E-mail: ramonapleal@gmail.com

RESUMEN

Se sabe que técnicas sobre el dosel de la vid como raleo de hoja, raleo apical o el anillado, influyen en la calidad de las uvas, sin embargo, el efecto de la combinación de ambas técnicas en la composición de las uvas ha recibido poca atención. Vides Cabernet Sauvignon fueron anilladas, sometidas a raleo de hoja y a la combinación de anillado y raleo apical. Las vides control no fueron sometidas a ningún manejo de dosel. Los frutos obtenidos fueron evaluados en cuanto a calidad y rendimiento. Se observó que el la combinación de anillado y raleo apical causaron un incremento en el contenido de sólidos solubles totales, así como una reducción en la acidez titulable y rendimiento. Los frutos control mostraron mayor concentración de compuestos volátiles relacionados con aromas herbáceos, mientras que el anillado con el raleo apical, favoreció a la síntesis de otros compuestos volátiles adicionales. Los resultados demostraron que los tipos de manejo de dosel estudiados favorecen la calidad de uvas.

Palabras clave: aromáticos, anillado, raleo, producción, *Vitis vinifera*

ABSTRACT

It is known that techniques on the canopy of the vine such as leaf removal, apical thinning or girdling, influence the quality of the grapes, however, the effect of the combination of both techniques on the composition of the grapes has received little attention. Cabernet Sauvignon vines were girdled, subjected to leaf removal and the combination of girdling and apical thinning. Control vines were not subjected to any canopy handling. The fruits obtained were evaluated for quality and yield. It was observed that the combination of girdling and apical thinning caused an increase in the content of total soluble solids, as well as a reduction in titratable acidity and yield. The control fruits showed a higher concentration of volatile compounds related to herbaceous aromas, while the girdling with apical thinning favored the synthesis of other additional volatile compounds. The results showed that the types of canopy management studied favor the grapes quality.

Keywords: aromatics, girdling, thinning, production, *Vitis vinifera*

4.1 INTRODUCCIÓN

El conjunto de factores climáticos y prácticas agronómicas determinan la calidad de la uva y sus vinos (Hunter y Bonnardot 2011). Específicamente, el manejo del dosel de la vid puede generar microclimas que mitigan cambios extremos de temperatura e irradiancia que finalmente mejoran las características químicas de los frutos (Viguié *et al.* 2014). El deshoje basal y el despunte del dosel (headging) de la vid son técnicas agronómicas comunes que permiten balancear el área foliar y la carga frutal. Además, estas prácticas incrementan la exposición de la fruta a la luz lo que modifica la síntesis de aminoácidos y ácidos grasos que actúan como precursores de compuesto volátiles involucrados el aroma de uvas y vinos (Song *et al.*, 2015). El deshoje y el despunte de la vid generalmente se llevan a cabo durante las etapas de desarrollo de la baya y después del envero, cuando la acumulación de sólidos solubles en las bayas sobrepasa los 15 °Brix (Zhang *et al.*, 2017). Por otro lado, el anillado (girdling) es una técnica que consiste en cortar una parte de la corteza del tronco o brazo de las plantas para bloquear el flujo de floema de las hojas hacia las raíces. Lo anterior incrementa la concentración de fotosintatos en el fruto, pero por otro lado no afecta la conducción de agua y nutrientes de las raíces hacia el resto de la planta (Ferrara *et al.*, 2014; Soltekin *et al.*, 2015). El anillado del tronco y sarmientos es una práctica común en las uvas de mesa, sin embargo, poco se sabe sobre los efectos del anillado sobre las características químicas y la concentración de compuestos volátiles en la uva para vino.

Se sabe que tanto la remoción de hojas como el anillado tienen un impacto en la fisiología de la vid y en la composición química de la baya. La concentración de pigmentos en la piel de uva “Kyoho”, por ejemplo, se incrementa significativamente como resultado del anillado de los sarmientos (Li *et al.*, 2015). Se ha demostrado también que el anillado de los sarmientos generalmente resulta en un incremento de la concentración de sólidos solubles, la concentración de antocianos, y del tamaño y peso de las bayas de uva de mesa (Jensen 1975; Carreño *et al.*, 1998; Abu-Zahra 2010; Eltom *et al.*, 2013). Sin embargo, existe poca información sobre el impacto del anillado sobre las características químicas en la

uva para vino. Más aún, se desconoce el efecto de esta técnica de manejo sobre la concentración de compuestos aromáticos en la uva.

La remoción de hojas basales de los sarmientos juega un papel crítico en el microclima del dosel. Esta práctica de manejo, por ejemplo, aumenta significativamente la velocidad del viento alrededor de los racimos y reduce la humedad relativa bajo el dosel (English *et al.*, 1990). Por lo anterior, la remoción de hojas basales es una práctica común para reducir la incidencia de hongos como *Botrytis cinerea* y *Erysiphe necator* (English *et al.*, 1990; Austin y Wilcox, 2011). Además de reducir las infecciones por hongos, la remoción de hojas alrededor del racimo incrementa sustancialmente la concentración de sólidos solubles, la concentración de antocianos y la concentración total de polifenoles en las bayas (Gatti *et al.*, 2012). Por ejemplo, la concentración de cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, y malvidin-3-glucoside en bayas de Pinot noir aumentaron significativamente cuando las vides fueron deshojadas en relación con el control (Lee y Skinkis, 2013).

El manejo del dosel en el viñedo también impacta la concentración de moléculas volátiles que generan aromas negativos y positivos en las uvas para vino. Por ejemplo, la concentración de methoxypyrazines, que generan aromas negativos de pimiento morrón, espárrago, pasto y aromas vegetativos, decrecen cuando las bayas son expuestas a la luz como consecuencia de una reducción de follaje alrededor de los racimos (Mosetti *et al.*, 2016). Específicamente, estudios han demostrado que la concentración de 3-isobutyl-2-methoxypyrazine en las bayas de Cabernet Franc se redujeron en aproximadamente 50% como resultado de la remoción de hojas basales, con relación a los controles (Ryona *et al.*, 2008; Mosetti *et al.*, 2016). Por el contrario, el deshoje basal de los sarmientos ha demostrado generar un aumento en la concentración de moléculas volátiles consideradas positivas. La remoción de hojas alrededor de los racimos en Pinot noir, por ejemplo, aumentó significativamente la concentración de β -damascenone, la molécula que aporta aromas de rosa en los vinos (Feng *et al.*, 2015). De igual manera, la remoción de hojas en uvas Tempranillo aumentó significativamente la concentración de Ethyl octanoate, 3-methylbutyl acetate y otras moléculas volátiles que aportan aromas

frutales a los vinos (Vilanova *et al.*, 2011). Desafortunadamente poco se sabe sobre los efectos del deshoje, el anillado y la remoción de hojas apicales o despunte de la vid, sobre la concentración de moléculas volátiles en las uvas. En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del deshoje, el anillado y el despunte de sarmientos sobre la composición química y concentración de volátiles en uvas Cabernet Sauvignon.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

El estudio se realizó en 2016 en un viñedo experimental de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua (latitud 28° 26' 50"). La temperatura máxima ambiental promedio durante el periodo de crecimiento fue de 27°C y la humedad de 58%, mientras que la precipitación acumulada durante el periodo de envero a cosecha fue de 154 mm. Vides Cabernet Sauvignon sobre portainjerto 110-R con conducción a cordón unilateral, y espacio entre plantas de 1 m y de 3 m entre hileras fueron utilizadas en este estudio. Se utilizaron seis vides por tratamiento, tomando en cuenta la planta como unidad experimental. El anillado se realizó retirando un anillo de 1 cm de ancho de corteza del brazo (T2), el deshoje consistió en retirar 10 cm de hojas basales alrededor de los racimos al momento del envero (T3) y la combinación de anillado + despunte del sarmiento (T4) se realizó cuando los frutos alcanzaron 18°Brix (237 GD). El grupo control estuvo conformado por vides sin deshoje, despunte o anillado (T1).

4.2.2 Físicoquímicos de las uvas

A partir del envero se recolectaron semanalmente y de manera aleatoria 250 bayas de la parte media de 40 racimos por tratamiento. Las uvas se maceraron y el jugo obtenido se evaluó en cuanto al contenido de sólidos solubles totales (SST) por refractometría, acidez titulable (AT) mediante titulación con NaOH 0.1N y el pH mediante potenciometría (Denver Instruments, USA). Durante la vendimia, se evaluó el rendimiento y peso de los racimos, con lo que calculó el rendimiento total de producción por planta. Los racimos se llevaron al laboratorio y se prensaron a una temperatura de 12 °C. Se colectaron las muestras de mosto en viales de 20 ml por tratamiento por triplicado y se mantuvieron a una temperatura de -78 ± 2 °C hasta ser evaluadas en cuanto a su contenido de compuestos volátiles.

4.2.3 Compuestos volátiles

Se colocó 2 mL de mosto en un vial de 4 mL con 0.65g de NaCl. Los compuestos volátiles se recuperaron del espacio de cabeza mediante adsorción por 1 h en una fibra de sílice cubierta por polidimetilsiloxano/divinilbenceno (0.65 μ m) mediante

microextracción en fase sólida (SPME, Supelco, Co, Bellefonte, PA, USA). La desorción de los compuestos volátiles se llevó a cabo dentro del inyector de un sistema de Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS, Agilent Technologies 7890B con un detector de masas 5977A MSD) manteniendo la fibra en el inyector en modo splitless a 200 °C durante 15 min. Los compuestos volátiles se separaron en una columna DB-WAX (60 m × 0.250 mm I.D., 0.25 µm film thickness, Agilent, USA). Helio al 99.999% de pureza fue usado como gas acarreador a un flujo de 30 cm/s. La temperatura inicial del horno fue de 33 °C por 5 minutos, se incrementó a 50 °C a razón de 2 °C/min, y nuevamente incremento hasta 250 °C a razón de 5 °C/min, y finalmente se mantuvo la temperatura durante 6.5 min. Los espectros de masas se obtuvieron por ionización electrónica a 70 eV. Las temperaturas para la línea de transferencia fueron de 250 °C y para la trampa de iones de 180 °C. Para la identificación de los compuestos volátiles, se compararon los espectros de masas contra los reportados en la base de datos estandarizada de la biblioteca NIST (chemistry WebBook) y el cromatograma de estándares (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). Los resultados se expresaron en porcentaje relativo tomando en cuenta el área de cada compuesto y divididos entre la sumatoria de las áreas totales de los compuestos identificados (Gutiérrez-Gamboa et al., 2019). Cada análisis fue realizado por triplicado.

4.2.4 Análisis estadístico

El experimento se realizó bajo un diseño de bloques completamente al azar. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía después de comprobar la normalidad y homocedasticidad de los datos. Se realizó una prueba a posteriori de comparación de medidas mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) empleando el paquete estadístico SAS V 9.0.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Componentes de rendimiento

La floración de las vides se presentó a los 382 grados día (growing degree days), el cuaje o amarre (fruit set) se observó a los 451 grados día, y el envero se presentó a los 967 grados día en todos los tratamientos. Por otro lado, la maduración ($>18^{\circ}$ Bx) en el control se presentó a los 1221 grados día, mientras que la cosecha de todos los tratamientos se realizó a los 1494 grados día. En la fecha de cosecha todos los tratamientos habían alcanzado niveles de sólidos solubles superiores a los 21° Bx.

El rendimiento total y el peso de los racimos fluctuaron significativamente ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos de manejo con relación al control (Fig. 1). El rendimiento total fue mayor en el control, con respecto al resto de los tratamientos. El peso de racimos disminuyó aproximadamente 50 % ($p < 0.05$) en las vides que fueron anilladas + despuntadas, con relación a los otros tratamientos.

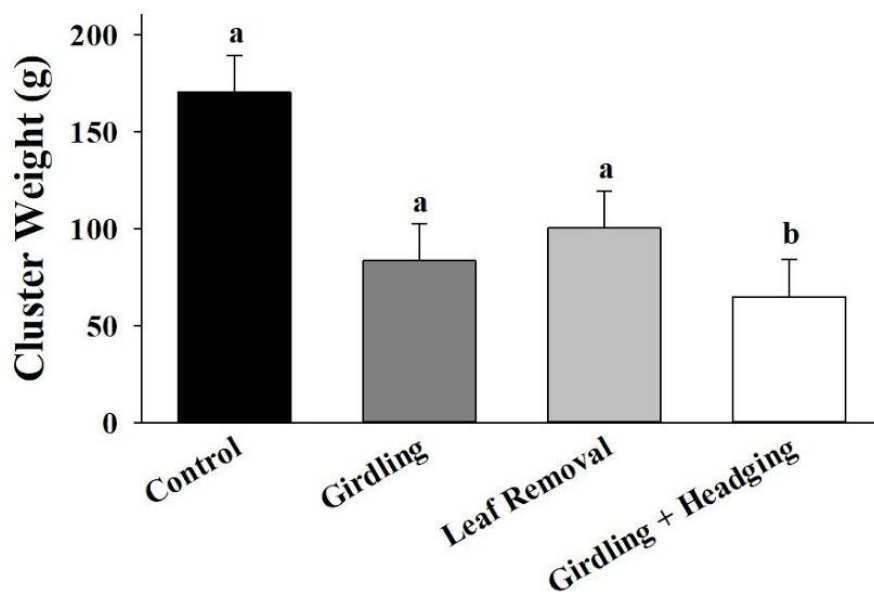


Figura 1. Efecto del anillado, deshoje basal y anillado más despunte sobre el peso de los racimos en uvas Cabernet Sauvignon/110-R.

4.3.2 Calidad fisicoquímica de las uvas

Las características químicas de las uvas fluctuaron significativamente en relación al tratamiento de manejo del dosel (Fig. 2). El contenido de SST fue significativamente mayor ($p<0.05$) al final del experimento en las vides que fueron anilladas + despuntadas, y menor en el control y las vides con deshoje basal. La acidez total fue relativamente similar en todos los tratamientos a lo largo del periodo de maduración, sin embargo, los controles terminaron con los mayores niveles ($p<0.05$) de acidez con relación a los tratamientos de deshoje o anillado.

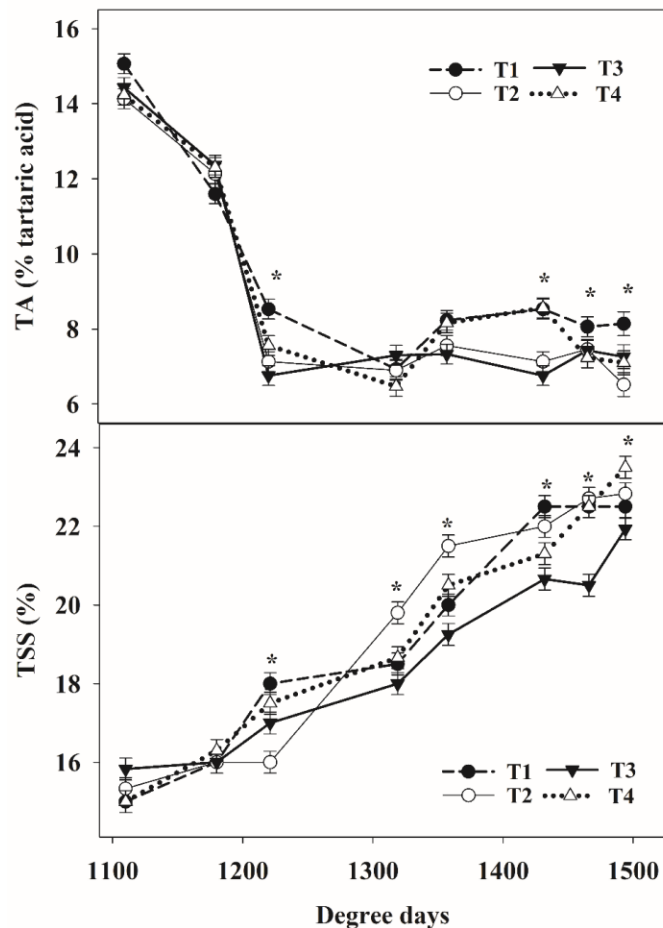


Figura 2. Influencia de los diferentes manejos del dosel sobre los parámetros fisicoquímicos de las bayas.

4.3.3 Concentración relativa de compuestos volátiles

Se identificaron 16 compuestos volátiles pertenecientes a diferentes grupos químicos en los mostos de las uvas cosechadas (Tabla 1). Se identificaron cinco aldehídos, cuatro alcoholes, cuatro ésteres y tres moléculas de otros grupos (Oxyme methoxy phenyl, Oxalic acid y 1-hydroxy-2-propanona). Los frutos de las vides control, los de vides deshojadas, y con la combinación de anillado + despunte presentaron un perfil variable en la cantidad de sus compuestos volátiles (Tabla 1). Los aldehídos 1-Hexenal, 2-Hexenal (E), los alcoholes 2-Hexen-1-ol (E), 3 Hexen-1-ol (Z), 3 Methyl-1-butanol, y los Esters 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol-diisobutyrate y 2 Methyl-propanoic acid fueron detectados en todos los tratamientos, incluyendo el control. Sin embargo, los aldehídos Hidroxyacetaldehyde-dimer, Furfural, el ester Hexanoic acid- hexil ester y la α -hydroxyketone 1-Hydroxy-2-propanone solo fueron detectados en las vides con anillado + despunte. Finalmente, 5-Hydroxy-methyl-furfural y Oxyme methoxi phenyl solo se detectaron en los controles.

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados en los diferentes tratamientos y su descripción aromática.

Group	Volatile compound	Time retention (min)	Treatments were found volatile compound	Odour descriptive	Reference
Aldehydes	1-Hexanal	18.35	T1, T2, T3, T4	Green apple, grass like	Dixon & Hewett, 2000
	2-Hexenal (E)	24.07	T1, T2, T3, T4	Green-sharp	Dixon & Hewett, 2000
	Hidroxyacetaldehyde-dimer	27.25	T4	Green/Sharp	Dixon & Hewett, 2000
	Furfural	31.69	T4	Sweet , fruity, floral odor	Niu <i>et al.</i> , 2011; Meng <i>et al.</i> , 2011
	5-Hydroxy-methyl-furfural	53.44	T1	-----	
Alcohols	2-Hexen-1-ol (E)	30.11	T1, T2, T3, T4	Green fruity	Larsen & poll, 1992
	3 Hexen-1-ol (Z)	29.49	T1, T2, T3, T4	Strong fruity odor	Meng <i>et al.</i> , 2011

	3 Methyl-1-butanol	23.57	T1, T2, T3, T4	Chesse odor, nail polish	Fang <i>et al.</i> , 2015; Meng <i>et al.</i> , 2011
	4 Methyl 2-hexanol	20.17	T3	-----	
Esters	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol-diisobutyrate	42.04	T1, T2, T3, T4	Sickly sweet smell of emulsion paints	Yu & Kim, 2010
	Ethyl acetate	9.04	T2, T3, T4	Fatty ester odor	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Hexanoic acid- hexil ester	35.57	T4	Fruity/apple	Dixon & Hewett, 2000
	2 Methyl-propanoic acid	41.55	T1, T2, T3, T4	Fruity, silage sour	Larsen & Poll, 1992
Others	Oxyme methoxi phenyl	38.57	T1	-----	
	Oxalic acid	31.82	T1, T2, T3	-----	
	1-Hydroxy-2-propanone	26.78	T4	Alcoholic- fruity, malty	Niu <i>et al.</i> , 2011

Las concentraciones relativas de compuestos volátiles mostraron diferencias significativas en las bayas cosechadas de los diferentes tratamientos (Tabla 2). La concentración de 1-hexanal en el control, por ejemplo, fue de 7- a 16-veces mayor que la observada en los tratamientos de deshoje o anillado + despunte. De igual manera, la concentración de 2-hexenal (E) fue de 2- a 4-veces mayor en el control que en los distintos tratamientos. En contraste, 3-hexen-ol (Z) fue aproximadamente 6-veces mayor en las vides con deshoje basal que el control y los otros tratamientos. La concentración relativa del ethyl acetate, fue aproximadamente 7-veces mayor en las bayas cosechados del tratamiento combinado de anillado + despunte, en comparación con el resto de los tratamientos.

Tabla 2. Influencia de los diferentes manejos del dosel sobre la composición relativa (área ($/10^3$) de volátiles identificados en las bayas.

Volatile compounds	Treatments			
	T1	T2	T3	T4

Aldehydes				
1-Hexanal	199.74 ± 28.67a	12.75 ± 28.67 b	28.28 ± 28.67 b	12.72 ± 28.67 b
2-Hexenal (<i>E</i>)	13.23 ± 1.31 a	5.53 ± 1.31 b	3.08 ± 1.31 b	3.24 ± 1.31 b
Hidroxyacetaldehyde- dimer	ND	ND	ND	1.88 ± 0.25
Furfural	ND	ND	ND	0.45 ± 0.11
5-Hydroxy-methyl-furfural	0.37 ± 0.02	ND	ND	ND
Alcohols				
2-Hexen-1-ol (<i>E</i>)	8.09 ± 3.71 a	9.72 ± 3.71 a	15.26 ± 3.71 a	12.32 ± 3.71 a
3 Hexen-1-ol (<i>Z</i>)	1.33 ± 2.99 b	1.35 ± 2.99 b	7.79 ± 2.99 a	1.14 ± 2.99 b
3 Methyl-1-butanol	1.88 ± 0.73 a	2.13 ± 0.73 a	1.28 ± 0.73 a	2.99 ± 0.73 a
4 Methyl 2-hexanol	ND	ND	0.10 ± 0.002	ND
Esters				
2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol-diisobutyrate	3.73 ± 1.43 a	3.40 ± 1.43 a	5.15 ± 1.43 a	3.49 ± 1.43 a
Ethyl acetate	ND	0.68 ± 0.96 b	0.59 ± 0.96 b	4.63 ± 0.96 a
Hexanoic acid- hexil ester	ND	ND	ND	0.39 ± 0.001
2 Methyl-propanoic acid	5.82 ± 2.12 a	4.86 ± 2.12 a	7.67 ± 2.12 a	5.56 ± 2.12 a
Others				
Oxyme methoxi phenyl	0.32 ± 0.07	ND	ND	ND
Oxalic acid	1.33 ± 0.55 a	2.01 ± 0.55 a	1.59 ± 0.55 a	ND
1-Hydroxy-2-propanone	ND	ND	ND	1.06 ± 0.005

Different letters in the same row indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

La concentración relativa de aldehídos, alcoholes y ésteres varió significativamente entre tratamientos (Fig. 3). Además, los aldehídos fueron el grupo químico con mayor concentración en las bayas, y el mayor porcentaje de aldehídos fue significativamente superior ($p>0.05$) en bayas obtenidas del control en comparación con los diferentes tratamientos. Por otro lado, la concentración de alcoholes fue mayor en las vides con deshoje basal y menor en el control. Finalmente, no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) para el grupo de ésteres entre tratamientos y el control.

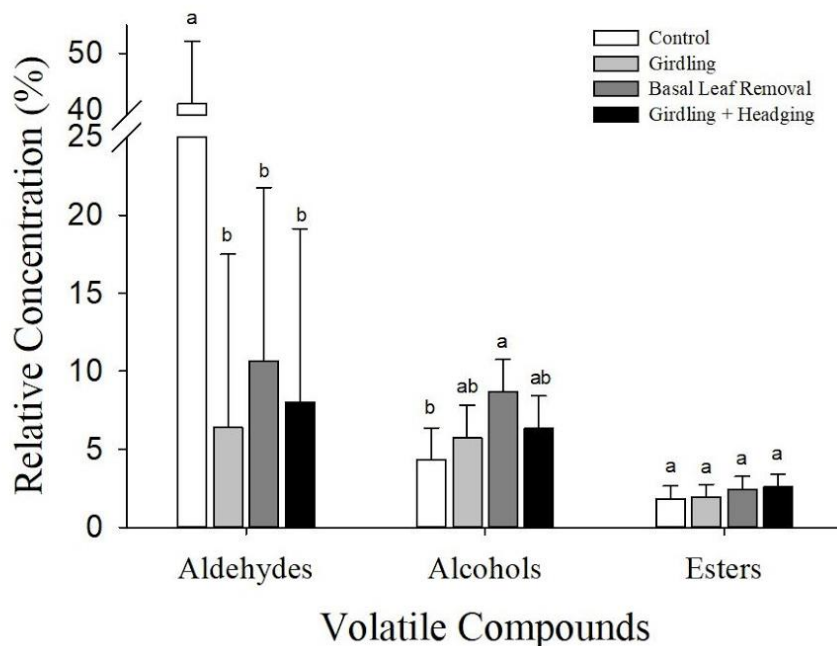


Figura 3. Efecto de los tratamientos del manejo del dosel sobre las concentraciones relativas de los grupos aldehídos, alcoholes y ésteres encontradas en uvas.

4.3.4 Rendimiento

Los diferentes manejos sobre el dosel de las vides en este estudio, demostraron modificar el rendimiento y la composición fisicoquímica de los frutos. Esos resultados son consistentes con los obtenidos en otros estudios. Reducciones en

peso y rendimiento de las uvas 'Cabernet Sauvignon' aquí, fueron similares a las observadas en uvas 'Italia', 'Red globe', 'Sovereign Coronation' y 'Flame seedless' que fueron anilladas (Williams et al., 2000; Reynolds y Savigny, 2004; Ferrara et al., 2014; Soltekin et al., 2015). De manera similar, técnicas de deshoje sobre el dosel en vides 'Riesling', 'Sangiovese' y 'Nero d'Avola', han demostrado reducciones en el peso y rendimiento de sus frutos (Poni et al., 2006; Almanza-Merchán et al., 2011; Gatti et al., 2012; Verzera et al., 2014). El deshoje y remoción de sarmientos reducen el área foliar lo que incrementa la penetración de la luz solar y puede provocar un aumento de la temperatura de las uvas (English et al., 1990; Spayd et al., 2002; Soltekin et al., 2015). La temperatura de los racimos de uva Zinfandel, por ejemplo, aumentó hasta en 2°C al mediodía en vides con deshoje basal con respecto a controles no deshojados (English et al., 1990). Al igual que el deshoje basal, el despunte o deshoje apical puede incrementar la incidencia de luz y aumentar la temperatura de los racimos. Este aumento de temperatura probablemente aumente la tasa de evaporación en las uvas y resulte en las reducciones observadas en peso y rendimiento.

4.3.5 Parámetros de madurez de las bayas

Las concentraciones superiores de SST y reducción de AT observadas en la presente investigación en frutos de la combinación de anillado + despunte fueron consistentes a lo observado en otros estudios. Técnicas de anillado sobre variedades de mesa 'Red globe', 'Sovereign Coronation' y 'Flame Seedless' han demostrado incrementos en SST y disminución en AT (Reynolds y Savigny, 2004; Soltekin et al., 2015; Soltekin et al., 2016). Lo anterior se debe a que el anillado del tronco o sarmientos evita la translocación de floema e incrementa la acumulación de fotosintatos en el área foliar que finalmente son acumulados en mayor cantidad en los frutos (William et al., 2000, Soltekin et al., 2015). Además de impactar la acumulación de azúcares, el anillado impacta otros procesos fisiológicos en la uva de mesa y uva para vino. En las uvas Riesling y Concord, por ejemplo, el anillado de los sarmientos generó una reducción del cuajado o amarre de los racimos (fruit set) (Intrigliolo et al., 2017). En contraste, las técnicas de deshoje tienen como objetivo la reducción de área fotosintética (Feng et al., 2015) y una reducción de la

síntesis de carbohidratos en la zona de los racimos. Sin embargo, al reducir el área foliar mediante el deshoje, también se incrementa la exposición de la luz solar (Spayd et al., 2002). El deshoje sobre de 'Sangiovese' y 'Nero d'Avola', por ejemplo, resultó en la reducción de SST e incremento de AT en sus bayas (Palliotti et al., 2013; Verzera et al., 2014). Por lo anterior, es probable que el incremento de SST y disminución de AT observados en este estudio para el tratamiento de anillado + despunte fue el resultado del incremento de fotosintatos en las bayas, mientras que el impacto sobre los compuestos volátiles observados, fue debido al deshoje.

4.3.6 Compuestos volátiles

Los tratamientos sobre el dosel de la vid Cabernet Sauvignon afectaron la composición volátil de las bayas. El deshoje incrementó concentraciones de compuestos volátiles clasificados como alcoholes, mientras que la combinación de anillado + despunte impactó la composición de volátiles tipo éster. Sin embargo, ambos tratamientos mostraron disminuciones en las concentraciones de aldehídos C6 1-hexanal y 2-hexenal (E) en comparación con el control. A pesar de que existe escasa información del efecto del anillado o la combinación de anillado + despunte sobre los compuestos volátiles en uva para vino, nuestros resultados son consistentes con la concentración de alcoholes y ésteres encontrada en otras investigaciones realizadas con deshojes basales en vides 'Tempranillo' y 'Nero d'Avola' (Vilanova et al., 2011; Verzera et al., 2014; Moreno et al., 2016). De igual manera, el anillado + despunte también ha resultado en el incremento de ésteres en uvas Syrah (Zhang et al., 2017). Este incremento de alcoholes y ésteres es el resultado de la modificación de la calidad y cantidad de irradiancia sobre los racimos, la humedad relativa y en general la modificación del microclima bajo el dosel (Moreno et al., 2016).

Por otro, las uvas de Cabernet Sauvignon pueden presentar aromas herbáceos característicos de los aldehídos y alcoholes C6 (Noble et al., 2012; Mozzon et al., 2016). En las uvas C. Sauvignon de este estudio se presentaron altas concentraciones de aldehídos y alcoholes C6 en el control y en el tratamiento de deshoje. Aunque el deshoje se ha utilizado para reducir aromas herbáceos en

variedades Merlot y Cabernet Sauvignon (Verzera et al., 2014; Song et al., 2015), el tratamiento de anillado + despunte mostró la mayor efectividad para reducir la concentración de aldehídos y alcoholes tipo C6, además de incrementar la síntesis de aldehídos como el furfural, ésteres y cetonas relacionados con aromas afrutados (Dixon y Hewett, 2000; Zhang et al., 2007; Verzera et al., 2015). Lo anterior se debe a que el deshoje aumenta la exposición de los racimos a la luz y la aireación, lo que promueve un cambio en la composición de compuestos aromáticos en las uvas (Feng et al., 2015). Al aumentar la exposición de los racimos a la luz se incrementa la síntesis de lípidos, los cuales son los principales precursores de compuestos volátiles a la ruta β -oxidación, ruta lipooxigenasa (LOX), e incluso mediante la síntesis de terpenos en diversos frutales (Espino-Díaz et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Este estudio demuestra que la combinación de anillado + despunte activó la síntesis de cuatro compuestos volátiles adicionales, entre ellos dos aldehídos, un éster y una cetona (hidroxyacetaldehyde-dimer, furfural, hexanoic acid hexyl ester y 1-hydroxy-2-propanone), en relación con el resto de los tratamientos. Por otro lado, se observó la síntesis del alcohol 4-methyl-2-hexanol en bayas cosechadas del tratamiento deshoje. Finalmente, tanto las técnicas de deshoje, anillado y la combinación de anillado + despunte, demostraron ser capaces de inhibir la síntesis del compuesto oxyme methoxy phenyl.

4.4 CONCLUSIONES

Los manejos agronómicos sobre el dosel de las vides impactan la composición de las bayas. Se encontró que el tratamiento de deshoje, tienen efectos positivos en la composición aromática, ya que incrementa los grupos de compuestos volátiles alcoholes, sin embargo disminuye el contenidos de SST en sus frutos. Por otro lado, el tratamiento combinado de anillado + despunte, demostró disminuciones en los componentes de rendimiento, sin embargo, sus frutos resultaron con un mejor balance en cuanto a acumulación de SST y la misma concentración de compuestos volátiles ésteres que el tratamiento de deshoje. Estos resultados demuestran que la técnica combinada de anillado + despunte, podría ser útil para las variedades vigorosas que en algunos climas no acumulan suficientes SST. Además resulta ser una técnica de impacto positivo en la concentración de compuestos volátiles al incrementar moléculas aromas frutales positivos de las uvas, ya que reducen la concentración de aromas herbáceos tanto en las bayas como posiblemente en sus vinos.

4.5 LITERATURA CITADA

- Abu-Zahra, T.R.; 2010. Berry size of Thompson seedless as influenced by the application of gibberellic acid and cane girdling. *Pak.J. Bot.* 42 (3),1755-1760.
- Aleixandre, J.L.; Aleixandre-Tudó, J.L.; Bolaños-Pizarro, M.; Aleixandre-Benavent, R.; 2016: Viticulture and oenology scientific research: the old world versus the new world wine-producing countries. *International Journal of Information Management.* 36, 389-396.
- Almanza-Merchán, P.J.; Fisher, G.; Serrano-Cely, P.A.; Balaguera-López, H.E.; Galavis, J.A.; 2011: Effects of leaf removal and cluster thinning on yield and quality of grapes (*Vitis vinifera* L., Riesling × Silvaner) en Corrales, Boyacá (Colombia). *Agronomía Colombiana.* 29(1), 35-42.
- Austin, C.N.; Wilcox, W.F.; 2011: Effects of fruit-zone leaf removal, training systems, and irrigation on the development of grapevine powdery mildew. *American Journal of Enology and Viticulture.* 62, 193-198.
- Bowen, P.; 2009: Foundation of canopy management: the contributions of Dr. Mark Kliewer. In: *Recent Advances in Grapevine Canopy Management.* Davis: University of California. 1–6
- Böttcher, C.; Boss, P.K.; Harvey, K.E.; Burbidge, C.A.; Davies, C.; 2017: Peduncle girdling of Shiraz (*Vitis vinifera* L.) bunches and sugar concentration at the time of girdling affect wine volatile compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 24(2), 1-13.
- Carreño, J.; Faraj, S.; & Martínez, A.; 1998: Effects of girdling and covering mesh on ripening, colour and fruit characteristics of Italia grapes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 73, 103-106.
- Dixon, J.; Hewett, E.W.; 2000: Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* 28, 155-173.
- Eltom, M.; Trought, M.; & Winefield, C.; 2013: The effect of cane girdling before budbreak on shoot growth, leaf area and carbohydrate content of *Vitis vinifera* L. Sauvignon blanc grapevines. *Functional Plant Biology.* 40(7), 749-757.

- English, J.T.; Bledsoe, A.M.; & Marois, J.J.; 1990: Influence of leaf removal from the fruit cluster zone on the components of evaporative potential within grapevine canopies. *Agriculture, Ecosystem and Environment*. 31, 49-61.
- Espino-Días, M.; Sepúlveda, D.R.; González-Aguilar, G.; Olivas, G.I.; 2016: Biochemistry of Apple aroma: a review. *Food Technol. Biotechnol.* 54(4), 375-394.
- Feng, H.; Yuan, F.; Skinkis, P.A.; Qian, M.C.; 2015: Influence of cluster zone leaf removal on Pinot noir grape chemical and volatile composition. *Food Chemistry*. 173, 414-423.
- Ferrara, G.; Mazzeo, A.; Netti, G.; Pacucci, C.; Matarrese, A.M.S.; Cafagna, I.; Mastrorilli, P.; Vezzoso, M.; Gallo, V.; 2014: Girdling, gibberic acid, and forchlorfenuron: Effects on yield, quality, and metabolic profile of table grape cv. Italia. *Am. J. Enol. Vitic.* 65(3), 381-387.
- Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Poni, S.; 2012: Effects of clusters thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *Am. J. Enol. Vitic.* 63(3), 325-332.
- Gutiérrez-Gamboa, G.; Pérez-Álvarez, E.P.; Rubio-Bretón, P.; Gardé-Cerdán, T.; 2019: Changes on the grape volatile composition through elicitation with methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract in Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grapevines. *Scientia Horticulturae*. 244, 257-262.
- Hunter, J.J.; Villiers, O.T.; Watts, J.E.; 1991: The effect of partial defoliation on quality characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes 1. Sugars, acids and pH. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 12(1), 42-50.
- Hunter, J.J.; Bonnardot, V.; 2011: Suitability of some climatic parameters for grapevine cultivation in South Africa, with focus on key physiological processes. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 32(1), 137-154.
- Intrigliolo, D.S.; Llacer, E.; Revert, J.; Esteve, M.D.; Climent, M.D.; Palau, D.; Gómez, I.; 2014: Early defoliation reduces cluster compactness and improves grape composition in Mandó, an autochthonous cultivar of *Vitis vinifera* from southeastern Spain. *Scientia Horticulturae*. 167, 71-75.

- Jensen, F.; Swanson, F.; Peacock, W.; Leavitt, G.; 1975: The effect of width of cane and trunk girdles on berry weight and soluble solids in table Thompson seedless vineyards. *American Journal of Enology and Viticulture*. 26, 90-91.
- Larsen, M.; Poll, L.; 1992: Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *European Food Research & Technology*. 19, 120-123.
- Lee, J.; Skinkis, P.A.; 2013: Oregon Pinot noir grape anthocyanins enhancement by early leaf removal. *Food Chemistry*. 139, 893-901.
- Mattheis, J.P.; Fellman, J.K.; Chen, P.M.; Patterson, M.E.; 1991: Changes in headspace volatiles during physiological development of Bisbee delicious apple fruit. *J. Agric Food Chem*. 39, 1902-1906.
- Meng, J.; Fang, Y.; Gao, J.; Zhan, A.; Liu, J.; Guo, Z.; Zhang, Z.; Li, H.; 2011: Changes in aromatic compounds of cabernet sauvignon wines during ageing in stainless steel tanks. *African Journal of Biotechnology*. 10(55), 11640-11647.
- Moreno, D.; Valdés, E.; Uriarte, D.; Gamero, E.; Talaverano, I.; Vilanova, M.; 2016: Early leaf removal applied in warm climatic conditions: impact on Tempranillo wine volatiles. *Food Research International*. 98, 50-58.
- Mosetti, D.; Herrera, J.C.; Sabbatini, P.; Green, A.; Alberti, G.; Peterlunger, E.; Lisjak, K.; Castellarin, S.D.; 2016: Impact of leaf removal after berry set on fruit composition and bunch rot in Sauvignon blanc. *Vitis*. 55, 57-64.
- Mozzon, M.; Savini, S.; Boselli, E.; Thorngate, J.H.; 2016: The herbaceous character of wines. *Ital. J. Food Sci*. 25, 190-207.
- Niu, Y.; Zhang, X.; Xiao, Z.; Song, S.; Eric, K.; Jia, Ch.; Yu, H.; Zhu, J.; 2011: Characterization of odor-active compounds of various cherry wines by gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography olfactometry and their correlation with sensory attributes. *Journal of Chromatography B*. 879, 2287-2293.
- Noble, A.C.; Elliott-Fisk, D.L.; Allen, M.S.; 2012: Vegetative flavor and methoxypyrazines in Cabernet Sauvignon: effect of soil, vine growth and light on wine flavour and methoxypyrazines. In *Advances in Fruit Flavors*. Leahy

- M, Rousseff R. American Chemical Society Annual Meeting, Chicago in press. 226-234.
- Nogales-Bueno, J.; Hernández-Hierro, J.M.; Rodríguez-Pulido, F.J.; Heredia, F.J.; 2013: Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skin in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach. *Food Chemistry*. 221, 1685-1690.
- OIV;2018:<http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/uvas-de-mesa-y-pasas-los-datos-mundiales-estan-disponibles>
- Palliotti, A.; Panara, F.; Silvestrini, O.; Lanari, V.; Sabbatini, P.; Howell, G.S.; Gatti, M.; Poni, S.; 2013: Influence of mechanical postveraison leaf removal apical to cluster zone on delay of fruit ripening in Sangiovese (*Vitis vinifera* L.) grapevines. *Australian Society of Viticulture and Oenology*. 19, 369-377.
- Poni, S.; Casalini, L.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Intrieri, C.; 2006: Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape composition. *Am. J. Enol. Vitic.* 57(4), 397-407.
- Reynolds, A.; Savigny, Ch.; 2004: Influence of girdling and gibberellic acid on yield components, fruit composition, and vestigial seed formation of 'Sovereign Coronation' table grapes. *Hortscience*. 39(3), 541-544.
- Ryona, I.A.; Pan, B.S.; Intrigliolo, D.S.; Lakso, A.N.; Sacks, G.L.; 2008: Effects of clusters light exposure on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet franc). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 10838-10846.
- Soltekin, O.; Candemir, A.; Atlindisli, A.; 2016: Effects of cane girdling on yield, fruit quality and maturation of (*Vitis vninfera* L.) cv. Flame Seedless. *BIO Web of Conferences*. 7, 1-5.
- Soltekin, O.; Teker, T.; Erdem, A.; Kacar, E.; Altindişli, A.; 2015: Response of 'Red Globe' (*Vitis vinifera* L.) to cane girdling. *BIO Web of Conferences*. 5,1-4.
- Song, Ch.; Zuo, L.; Shi, P.; Meng, J.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Xi, Z.; 2015: Aroma characterization of Chinese Hutai-8 wines: comparing with Merlot and Cabernet Sauvignon wines. *Scientia Horticulturae*. 194, 237-345.

- Song, J.; Smart, R.; Wang, R.; Wang, H.; Damberg, B.; Sparrow, A.; Qian, M.C.; 2015: Effect of grape bunch sunlight exposure and uv radiation on phenolics and volatile composition of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir wine. *Food Chemistry*. 17, 424-431.
- Spayd, S.E.; Tarara, J.M.; Mee, D.L.; Ferguson, J.C.; 2000: Separation of sunlight and temperature Effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53(3), 171-182.
- Verzera, A.; Tripodi, G.; Dima, G.; Condurso, C.; Scacco, A.; Cincotta, F.; Sparacio, A.; 2016: Leaf removal and wine composition of *Vitis vinifera* L. cv. Nero d'Avola: the volatile aroma constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96(1), 150-159.
- Viguié, V.; Lecocq, F.; Touzard, J.M.; 2014: Viticulture and adaptation to climate change. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 55-60.
- Vilanova, M.; Diago, M.P.; Genisheva, Z.; Oliveira, J.M.; Tardaguila, J.; 2011: Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. *J. Sci. Food Agric.* 92, 935-942.
- Williams, L.E.; Retzlaff, W.A.; Yang, W.; Biscay, P.J.; Ebisuda, N.; 2000: Effect of girdling on leaf gas exchange, water status, and non-structural carbohydrates of field-growth *Vitis vinifera* L. (cv. Flame Seedless). *Am. J. Enol. Vitic.* 51(1), 49-54.
- Yu, Ch.; Kim, J.T.; 2010: Building pathology, investigation of buildings-VOC emissions. *Indoor Built Environment*. 19, 20-39.
- Zhang, M.; Xu, Q.; Duan, C.; Qu, W.; Wy, Y.; 2007: Comparative study of aromatic compounds in Young red wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, and Cabernet Gernischt varieties in China. *Food Chemistry and Toxicology*. 72(5), 248-252.
- Zhang, P.; Wu, X.; Needs, S.; Liu, D.; Fuentes, S.; Howell, K.; 2017: The influence of apical and basal defoliation on the canopy structure and biochemical composition of *Vitis vinifera* cv. Shiraz grapes and wine. *Frontiers in Chemistry*. 5, 1-48.

Zhang, Y.; Mulpuri, S.; Liu, A.; 2016: High light exposure on seed coat increases lipid accumulation in seeds of castor bean (*Ricinus communis* L.), a nongreen oilseed crop. *Photosynth Res.* 128, 125-140.

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente investigación, se demostró que la aplicación foliar de CaCO_3 en *Vitis vinifera* cv Shiraz mostró incremento en el rendimiento de producción de sus frutos. Además cuando la aplicación de los CaCO_3 se realiza cuando el envero es mayor al 90%, los compuestos fenólicos de las bayas se ven impactados de manera positiva, incrementando su concentración, especialmente en antocianinas, ácidos fenólicos, resveratrol y flavanoles. Mientras que los vinos elaborados con uvas provenientes del tratamiento con CaCO_3 , también muestran incremento en antocianinas, algunos ácidos fenólicos con función antioxidante como el ácido caféico, flavanoles, resveratrol y un compuesto de origen flavonol. Por otro lado, de las técnicas evaluadas sobre el dosel de vides, se encontró que la técnica de anillado mostró ser más efectiva para incrementar los sólidos solubles totales en los frutos cosechados, mientras que la técnica combinada de anillado y raleo apical, mostró tener impacto positivo en los compuesto volátiles en comparación con las técnicas de raleo, anillado o el control. Por lo tanto, tanto la aplicación de CaCO_3 , demostró ser efectiva para incrementar el contenido de compuestos fenólicos en bayas y en sus vinos, mientras que las técnicas implementadas sobre el de las vides, mostraron que las técnicas relacionadas con anillados, son efectivas para la maximizar la acumulación de azúcares y de compuestos volátiles.

LITERATURA CITADA GENERAL

- Alonso, R., Berli, F. J., Fontana, A., Piccoli, P., & Bottini, R. (2016.). Malbec grape (*Vitis vinifera* L.) responses to the environment berry phenolics as influenced by solar uv-b, water deficit and sprayed abscisic acid. *Plant Physiology and Biochemistry.*, *109*, 84-90.
- Al-Qurashi, A., & Awad, A. (2013.). Effect of pre-harvest calcium chloride and ethanol spray on quality of 'El-Bayadi' table grapes during storage. *Vitis.*, *52*(2), 61-67.
- Antionioli, A., Fontana, A., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry.*, *178*, 172-178.
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylos, A., Lin, Z., & Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology.*, *136*, 2641-2651.
- Coelho de Souza-Leaño, P., Coelho-Lima, M., Dias-Costa, J., & Gomes-da Trindade, D. (2014). Abscisic acid and ethephon for improving red color and quality of crimson seedless grapes grown in a tropical region. *American Journal of Enology and Viticulture.*, *66*, 37-45.
- Conde, C. S. (2007.). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. . *Global Science Books.*, *1*(1), 1-22.
- Coombe, B. (2001.). Ripening berries-a critical issue. *Australian Viticulture.*, *5*, 28-33.
- Faurie, b., Cluzet, S., & Mérillon, J. (2009.). Implications of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology.*, *17*, 1863-1877.
- Ferrara, G., Mazzeo, A., Netti, G., Pacucci, C., Matarrese, A., Cafagna, I., . . . Vezzoso, M. G. (2014.). Girdling, gibberlic acid, and forchlorfenuron: Effects on yield, quality, and metabolic profile of table grape cv. Italia. *American Journal of Enology and Viticulture.*, *65*(3), 381-387.

- Flores-Córdova, M., Soto-Parra, J., Salas-Salazar, N., Sánchez-Chávez, E., & Piña-Ramírez, F. (2018.). Efecto del subproducto industrial CaCO₃ en los atributos de calidad, contenido fenólico y capacidad antioxidante de manzanas cvs Golden Delicious y Top Red. *Revista de Investigación de la Universidad de la Salle Bajío Nova Scientia.*, 10(1), 64-82.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols – a chemical perspective. *Food Research International.*, 54, 1844-1858.
- Gatti, M., Bernizzoni, F., Civardi, S., & S., P. (2012.). Effects of clusters thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *American Journal of Enology and viticulture.*, 63(3), 325-332.
- Gil, G., & Pszczolkowski, P. (01 de Mayo de 2015). *Viticultura: fundamentos para optimizar producción y calidad* (Segunda ed., Vol. 1). (G. Gil, Ed.) Santiago, Macul, Chile: Ediciones UC. Recuperado el 10 de Septiembre de 2019, de Viticultura: Fundamentos para optimizar producción y calidad: <https://books.google.com.mx/books?id=4myBDwAAQBAJ&pg=PA108&dq=fenologia+vid&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjs9ZC4o7jkAhVCKKwKHx1qDfUQ6AEIMjAC#v=onepage&q=fenologia%20vid&f=false>
- González-Mendoza, D. (2007.). El complejo enzimático citocromo p450 en las plantas. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 23(4), 177-173.
- González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., & Ferrer, M. (2011). Potencial polifenólico de la uva: índices propuestos y posibles aplicaciones. *Comunicata Scientiae.*, 2(2), 57-69.
- Grenan, S., Renault-Spilmont, A., & Boursiquot, J. (2007). Syrah decline in France: historical background and firs approaches. Proceedings of the Syrah vine health symposium. *University of California Agriculture & Natural Resources.*, 1-25. Obtenido de <http://www.ucanr.org/sites/intvit/files/24497.pdf#page=8>
- Hardy, P. (1968). Metabolism of sugars and organic acids in immature grape berries. *Plant physiology.*, 43, 224-228.
- He, F., He, J., Pan, Q., & Duan, C. (2010.). Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and wine Research.*(16), 464-468.

- Hernández, M., Song, S., & Menéndez, C. (2016.). Influence of genetic and vintage factors in flavan-3-ols composition of grape seeds of a segregating *Vitis vinifera* population. *97*, 236-243.
- Hidalgo-Togores, J. (2011). Capítulo II. Morfología, maduración y composición del racimo. En J. Hidalgo-Togores, *Tratado de enología* (págs. 57-133). Madrid, España: Mundi-Prensa. Recuperado el 15 de Agosto de 2019, de <https://books.google.com.mx/books?id=CxtfAwAAQBAJ&pg=PA57&dq=vitis+vinifera+morfologia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjGpYza1rPkAhVBX60KHW8XDVUQ6AEIQzAE#v=onepage&q=vitis%20vinifera%20morfologia&f=false>
- Huglin, P. (1986). *Biologie et écologie de la vigne*. . Colmar, France.: Editions Payot Lausanne Suisse.
- Jia, H., Wang, S., L. H., Satio, T., Ampa, K., Todoroki, Y., & Kondo, S. (2017.). Effects of abscisic acid agonist or antagonist application on aroma volatiles and anthocyanins biosynthesis in grapes berries. *The journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *94*(4), 392-399.
- Jones, G., & Davis, R. (2000.). Climate influences on grapevine phenology, grape composition and wine production and quality for Bordeaux, France. *American Journal of Enology and Viticulture.*, *51*(3), 249-251.
- Ju, Y., Liu, M., Zhao, H., Meng, J., & Fang, Y. (2016). Effect of exogenous abscisic acid and methyl jasmonate on anthocyanin composition, fatty acids, and volatile compounds of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape berries. *Molecules.*, *21*, 2-15.
- Kliwer, W., Howart, L., & Omori, M. (1967.). Concentrations of tartaric acid and malic acids and their salts in *Vitis vinifera* grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, *18*, 42-54.
- Liang, Z., Yang, Y., Cheng, L., & and Zhong, G. (2012). Characterization of polyphenolic metabolites in the seed of *Vitis* germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, *60*, 1291-1299.
- Martínez de Toda, F. (2019). *Técnicas vitícolas frente al cambio climático*. Madrid España: Ediciones Mundi-Prensa.

- Martins, V., García, A., Costa, C., Sottomayor, M., & Gerós, H. (2018). Calcium- and hormone-driven regulation of secondary metabolism and cell wall enzymes in grape berry cells. *Journal of Plant Physiology.*, 231, 57-67.
- Maya-Meraz, I., & Pérez-Leal, R. (2019). ¿Qué relación existe entre la calidad aromática del vino y la bioquímica de la vid?. *Tecnociencia Chihuahua.*, 12(3), 134-142.
- Mullins, M. G., Bouquet, A., & Williams, L. E. (1992). *Biology of the grapevine.* . Cambridge Great Britain : Cambridge University Press.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165-185.
- Nogales-Bueno J, H.-H. J.-P. (2013). Nogales-Bueno J, Hernández-Hierro JM, Rodríguez-PuDeterminación of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skin in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach. *Food Chemistry*, 221, 1685-1690.
- OIV. (13 de Julio de 2019). *Organización Internacional de la Viña y el Vino*. Obtenido de El balance trata sobre la superficie plantada de viñedos, la producción de uva, la producción y el consumo de vino, los volúmenes de exportación e importación de vino: <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/balance-2019-de-la-oiv-sobre-la-situacion-vitivinicola-mundial>
- Pallioti, A., Panara, F., Silvestrini, O., Lanari, V., Sabbatini, P., Howell, G., . . . Poni, S. (2013). Influence of mechanical postveraison leaf removal apical to cluster zone on delay of fruit ripening in Sangiovese (*Vitis vinifera* L.) grapevines. *Australian Society of Viticulture and Oenology.*, 19, 369-377.
- Pandey, K., Cheong, Y., Kim, K., Grant, J., Li, L., H. W., . . . Luan, S. (2004). The calcium sensor calcineurins B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 16, 1912-1924.
- Portu, J., López, R., Santamaría, P., & Garde-Cerdán, T. (2017). Elicitation with methyl jasmonate supported by precursors feeding with phenylalanine: effect on Garnacha grape phenolic content. *Journal of Food Chemistry*, 237, 416-422.
- Quijada-Morín, N., Hernández-Hierro, J., Rivas-Gonzalo, J., & Escribano-Bailón, M. (2015). Extractability of low molecular mass flavanols and flavonols from red grape skin.

- Relationship to cell wall composition at different ripeness stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 7654-7662.
- Rajha, H., Darra, N., Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobieb, E., Maroun, R., & G., L. N. (2014). Extraction of total phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins and tannins from grape byproducts by response surface methodology. Influence of solid-liquid ratio, particle size, time, temperature, and solvent mixtures on the optimization process. *Food and Nutrition Science*, 5, 397-409.
- Ranty, B., Aldon, D., Cotelle, V., Galaud, J., Thuleau, P., & Mazars, C. (2016). Calcium sensors as key hub in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1-7.
- Reyes, A. J., J.G., Á.-H., & Fernández, J. (2013). Papel del calcio en la apertura y el cierre estomático y sus interacciones con solutos compatibles, una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(1), 111-122.
- Robinson, J. (2006). *The oxford companion to wine* (Tercera ed.). Oxford, USA.: Oxford University Press.
- Romero-Casales, M. (23 de Mayo de 2008). Tesis Doctoral. *Extracción de compuestos fenólicos de la uva alvino. Papel de enzimas de maceración*. Universidad de la Murcia, España.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., & Mizutani, M. (2004). Arabidopsis CYP707As encode abscisic acid 8' hydroxylase a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology*, 134, 1439-1449.
- Sanz, C. O. (1997). Aroma biochemistry of fruits and vegetables. En F. Tomas-Barberan, & R. Robins, *Phytochemistry of Fruits and Vegetables*. (págs. 125-155). Clarendon. Oxford.: Oxford University Press.
- Sharkey, T. (1980). Effects of phaseic acid and dihydrophaseic acid on stomata and the photosynthetic apparatus. *Plant Physiology*, 65(2), 291-297.
- Shi, P., Song, C., Chen, H., Duan, B., Zhang, Z., & Meng, J. (2018). Foliar application of iron promote flavonoids accumulation in grape berry of *Vitis vinifera* cv. Merlot grown in the iron deficiency soil. *Food Chemistry*, 253, 164-170.
- Shultz, H., & Jones, G. (2010). Climate induced historic and future changes in viticulture. *Journal of Wine Research*, 21, 137-145.

- Soltekin, O., Teker, T., Erdem, A., Kacar, E., & Altindisli, A. (2015). Response of 'Red Globe' (*Vitis vinifera* L.) to cane girdling. *BIO Web of Conferences.*, 5, 1-4.
- Song, J., Smart, R., Wang, R., Wang, H., Damberg, B., Sparrow, A., & Qian, M. (2015). Effect of grape bunch sunlight exposure and uv radiation on phenolics and volatile composition of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir wine. *Food Chemistry*, 17, 421-431.
- Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso, V., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europea* L. cv. Coratina). *Food Chemistry*, 209, 65-71.
- Veremeichik, G., Grigorochuk, V., Shkryl, Y., Bulgakov, D., Silantieva, S., & Bulgakov, V. (2017). Induction of resveratrol biosynthesis in *Vitis amurensis* cell by heterologous expression of the Arabidopsis constitutively activate, Ca²⁺ -dependent form of the AtCPK1 gene. *Process Biochemistry*, 54, 144-155.
- Viguié, V., Lecocq, F., & Touzard, J. (2014). Viticulture and adaptation to climate change. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.*, 55-60. Obtenido de <https://hal-enpc.archives-ouvertes.fr/hal-00982086/document>
- Vila, H., & Catania, C. (2005). Influencia del tiempo de maceración sobre el color, la composición tánica y la astringencia de vinos Cabernet Sauvignon y Malbec de argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo*, 1, 97-111.
- Villa, P. (2018). *Cultivar la vid*. Editorial de Vecchi S. A. U. Recuperado el 15 de Agosto de 2019, de <https://books.google.com.mx/books?id=EA9dDwAAQBAJ&pg=PT20&dq=el+tronco+de+la+vid&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjbtIC4rbjkAhUIUa0KHQSyBOYQ6AEILjAB#v=onepage&q=el%20tronco%20de%20la%20vid&f=false>
- Vishwakarama, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R., . . . Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8(161), 1-12.
- Vitrac, X., Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G., & Mérillon, J. (1999). Sugar sensing and Ca²⁺- calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry*, 55, 659-665.
- Wang, J., Wang, S., Liu, G., Edwards, E. J., Duan, W., Li, S., & Wang, L. (2016). The synthesis and accumulation of resveratrol are associated with veraison and abscisic

- acid concentration in Beihong (*Vitis vinifera* × *Vitis amurensis*) berry skin. *Frontiers in Plant Science*, 1605, 1-11.
- Wang, Y., Xie, X., & Long, L. (2014). The effect of postharvest calcium application in hydro-cooling water on tissue calcium content, biochemical changes, and quality attributes of sweet cherry fruit. *Food Chemistry*, 23-30.
- Wink, M. (2010). Chapter 1. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. En M. Wink, *Annual Plants Reviews* (Second Edition ed., Vol. 40, págs. 1-19). Germany : Wiley Blackwell. doi: Doi: 10.1002/9781444320503.ch1.
- Xing, R. R., He, F., Xiao, H., Duan, C. Q., & Pan, Q. (2015). Accumulation pattern of flavonoids in Cabernet Sauvignon grapes grown in a low-altitude and high altitude region. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36, 32-43.
- Xu, W., Peng, H., Yang, T., Whitaker, B., Huang, L., Sun, J., & Chen, P. (2014). Effect of calcium on strawberry fruit flavonoid pathway gene expression and anthocyanin accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 289-298.
- Yang, T., Peng, H., Whitaker, B., & Conway, W. (2012). Characterization of calcium/calmodulin-regulated SR/CAMTA gene family during tomato fruit development and ripening. *Plant Biology*, 12(19), 2-13.
- Zhan, W., León, C., Feil, R., Lunn, J., Delrot, S., & Gomés, E. (2013). Metabolic profiling reveals coordinated switches in primary carbohydrate metabolism in grape berry (*Vitis vinifera* L.), a non-climacteric fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1345-1355.
- Zhang, P., Wu, X., Needs, S., Liu, D., Fuentes, S., & Howell, K. (2017). The influence of apical and basal defoliation on the canopy structure and biochemical composition of *Vitis vinifera* cv. Shiraz grapes and wine. *Frontiers in Chemistry*, 5, 1-48.
- Zou, J., Li, X., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W., Song, L., . . . Wu, W. (2015). Arabidopsis calcium-dependent protein kinases8 and catalase3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell*, 5, 1445-1460.