

UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

**Elicitores: una herramienta para
incrementar el color y el aroma de
uvas y vinos**

YOLANDA RUIZ GARCÍA

2014



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a ENCARNA GÓMEZ PLAZA, Catedrática de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Murcia, AUTORIZA

La defensa de esta Tesis Doctoral, titulada: “Elicitores: una herramienta para aumentar el color y aroma de uvas y vinos”, presentada por YOLANDA RUIZ GARCÍA. Todo el trabajo ha sido realizado bajo mi supervisión y cumple todos los requerimientos para obtener el título de Doctor.

Murcia, 10 de Julio de 2014

Encarna Gómez Plaza

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Encarna Gómez Plaza, catedrática del departamento de Tecnología de alimentos, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Murcia por todo su apoyo y dedicación en la realización de esta Tesis Doctoral. Especialmente por enseñarme cosas tan importantes como el sentido de la justicia, el pragmatismo y el saber estar.

Al Dr. José María López Roca, catedrático del departamento de Tecnología de alimentos Nutrición y Bromatología por compartir su experiencia y conocimientos durante este tiempo y por alegrarnos las mañanas con su: “Buenos días, familia”.

Del mismo modo quiero agradecer a los miembros de la Estación Enológica de Jumilla, especialmente a Adrián, José Ignacio y Rocío por su gran colaboración.

A mis compañeros de grupo: Naiara por nuestra amistad nada más vernos, Belén por mostrarme la actitud adecuada para sobrevivir, Rafa por su filosofía, Inmaculada por su paciencia, Liliana por su alegría, Pedro por su sentido del humor, Alberto por su respeto, Juan Manuel por su inquietud, Oscar, Sonia, Noelia, Fátima y Teresa y a mis compañeros de departamento Rocío, Miriam y Maca por las cañas y las tapas, Virginia por su apoyo incondicional, Jordi por su empatía, Víctor, Paola, Rafa, Adriana, Esther, Pedro, Belén, Mariela, Sandra por todos los buenos momentos pasados y por pasar. A todos los profesores del departamento y a los técnicos de laboratorio por su soporte y dedicación.

A mis amigos de toda la vida por contribuir a los grandes momentos que pasamos juntos y seguiremos pasando, especialmente a Alicia por nuestras aventuras y desventuras, a la que siempre siento a mi lado.

A mis compañeros y amigos de la carrera, en especial Natalia, Leyre, Paco, Raúl, Pilar, Sol, Carlos, Aniceto, Pedro, por ser un ejemplo de superación y por la experiencia inolvidable de su compañía.

A mis colegas durante mis estancias como el grupo de investigación del Centro de Ciencias Exactas (Química) de la Universidad de Madeira y en especial al Dr. Jose Câmara por su confianza al poner a mi disposición todo lo que tenía en su laboratorio, Catarina, João, Berta, Aldonio, Fatima y Jorge. Al grupo de investigación de Australian Wine Research Institute especialmente a Dr. Paul Smith por su liderazgo, Dra. Keren Bindon de la que aprendí mucho más de lo que me hubiera imaginado, Stella, Josh, Jacqui, Gayle, Tina, Esther, Richard, Peter, Marlize.

A otras personas con las que he tenido la suerte de encontrarme en el camino durante estos cuatro años que tanto me han enseñado como Amanda y Gina por ser de mi planeta, Pilar por merecerse toda mi admiración, Sergio por estar en el momento preciso en el lugar apropiado, Lee, Stephanie y Saeed por mostrarme la similitud en la diversidad.

Por último, estoy agradecida por mi familia, en primer lugar por mis padres, Alfonso y Pepita, por ser siempre los pilares de mi vida, gracias a los que existo y persisto, a mi sobrina Ana por ser mi corazón, a Mari Carmen por darme la ternura de una madre, a mi abuela Caridad por ser un ejemplo de vida y superación, a mi hermano Alfonso y a Johnathan por su paciencia y gran corazón.

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por la Fundación Séneca a través del proyecto de investigación titulado: “NUEVAS VARIEDADES DE VID PARA EL FUTURO A PARTIR DE HÍBRIDOS INTRAESPECÍFICOS DE MONASTRELL: POTENCIAL ENOLÓGICO Y NUTRICIONAL Y ADAPTACIÓN AL CAMBIO CLIMÁTICO” y una beca predoctoral concedida a D^a Yolanda Ruiz García.



Índice



| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE UVAS Y VINOS | 3 |
| 1.1.1 Biosíntesis de estilbenos, antocianos, flavonoles, flavanoles y proantocianidinas | 4 |
| 1.2 PAPEL DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LAS UVAS | 6 |
| 1.2.1 Flavonoles | 6 |
| 1.2.2 Antocianos | 7 |
| 1.2.3 Flavanoles | 8 |
| 1.2.4 Proantocianidinas | 9 |
| 1.2.5 Estilbenos | 10 |
| 1.2.6 El papel de los compuestos polifenólicos en los procesos de resistencia de la planta | 12 |
| 1.3 PAPEL TECNOLÓGICO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS | 14 |
| 1.3.1 Color de uvas y vinos | 15 |
| 1.3.2 Astringencia, cuerpo y amargor de los vinos | 19 |
| 1.4 PAPEL NUTRICIONAL DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS | 19 |
| 1.5 LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE UVAS Y VINO | 21 |
| 1.5.1 Papel de los compuestos volátiles en la planta | 23 |
| 1.6 MECANISMOS PARA AUMENTAR LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y VOLÁTILES EN LAS UVAS | 25 |
| 1.6.1 Prácticas culturales | 25 |
| 1.6.2 Mejora clásica, selección clonal e híbridos | 26 |
| 1.6.3 Ingeniería genética | 27 |
| 1.6.4 Uso de elicitores | 28 |
| 1.7 EL USO DE ELICITORES | 28 |
| 1.7.1 Elicitores físicos | 28 |
| 1.7.1.1 Irradiaciones de luz | 29 |
| 1.7.1.2 Gases | 30 |
| 1.7.2 Elicitores químicos | 30 |
| 1.7.2.1 Benzotiadiazol (BTH) | 31 |
| 1.7.2.2 Metil jasmonato (MeJ) | 32 |
| 1.7.2.3 Antagonismo y sinergismo entre BTH y MeJ | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 1.7.2.4 Harpina | 35 |
| 1.7.2.5 Quitosano | 35 |
| 1.7.2.6 Otros elicitores químicos | 35 |
| 2. Objetivos | 57 |
| 3. Resultados y Discusión | 61 |
| 3.1 Improving Grape Phenolic Content and Wine chromatic Characteristics through the Use of Two Different Elicitors: Methyl Jasmonate versus Benzothiadiazole | 63 |
| 3.2 Increasing Bioactive Phenolic Compounds in Grapes: Response of Six Monastrell Grape Clones to Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate Treatments | 65 |
| 3.3 Effect of Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate on the Volatile Compound Composition of Vitis vinifera L. Monastrell Grapes and Wines | 67 |
| 3.4 Increasing the Phenolic Compound Content of Grapes by Preharvest Application of Abscisic Acid and a Combination of Methyl Jasmonate and Benzothiadiazole | 69 |
| 3.5 Effect of Combined Use of Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate on Volatile Compounds of Monastrell Wine | 71 |
| 4. Discusión general | 73 |
| 5. Summary | 81 |
| 6. Conclusiones | 94 |
| 7. Conclusions | 97 |

1

Introducción



1.1 LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS DE UVAS Y VINOS

Los compuestos fenólicos son un amplio conjunto de metabolitos secundarios presentes en las plantas superiores. Éstos son importantes para la fisiología de la planta, ya que la protegen ante condiciones bióticas y abióticas adversas. Igualmente, muchos son responsables de las propiedades organolépticas de alimentos de origen vegetal y, por tanto, de su calidad (Harborne y Williams, 2000). En los últimos tiempos, estos compuestos han sido objeto de muchos estudios debido a sus propiedades antioxidantes y posibles efectos beneficiosos sobre la salud.

Los compuestos fenólicos presentan un amplio rango de estructuras químicas cuya característica común es contener un anillo bencénico con uno o varios grupos hidroxilo. Se suelen clasificar en dos grupos: flavonoides y no flavonoides, siendo el siguiente un diagrama general de clasificación:



Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de antocianos, flavonoles, proantocianidinas y estilbenos de las uvas y los vinos de la variedad Monastrell, principalmente por el papel que dichos compuestos juegan en la planta y por su importancia a nivel tecnológico y nutricional.

1.1.1 Biosíntesis de estilbenos, antocianos, flavonoles, flavanoles y proantocianidinas

Los polifenoles son sintetizados a partir de la fenilalanina producida en la ruta del ácido siquímico (Figura 1.1). La desaminación de la fenilalanina catalizada por la enzima fenilalanina amino liasa es el primer paso de dicha ruta, así se forma el ácido cinámico que pasa a p-cumárico por la acción de la enzima cinamato 4-hidroxilasa y este a su vez a p-cumaril coenzima A.

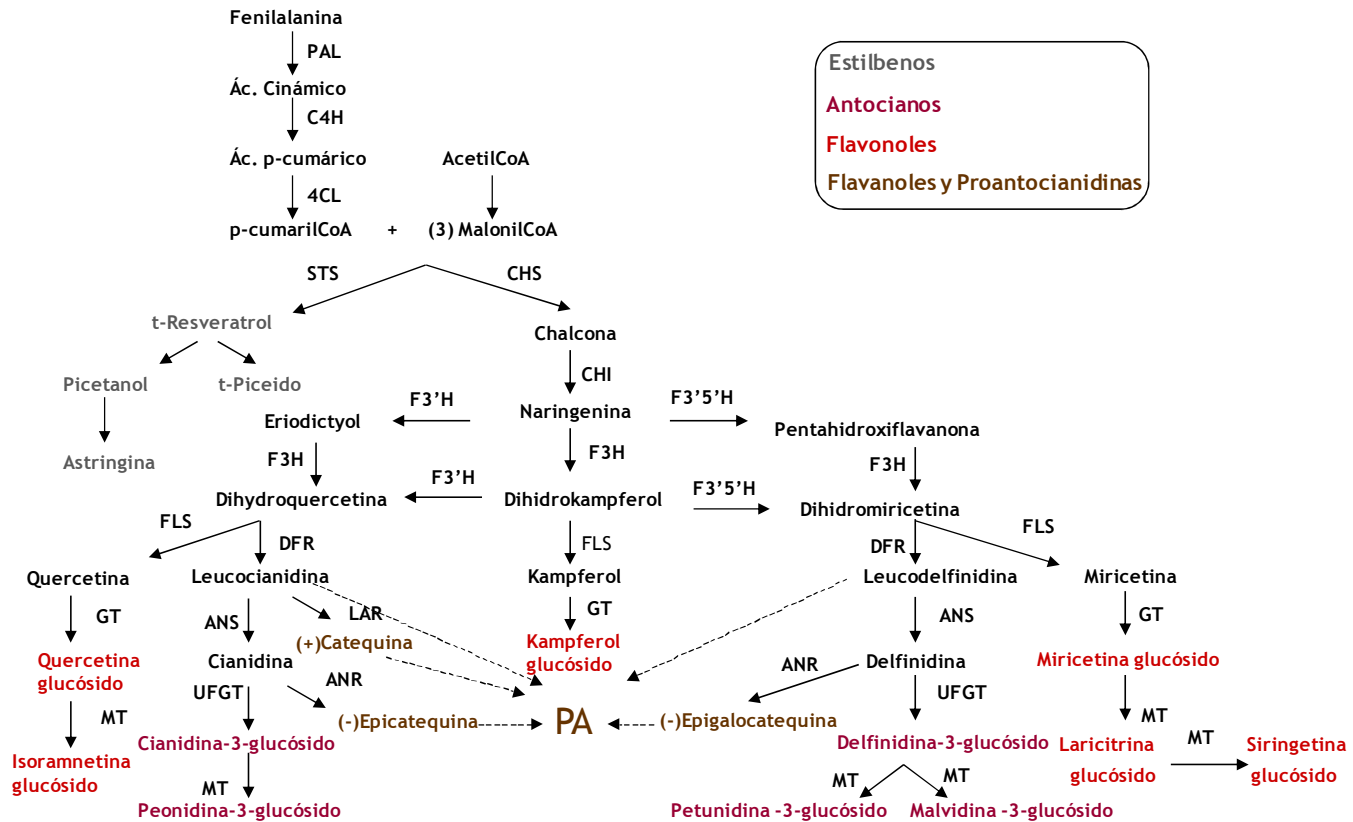
Dos de las clases más importantes de compuestos fenólicos, flavonoides y estilbenos, se producen por una bifurcación de esta ruta metabólica. Los enzimas chalcona sintasa y estilbeno sintasa convierten la estructura fenilpropanoide del p-cumaril coenzima A en un polifenol mediante la formación de un anillo aromático por la adición de tres unidades de C₂ que provienen de tres moléculas de malonil coenzima A (derivado del metabolismo de los ácidos grasos).

La estilbeno sintasa produce directamente trans-resveratrol y a partir de éste se forman el resto de estilbenos mediante reacciones de glucosilación (pideido), hidroxilación (picetanol y su glucósido astringina), formación de dímeros y trímeros (viniferinas), etc.

Dentro de la biosíntesis de polifenoles, la de los antocianos ha sido de las más estudiadas en diversas especies. Tras la formación de la chalcona, se requiere la actividad de cuatro enzimas (chalcona isomerasa, flavanona 3-hidroxilasa, dihidroflavonol 4-reductasa y antocianidin sintasa) para la formación de una antocianidina coloreada llamada pelargonidina. La hidroxilación del anillo B de los flavonoides se lleva a cabo por dos enzimas, flavonoide 3'-hidroxilasa y flavonoide 3',5'-hidroxilasa. Seguidamente, y tras la acción de las enzimas dihidroxiflavonol 4-reductasa y antocianidina sintasa, se termina sintetizando por un lado la cianidina (a partir de la cual se forma su glucósido y la peonidina, dando así a los antocianos dihidroxilados) y por otro lado la delfinidina (a partir de la cual se forma su glucósido y la petunidina y malvidina, dando así a los antocianos trihidroxilados). Finalmente, sus derivados acilados se forman mediante una acil transferasa.

La formación de los flavanoles se produce por la actividad de los enzimas leucoantocianidina reductasa y antocianina reductasa dando catequina, epicatequina y epigallocatequina, esta última ausente en semillas.

Figura 1.1: Síntesis de los polifenoles antocianos, flavonoles, favanoles, proantocianidinas y estilbenos.



Abreviaturas: PAL, fenilalanina amino liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4-CL, 4-coumarato/coenzima A ligasa; STS, estilbeno sintasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3',5'-hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa; GT, glucosil-trasferasa; MT, metil-transferasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; ANS, antocianidina sintasa; UFGT, UDPglucosa: flavonoide-O-transferasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; ANR, antocianina reductasa; PA, proantocianidinas.

La polimerización de unidades de flavanoles da lugar a las proantocianidinas o taninos condensados. Esta parte de la ruta metabólica se ve reducida en el momento del envero que es cuando se activa la formación de antocianos.

La acción del enzima flavonol sintasa es la responsable de la formación de flavonoles como la quercetina, el kampferol y la miricetina. Al contrario que los antocianos, donde el antociano pelargonidina no existe en la uva, si se encuentra el flavonol kampferol.

A partir de la quercetina se forma la isoramnetina y de la miricetina la larigitrina y siringetina mediante metil-transferasas. Todos estos flavonoles tienen sus derivados glucosilados que son más comunes en la uva.

El patrón de hidroxilación del anillo B es muy indicativo estructuralmente y determina en gran medida la coloración, estabilidad y capacidad antioxidante, por lo que la composición cualitativa de antocianos, flavonoles y flavanoles en las plantas estará determinada, en gran parte, por las actividades relativas de estas enzimas.

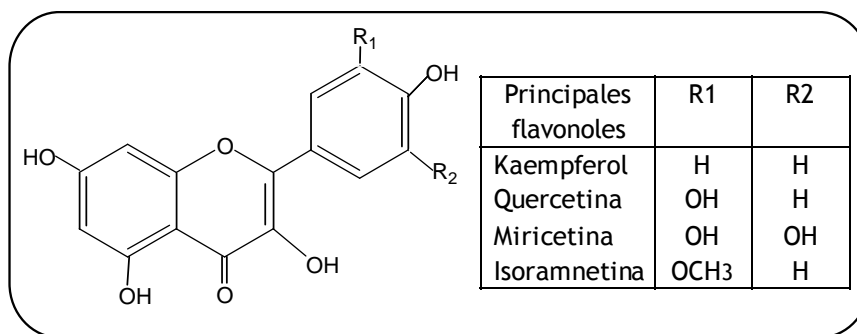
1.2 PAPEL DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LAS UVAS

1.2.1 Flavonoles

Los flavonoles son en parte responsables del color amarillo de algunos frutos, en concreto de la piel de las uvas blancas y naturalmente de una parte del color amarillo del vino blanco (Rivièreau-Gayon, 1964). Su estructura química se muestra en la Figura 1.2.

En la planta actúan como protectores de la luz ultravioleta. La energía de la luz ultravioleta que llega a la tierra puede ser suficiente para ocasionar una degradación fotoquímica de algunos componentes de las plantas, siendo los flavonoles los considerados mejores protectores contra la radiación UV y de la formación de radicales libres (Downey et al., 2006), por ello, aparecen en mayor concentración en los tejidos de la planta expuestos a alta radiación solar como son las hojas y las flores (Harborne, 1980). En diversos estudios se ha observado que la luz ultravioleta induce la síntesis de compuestos fenólicos, concretamente induce la expresión del gen de la chalcona sintasa, enzima clave en la biosíntesis de flavonoides (Merkle et al., 1994).

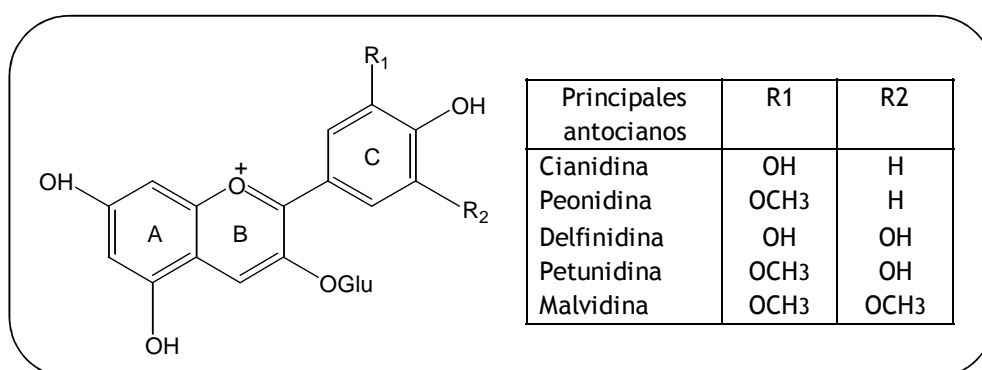
Figura 1.2: Estructura química de los flavonoles.



1.2.2 Antocianos

Los antocianos son los responsables de los colores rojos y azules de flores y frutos y en concreto, del color rojo azulado de la piel de las uvas tintas y por consiguiente del color del vino tinto (Glories, 1984; Ribéreau-Gayon, 1964). Su localización en la uva se limita a los hollejos, aunque también están presentes en la pulpa en variedades tintoreras (Cheynier et al., 2000). En la naturaleza se encuentran en forma glicosilada y se diferencian en el número de grupos hidroxilo y en su grado de metilación (Figura 1.3), siendo la malvidina 3-glucósido el antociano predominante en la uva (Baldi, 1995), y por tanto en el vino.

Figura 1.3: Estructura química de los antocianos.



Abreviaturas: Glu, glucosa.

A veces, las moléculas glicosiladas aparecen esterificadas por un ácido orgánico que suele ser un ácido hidroxicinámico como el cafeico, cumárico, ferúlico o sinápico, aunque también puede ser con otros ácidos como malónico, p-hidroxibenzoico, acético, etc. Estos antocianos acilados son más estables que su forma aglicona o glucosilada (Mazza y Brouillard, 1987; Bassa y Francis, 1987).

Históricamente, los flavonoides, y especialmente los antocianos, han sido ampliamente estudiados por su papel en el color de flores y frutos. Además de su función de pigmentos, en las plantas juegan una serie de papeles fisiológicos como atrayentes de insectos polinizadores, dispersión de semillas y protección de las plantas frente a condiciones de estrés.

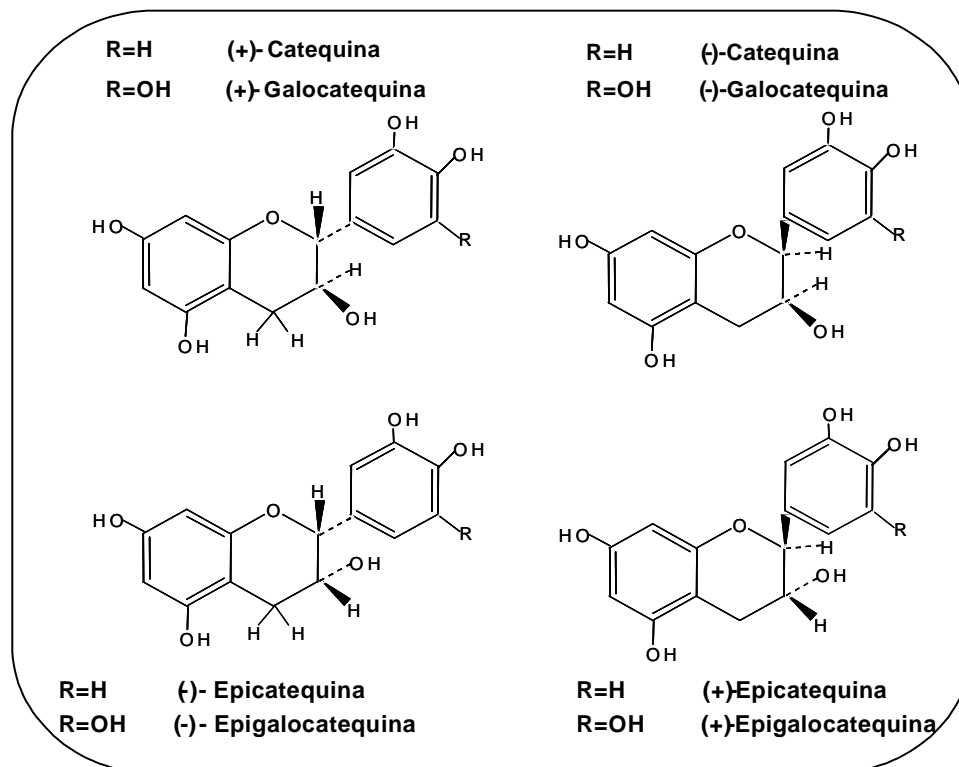
1.2.3 Flavanoles

Los flavanoles representan una compleja familia compuesta por las diferentes formas isoméricas de la catequina y sus polímeros (Cheynier et al., 2000) (Figura 1.4).

La estructura básica de la catequina presenta 2 carbonos asimétricos por lo que existen 4 isómeros: (+)/(-) catequina y epicatequina. Además el anillo aromático externo puede presentar un tercer grupo OH, dando lugar a las correspondientes (+)/(-) galocatequina y epigalocatequina. Por otra parte el grupo OH en posición 3 del heterociclo puede estar esterificado con una molécula de ácido gálico, por lo que también se puede incluir los 3-galatos de (+)/(-) (galo) catequina y epi (galo) catequina.

En la uva, los mayoritarios son la (+)-catequina, la (-)-epicatequina, la (-)-epigalocatequina y la (-)-epicatequina-3-O-galato (Cheynier et al., 2000). No obstante, los flavanoles monómeros representan tan sólo una pequeña proporción de la cantidad de estos compuestos en las uvas, ya que la mayor parte de ellos se encuentran en forma de polímeros (Czochanska et al., 1980). Estos polímeros se llaman taninos condenados o proantocianidinas y están formados por diferente número de unidades de los diversos flavanoles unidas mediante enlaces C4-C8 o C4-C6 (Ricardo da Silva et al., 1991).

Figura 1.4: Estructura química de los flavan-3-oles.

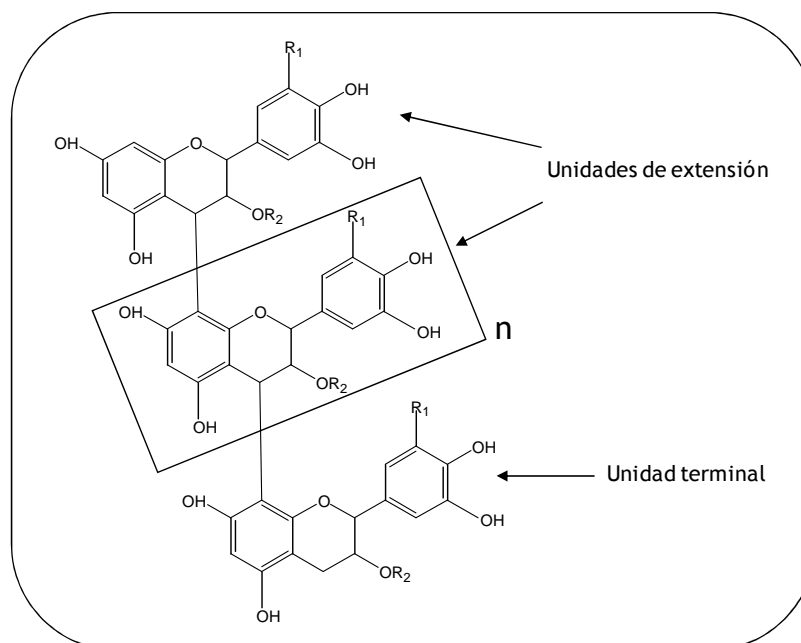


1.2.4 Proantocianidinas

Las proantocianidinas son los flavonoides cuantitativamente más importantes de la uva y el vino por su gran aporte a las características organolépticas y sus propiedades beneficiosas sobre la salud. Estas moléculas, como se ha comentado, son polímeros de flavanoles y su estructura aparece representada en la Figura 1.5. En dicha figura se representa la estructura polimérica de tipo B. Recientemente se ha detectado la presencia en la uva de polímeros de tipo A que poseen una unión extra de tipo éter entre el carbono 3 y el 7 (Passos et al., 2007).

Las proantocianidinas pueden presentar un número muy elevado de unidades, ya que los grados de polimerización medios son del orden de 11 en las semillas (Priour et al., 1994) y de 30 en los hollejos (Souquet et al., 1996), siendo el grado medio de polimerización en el vino de aproximadamente 7 (Sarni-Manchado et al., 1999).

Figura 1.5: Estructura química de las proantocianidinas.



El papel de estas estructuras en las plantas es debido a su habilidad para interactuar con proteínas y precipitarlas. Por esta razón, son capaces de inhibir enzimas digestivas y dar sabor astringente. Tanto es así que, por su amargor y astringencia, se piensa que actúan como repelentes de animales herbívoros e insectos, contribuyendo así a la defensa de las plantas ya que también son tóxicos para algunos animales y bacterias.

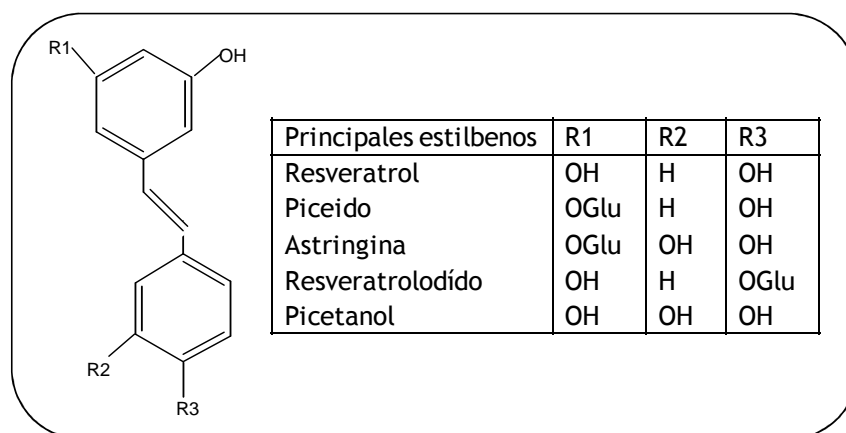
1.2.5 Estilbenos

Los estilbenos son un grupo de compuestos sintetizados por una amplia variedad de plantas, aunque las principales fuentes en la dieta son las uvas, el mosto, el vino, los cacahuetes y los arándanos (Burns et al., 2002; Aggarwal y Shishodia, 2006; Athar et al., 2007).

Los compuestos más representativos en la uva y el vino son resveratrol, piceido, picetanol, astringina, así como los dímeros y trímeros de resveratrol que dan lugar a las viniferinas (Cantos et al., 2003; Romero-Pérez et al., 1999). Sus estructuras químicas se muestran en la Figura 1.5.

El resveratrol es el estilbeno más ampliamente distribuido siendo mayoritario tanto en las uvas como en el vino. El piceido es su glucósido y aunque al principio del proceso de vinificación se encuentra en mayor cantidad incluso que el resveratrol, a lo largo del proceso se va hidrolizando, disminuyendo su cantidad y aumentando la del resveratrol (Mattivi et al., 1995). Las formas cis de estos dos últimos compuestos aparecen en las uvas en una concentración inferior y tienen menor actividad biológica que las formas trans (Vitrac et al., 2005). Otro compuesto de esta familia es el picetanol que tiene un grupo hidroxilo en posición 3' y le proporciona una estructura de o-difenol, confiriéndole mayor capacidad antioxidante y mayor captación de radicales (Fauconneau et al., 1997). Este compuesto también tiene una forma glicosilada que es la astringina que se encuentra en algunos vinos de forma minoritaria. Finalmente, las viniferinas se encuentran también de forma minoritaria de forma constitutiva en la uva y vino tinto, aunque son los estilbenos más fácilmente inducibles junto al resveratrol (Doulliet-Breuil et al., 1999).

Figura 1.5. Estructura química de los estilbenos.



Abreviaturas: Glu, glucosa.

Los estilbenos en la uva se localizan sólo en los hollejos (Jeandet et al., 1991). Desde el punto de vista organoléptico, los estilbenos no son importantes, sin embargo, el resveratrol ha sido muy estudiado por su importancia en la salud humana, ya que se le atribuyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas neuroprotectoras y cardioprotectoras (Provinciali et al, 2005; Virgili y Contestabile, 2000; Penumathsa y Maulik, 2009; Fan et al., 2008).

Estos compuestos son conocidas fitoalexinas, metabolitos secundarios sintetizados de *novo* por las plantas tras ser sometidas a algún estrés de tipo biótico como un ataque de insectos o abiótico como daños físicos, confiriendo mayor resistencia a la planta frente a enfermedades. Por ejemplo, tras una infección fúngica en las hojas, el trans-resveratrol es sintetizado y convertido en derivados más tóxicos como viniferinas en las hojas (Jeandet et al., 2002). Hay muchas fitoalexinas y cada una caracteriza a la familia a la que pertenece, por ejemplo, los estilbenos son característicos de la familia *Vitaceae*, las saponinas de la *Phytolaccaceae*, los índoles a las *Cruciferae*, etc (Harborne, 1999).

1.2.6 El papel de los compuestos polifenólicos en los procesos de resistencia de la planta

Los polifenoles son compuestos importantes en las plantas, concretamente las protegen de factores estresantes, tanto de tipo biótico como abiótico. Es más, algunos de estos compuestos sólo se inducen en presencia de dicho factor estresante, como por ejemplo las ya comentadas fitoalexinas. Estas fitoalexinas están involucradas en mecanismos de defensa de la planta desencadenados tras el ataque de un patógeno, una herida o un estrés físico (Cantos et al., 2003).

Los sistemas de defensa de las plantas son múltiples y pueden estar basados en barreras, tanto físicas como químicas, previamente existentes (tales como paredes celulares gruesas o altas cantidades de lignina o taninos) y en mecanismos de defensa inducibles. Tras la detección del patógeno o herbívoro, los mecanismos de defensa inducibles se activan en el lugar de la infección al igual que en tejidos no infectados distantes a dicho punto. Dependiendo del tipo de ataque, la planta activa diferentes rutas de señalización para sintetizar el conjunto de compuestos de defensa óptimos (Gozzo, 2003). Esta resistencia inducida tiene una duración determinada y protege a la planta de un amplio rango de patógenos ya que no es un mecanismo específico, pudiendo incluir a virus, bacterias y hongos.

Defensa mediada por especies reactivas del oxígeno. Cuando se produce un ataque por un patógeno avirulento, en la planta se activa una respuesta hipersensitiva. Esta respuesta desencadena la producción de diversas especies reactivas del oxígeno como son el peróxido de hidrógeno, los radicales superóxido e

hidroxilo y el oxígeno singlete, con un gran potencial oxidante que si no se destruyen pueden dañar los tejidos de la planta. Esta respuesta es duradera y provoca la muerte celular en el lugar de la invasión quedando así el patógeno aislado del resto de la planta (Gozzo, 2003).

Defensa mediada por ácido salicílico. El proceso de resistencia mediado por la acumulación de ácido salicílico endógeno, un metabolito del inicio de la ruta biosintética iniciada por la fenilalanina amino liasa, se llama resistencia sistémica adquirida y está basada en la inducción de rutas del metabolismo secundario de la planta y el aumento de la síntesis de productos de dicho metabolismo, flavonoides y estilbenos entre otros, como respuesta al ataque de un patógeno (Iriti et al., 2005). Esta resistencia se puede desarrollar en la misma zona o en lugares distales a ésta y es el resultado tanto de una invasión por un patógeno de tipo necrótico como de una respuesta hipersensitiva (Hammerschmidt, 1999).

Este proceso de defensa aún no se conoce en profundidad, pero se cree que el ácido salicílico, al ser un quelante del hierro, puede inhibir enzimas que contienen este elemento, como puede ser la catalasa, incrementando de este modo la concentración de peróxido de hidrógeno, lo que se cree que media en la resistencia sistémica adquirida (Chen et al., 1993). Además, el ácido salicílico también actúa como radical libre produciendo otras especies reactivas del oxígeno lo que desencadena un aumento de calcio en el citosol (Kawano y Muto, 2000). Dicho calcio también es una señal del mecanismo que involucra la activación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular. Por otro lado, parece ser que el ácido salicílico induce la peroxidación de lípidos, lo que está conectado con la activación de genes de proteínas de resistencia (Anderson et al., 1998).

Por tanto, se asume que el ácido salicílico actúa induciendo diversas acciones que conllevan un aumento de la resistencia. En primer lugar, es uno de los mecanismos por los que se activan genes de resistencia que dan lugar a proteínas de resistencia tales como glucanasas, peroxidasas y quitinasas, que tienen actividad antimicrobiana, ya que producen la hidrólisis de la pared celular del patógeno (Peitersen y van Loon, 1999). En segundo lugar, el ácido salicílico produce reacciones oxidativas que desencadenan la producción de fitoalexinas con propiedades antifúngicas. Finalmente, la ruta de los fenilpropanoides también es promovida mediante la activación de la enzima fenilalanina amino liasa que también desemboca en la formación de fitoalexinas, ligninas y ácido salicílico. La lignificación de las

paredes celulares de las plantas es un mecanismo de resistencia a la invasión de patógenos (Sticher et al., 1997; Gozzo, 2003).

Defensa mediada por jasmonatos. Además de este mecanismo de defensa sistémica adquirida, se han descrito otros que no dependen de la señal de ácido salicílico. Hay ácidos grasos oxigenados que pueden ser potentes reguladores de resistencia, especialmente los conocidos como jasmonatos (entre los que se encuentra el ácido jasmónico y su derivado el metil jasmonato) que señalizan un gran número de respuestas de defensa, incluida la síntesis de compuestos flavonoides y estilbenos (Beckers y Spoel, 2006). El ácido jasmónico es inducido rápidamente cuando la planta es atacada por un patógeno, especialmente si es de tipo necrotizante, aunque también es inducido por heridas o herbívoros. Este mecanismo también media la síntesis de las llamadas defensinas y tioninas, que son pequeñas proteínas ricas en cisteína con actividad antimicrobiana (Pieterse y van Loon, 1999).

A pesar de existir muchos ejemplos de interacción entre las rutas involucradas en la defensa de la planta, el proceso completo aún no es conocido en profundidad. Por ejemplo, la infección por un patógeno necrotizante desemboca en la expresión de genes de proteínas de resistencia, algunos dependientes y otros independientes del ácido salicílico (Pieterse y van Loon, 1999). Además, el metil jasmonato aumenta los niveles de expresión de la proteína de resistencia PR-1 que a su vez es inducida por ácido salicílico (Xu et al., 1994). Los jasmonatos y el ácido salicílico inducen la expresión de genes de proteínas de resistencia y aumentan la resistencia al daño por helada en tomate (Ding et al., 2002) y resistencia a enfermedades causadas por *Penicillium digitatum* y *P. italicum* en naranjas dulces (Iqbal et al., 2012).

1.3 PAPEL TECNOLÓGICO DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

La mayoría de estos compuestos son responsables de parte de las propiedades organolépticas y la calidad de los alimentos originados a partir de dichas plantas. Por ejemplo, los antocianos son pigmentos responsable del color de una gran variedad de frutas, flores y hojas (Harborne y Williams, 2000) y los flavan-3-oles son polifenoles implicados en la astringencia y el amargor del té, la uva y el vino (Noble, 1994; Halsam y Lilley, 1988). A pesar de tener un papel tecnológico importante en muchos

vegetales, este apartado se va a centrar en su papel en la uva y el vino, y por tanto de los compuestos que tecnológicamente tienen relevancia.

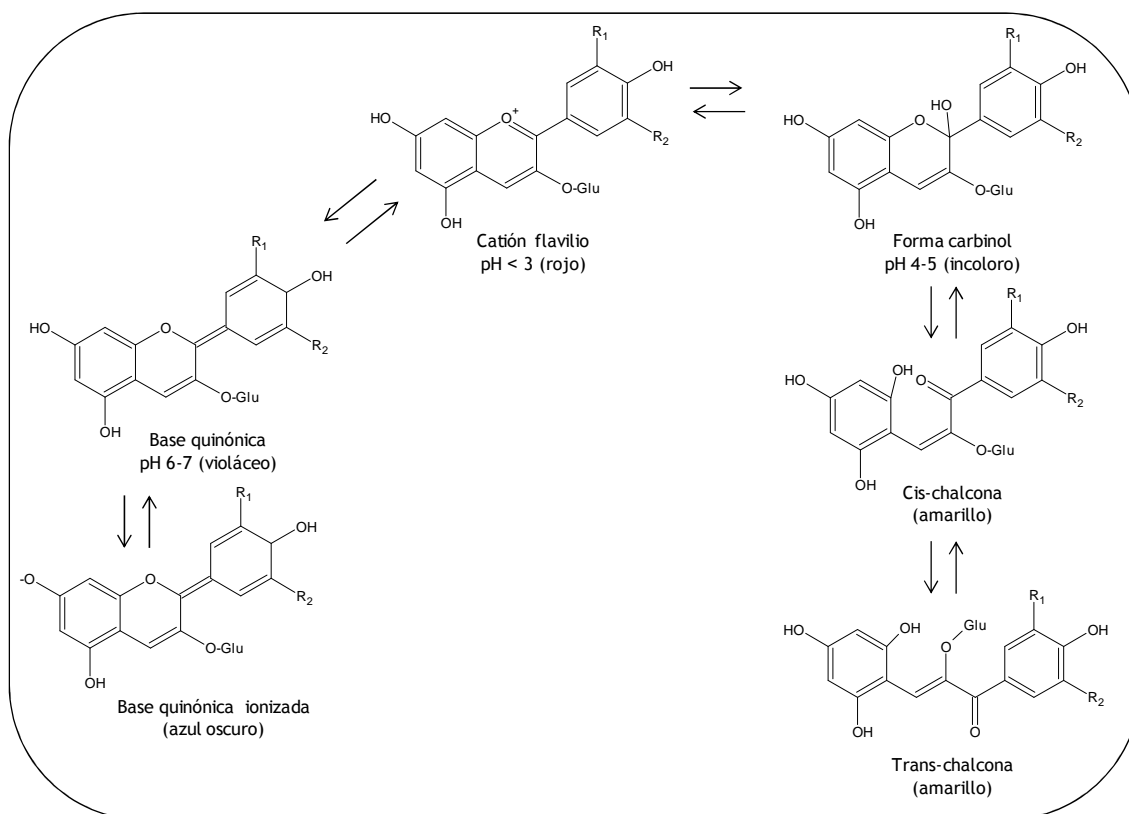
1.3.1 Color de uvas y vinos

Los antocianos, como ya se ha comentado, son fundamentales para el color de las uvas y los vinos obtenidos de ellas. El color de un vino es uno de los aspectos organolépticos más importantes ya que es la primera impresión que tenemos del producto y es un indicador de aspectos relacionados con el aroma y el sabor. Los antocianos son los responsables del color rojo azulado de la piel de las uvas tintas y del vino tinto.

Estos compuestos presentan un equilibrio entre formas químicas distintas en función del pH, lo que condiciona su color (Figura 1.6). A pH muy ácido, de un valor de 3 o menor, predomina el catión flavilio de color rojo. Sin embargo, a valores superiores de pH (4-5) se desprotona un grupo OH⁻ de las posiciones 5, 7 o 4, ya que al menos una de éstas está libre de metilación y glucosidación, dando un compuesto incoloro (forma carbinol) que se puede transformar en chalconas cis y trans amarillas favorecido por temperaturas elevadas. En el intervalo de pH entre 6 y 7, se forman quinonas con color violáceo, aunque si hay un segundo radical OH⁻ libre, se forma una base quinónica ionizada azul oscuro intenso. Este compuesto por apertura de uno de los anillos se transforma en una chalcona de color amarillo.

La presencia de anhídrido sulfuroso en los vinos tintos también produce una decoloración de antocianos reversible que supone una pérdida de intensidad de color temporal. Al pH del vino, la mayor parte del anhídrido sulfuroso libre está en forma de anión que puede combinarse con los antocianos en la forma de catión flavilio, produciéndose un complejo incoloro, que transcurrido un tiempo se descombina al reducirse la fracción de anhidro libre.

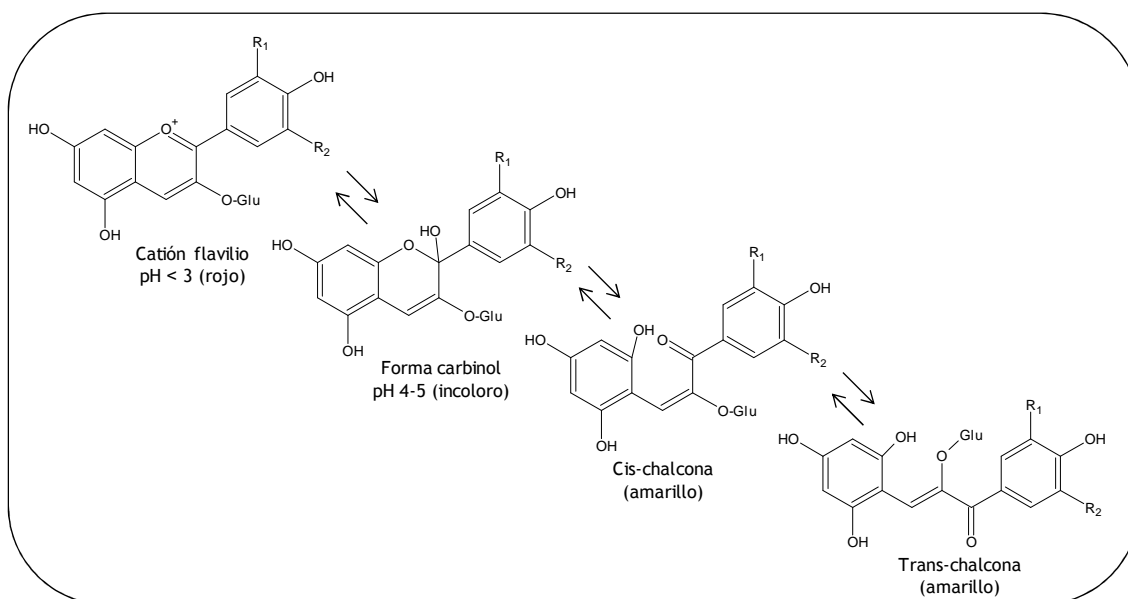
Figura 1.6. Cambios de la estructura de los antocianos en función del pH.



En medio acuoso y al pH del vino (3-4), los cationes flavilio están también en equilibrio, por fenómenos de transferencia de protones y reacciones de hidratación con compuestos de adición incoloros (hemiacetal). El hemiacetal en equilibrio con su isómero abierto (cis-chalcona) es en realidad la forma más abundante. Finalmente, la chalcona trans puede ser oxidada dando ácidos fenólicos incoloros, siendo esta reacción irreversible a diferencia de las demás (Zamora, 2003) (Figura 1.7).

El color del vino joven tinto es principalmente debido a los antocianos que se han extraído de las pieles de uva durante la maceración. Durante el envejecimiento de los vinos, el color evoluciona constantemente pasando de tonos rojos violáceos a tonos teja. Estas modificaciones se deben a transformaciones de los antocianos que aumentan la estabilidad de color de los vinos por la formación de nuevos compuestos y reacciones de condensación con proantocianidinas principalmente (Mateus et al., 2002; Vidal et al., 2002).

Figura 1.7. Cambios de la estructura de los antocianos en medio acuoso y a pH del vino (3-4).

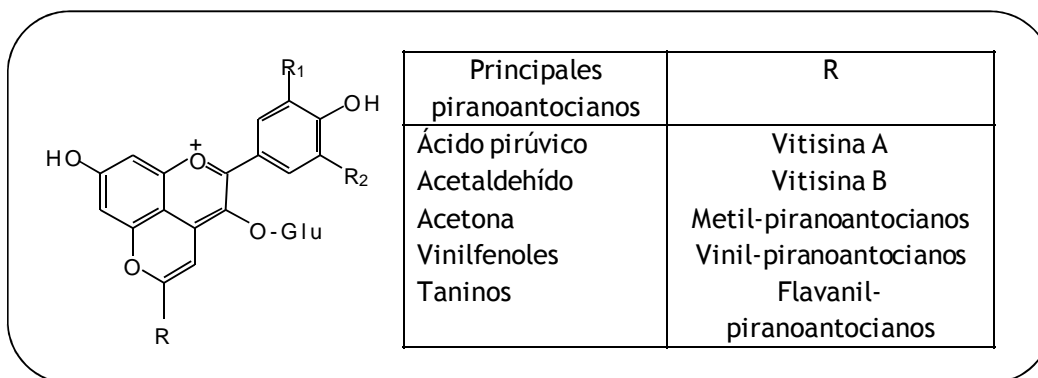


La formación de pigmentos nuevos en el vino derivados de los antocianos da lugar a los llamados piranoantocianos (Fulcrand et al., 1996). Se originan por reacción de cicloadición de los antocianos con metabolitos de bajo peso molecular derivados de las levaduras como acetaldehído, ácido pirúvico y vinilfenol (Figura 1.8). Además pueden incluir especies de mayor peso molecular en las que la molécula de piranoantociano está unida a taninos más o menos polimerizados dando los flavanil-piranoantocianos (Francia-Aricha et al., 1997). Estos compuestos son muy poco sensibles a cambios de pH y a decoloración por SO₂ y son químicamente muy estables (Oliveira et al., 2006).

Dentro de la familia de los piranoantocianos se encuentran las vitisinas, el grupo más estudiado y que resultan de la reacción entre un antociano y ácido pirúvico, acetoacético o acetaldehído. Dentro de este grupo destacan las vitisinas tipo A y B. Las primeras se forman por la combinación entre un antociano y el ácido pirúvico en forma enol y la más abundante es la vitisina A formada con la malvidina 3-glucosido. La vitisina A tiene bajo ritmo de degradación y alta estabilidad (Mateus y De Freitas, 2001; Romero y Bakker, 2001) y se ha visto que persiste en el vino tinto durante varias décadas (Schwarz et al., 2003). Por otro lado, las vitisinas tipo B se forman por cicloadición de una molécula de acetaldehído y una de antociano durante

el final de la fermentación, que es cuando este metabolito se encuentra en la proporción adecuada.

Figura 1.8. Estructura química de los piranoantocianos.



Abreviaturas: Glu, glucosa.

Otro factor que afecta al color de los vinos es la copigmentación, que es un fenómeno que se produce típicamente en medio acuoso y que afecta a los antocianos monoméricos (pigmentos) a la vez que a otros compuestos fenólicos presentes en el medio, denominados cofactores de copigmentación o copigmentos. La copigmentación consiste en la unión de tipo débil entre la molécula plana del antociano y un copigmento. Dicho copigmento puede ser otra molécula de antociano (copigmentación intramolecular) u otra molécula diferente como los ácidos cinámicos, flavanoles y flavonoles y sus glicósidos (copigmentación intermolecular). Entre los antocianos y los cofactores se forma una estructura en capas, en un número variable de dos a diez.

Al pH del vino, aproximadamente el 80% de los antocianos están en la forma hidratada incolora, a no ser que tenga lugar algún tipo de mecanismo estabilizador del color. La copigmentación genera un ambiente hidrofóbico que impide el ataque nucleofílico de una molécula de agua o de bisulfito, evitando la disminución de color que ello supone (Glories, 1984). Igualmente, desplaza el equilibrio favoreciendo la formación de estructuras coloreadas (catión flavilio) (Liao et al., 1992). Los flavonoles, aunque son incoloros, pueden participar en el color de los vinos tintos a través de reacciones de copigmentación ya que son buenos copigmentos (Boulton, 2001). Este fenómeno también protege a los antocianos de las reacciones de oxidación y polimerización que disminuyen el color porque éstos no están disponibles

en su forma libre (Darias-Martín et al., 2001). Se estima que este fenómeno determina entre el 25 y el 50% del color de los vinos tintos jóvenes (Boulton, 2001), aunque su influencia en el color del vino decrece con el envejecimiento.

1.3.2 Astringencia, cuerpo y amargor de los vinos

Las proantocianidinas o taninos del vino tienen un papel importante en sus propiedades gustativas porque contribuyen al cuerpo, el amargor y la astringencia de los vinos (Gawel, 1998). La habilidad de los taninos de formar complejos y precipitar las proteínas se cree que es la responsable de la astringencia de estos compuestos. Sin embargo, la sensación de astringencia en boca es compleja a la hora de ser evaluada, ya que la precipitación de las proteínas no es una condición necesaria para dicha sensación (Obreque-Slier et al., 2010) y la respuesta fisiológica de cada individuo es distinta ya que el flujo salival, la viscosidad y la composición proteica varía entre persona y tiene un efecto significativo sobre la percepción de la astringencia (Demiglio y Pickering, 2008; Dinnella et al., 2009; Condelli et al., 2006).

A pesar de esto, se ha demostrado que esta sensación de astringencia depende de la estructura de los taninos, concretamente de su grado medio de polimerización (GPM) y su porcentaje de galoilación. Al estudiar fracciones de taninos purificados de uva y manzana, se ha demostrado que la astringencia aumenta con el grado medio de polimerización. La sensación de aspereza se correlaciona con el aumento del porcentaje de galoilación y, finalmente, la presencia de unidades de epigallocatequina hace que el vino dé una sensación más suave en boca (Vidal et al., 2003). Los taninos, en especial los taninos condensados más pequeños, también interaccionan con los receptores del gusto amargo influenciando así la sensación de amargor (Kallithraka et al., 1997; Kallithraka et al., 2001; Brossaud et al., 2001).

1.4 PAPEL NUTRICIONAL DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

En los últimos tiempos la industria está cada vez más interesada en alimentos funcionales, que son definidos como alimentos que pueden "satisfactoriamente demostrar que afectan beneficiosamente a una o más funciones importantes del organismo humano más allá de tener adecuados efectos nutricionales y es relevante bien para mejorar la salud y bienestar o reducción de riesgo de enfermedad"

(Diplock et al., 1999). Esto se debe a que los consumidores cada vez le dan más importancia a la nutrición y la salud.

El vino ha sido parte de la cultura humana desde hace miles de años. Antecedentes históricos relacionan al vino con la salud y la longevidad, especialmente en la cultura mediterránea y principalmente en la prevención de enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo (arteriosclerosis, artritis, demencia, cáncer, etc.). Estos beneficios guardan relación, en parte, con las conclusiones de un estudio llevado a cabo en 1992 en el que se comparó la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) y el nivel de colesterol sérico en distintas poblaciones del mundo (Renaud y Delorgeril, 1992). La correlación obtenida en este estudio fue altamente positiva para las poblaciones estudiadas, excepto para Toulouse, cuya población mostraba los mismos niveles de colesterol en sangre que la de Glasgow pero una tasa de mortalidad por ECV mucho menor. Esta aparente discrepancia entre el riesgo de sufrir ECV (alto colesterol en sangre) y muerte por ECV se denominó "Paradoja Francesa".

Tras el estudio minucioso de las variables que podrían contribuir a esta discrepancia, se señaló al elevado consumo de vino tinto en Toulouse como presunto responsable de la citada "Paradoja Francesa". Muchos estudios posteriores han corroborado que el elevado contenido en fenoles del vino tinto le confiere estas propiedades beneficiosas para la salud.

En esta línea se ha sugerido que una elevada ingesta de alimentos ricos en dichos compuestos confiere cierta protección ante enfermedades cardiovasculares, cáncer, Alzheimer, etc (Leifert y Abeywardena, 2008; Croizier et al., 2009; De Pascual-Teresa et al., 2010; Pezzuto, 2007).

Una de las propiedades más reconocidas de los compuestos fenólicos es su capacidad antioxidante debida a varios mecanismos (Parr y Bolwel, 2000): tienen la capacidad de captar radicales libres que se estabilizan por resonancia, son quelantes de iones metálicos disminuyendo la generación de radicales libres catalizada por metales, son donadores de hidrógenos que pueden reaccionar con los radicales generados al deshidrogenar macromoléculas como ADN (relevantes en la inducción de cáncer) o lípidos (relevantes en la inducción de ECV) y, finalmente son inhibidores de enzimas pro-oxidantes.

La Organización Mundial para la Salud indica que los polifenoles en general pueden reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular debido a distintos mecanismos: por ser antioxidantes previenen la oxidación de las lipoproteínas de

baja densidad LDL (evitando así la deposición de las grasas en las arterias), inhiben la agregación de las plaquetas sanguíneas bloqueando la acción de la trombina y de otros factores agregantes y evitando así la formación de trombos, favorecen la producción de óxido nítrico que relaja y dilata las arterias, reducen los niveles de triglicéridos y de colesterol en sangre y finalmente, estimulan la síntesis de sustancias vasodilatadoras.

Además, es de destacar que a los compuestos fenólicos en general también se les atribuye actividad anticancerígena con dos posibles mecanismos según el punto de acción: agentes bloqueantes y agentes supresores. Los agentes bloqueantes principalmente estimulan los enzimas detoxificantes carcinogénicos (como glutatión S-transferasa) e inhiben enzimas que tienen el potencial de activar precarcinógenos en carcinógenos (como algunas formas del citocromo P450). Este es el caso de fenoles como catequina, epigallocatequina, cumarina y ácido elágico. Los agentes supresores modelan rutas de transducción de la señal inhibiendo la carcinogénesis como es el caso de inhibidores de la tirosina quinasa (quercetina y cumarina) (Parr y Bolwell, 2000). El resveratrol y algunos de sus derivados inhiben el proceso de la carcinogénesis en sus tres etapas: iniciación, promoción y progresión del tumor dependiendo de la dosis empleada (Yang et al., 2001). Provinciali et al. (2005) demostraron que el resveratrol induce la apoptosis como parte de su actividad anticancerígena en diferentes cultivos celulares.

1.5 LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE UVAS Y VINO

La fracción aromática tanto del vino como de la uva es compleja ya que está formada por una gran cantidad de compuestos con diversas estructuras químicas, que están presentes en concentraciones pequeñas y cuyo umbral de percepción abarca un amplio rango de valores (Bayonove et al., 2000; Styger et al., 2011). En el vino, dicha fracción juega un papel importante ya que afecta a la calidad, por su contribución a sus características organolépticas.

El aroma del vino se atribuye a un amplio número de compuestos tales como ésteres, aldehídos, cetonas, terpenos, isoprenoides, alcoholes, derivados azufrados, etc. Dichos componentes se clasifican según su origen como aromas varietales o primarios (procedentes de la uva); aromas secundarios (provenientes de la fermentación alcohólica y maloláctica) y aromas post-fermentativos o terciarios

(derivados del envejecimiento del vino y su conservación) (Cordonnier y Bayonove, 1981). El estudio de estos compuestos puede contribuir a la selección de la variedad más adecuada y a las condiciones óptimas de vinificación y envejecimiento. Puede incluso tener un papel en la seguridad alimentaria, ya que la detección de ciertos aromas puede implicar infección microbiana.

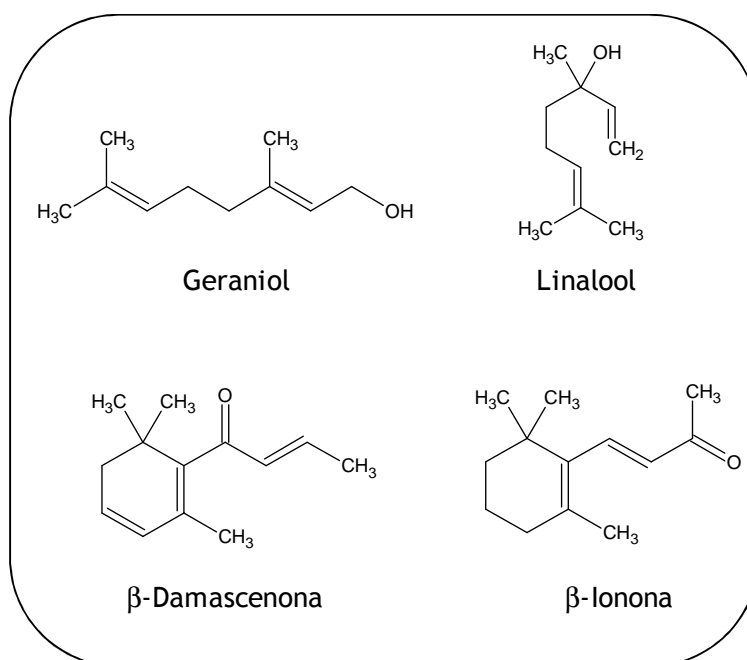
El aroma primario o varietal del vino depende, por tanto, de la variedad de uva y puede ser modulado por otros factores como el clon (Gómez-Plaza et al., 1999), el área de cultivo, las prácticas culturales como aclareo de hojas o racimos (Zoecklein et al., 1998), el efecto de sombreado y la luminosidad (Bureau et al., 2000a; Bureau et al., 2000b), parámetros de cultivo (Oliveira et al., 2004; Oliva et al., 2008), características climáticas (Zamuz et al., 2009) y tratamientos efectuados a las uvas.

Una familia importante de estos compuestos volátiles, cuyo origen está en la uva, es la que comprende los terpenoides y los norisoprenoides. Los terpenoides más comunes son monoterpenos tales como geraniol y linalool y entre los norisoprenoides los más significativos son β -ionona and β -damascenona (Figura 1.9). Éstos son potentes compuestos de flavor que contribuyen a los atributos florales y frutales de los vinos (Mathieu et al., 2005).

Todos los procesos que ocurren desde la vendimia hasta el inicio de la fermentación alcohólica dan lugar a la aparición de los aromas pre-fermentativos. Los compuestos volátiles de tipo C6 son los compuestos que contribuyen mayoritariamente a este aroma pre-fermentativo de los vinos. Éstos incluyen aldehídos tales como hexanal, cis 3-hexanal y trans 2-hexanal y sus alcoholes. Este tipo de compuestos tienen un impacto en el aroma herbáceo y el flavor amargo del vino.

Las sustancias volátiles generadas durante la fermentación son muy numerosas y complejas y son responsables de las notas vínicas o aromas fermentativos. Entre dichos metabolitos, los más abundantes son los alcoholes y los ésteres junto con algunos aldehídos y ácidos.

Figura 1.9: Estructuras generales de los monoterpenos geraniol y linalool y los norisoprenoides β -ionona and β -damascenona.



Finalmente, los aromas post-fermentativos son aquellos que aparecen debido a las reacciones químicas que tienen lugar durante el almacenamiento y el envejecimiento del vino como hidrólisis de ésteres, compuestos aromáticos reductivos, etc. Además, el tipo de envejecimiento marcará notablemente el aroma del vino, los vinos envejecidos en barricas de roble reciben de la madera un conjunto de sustancias que modifican las características organolépticas de éstos. Su concentración o presencia depende de diversos factores ampliamente estudiados tales como el tiempo de contacto, el origen de la madera, el volumen de la barrica y el tipo de tostado (Rodríguez-Rodríguez y Gómez-Plaza, 2011; Ortega-Heras et al., 2007; Pérez-Prieto et al., 2003). Compuestos como vainillina, eugenol y whiskylactonas son procedentes de la barrica y tiene gran repercusión en el aroma del vino ya que tienen un bajo umbral de percepción, dando notas a vainilla, clavo y tostado, respectivamente.

1.5.1 Papel de los compuestos volátiles en la planta

Las sustancias aromáticas, al igual que los flavonoides, son metabolitos secundarios con diversas funciones dentro de la planta. Su papel es preponderante en

el ciclo de la vida de la planta por transmitir y proporcionar información con el ambiente que la rodea, generando redes interactivas con implicaciones ecológicas, fisiológicas y atmosféricas (Peñuelas y LLusia, 2001; Holopainen, 2004). Este papel implica diversas propiedades que se exponen a continuación:

Atrayentes de polinizadores. Se supone que el principal motivo por el que un insecto polinizador se aproxima a una flor es por su olor que está determinado por la mezcla de compuestos volátiles producidos por la planta (Harborne, 2001).

Selección y localización del huésped. Los insectos que utilizan la planta como alimento, lugar de refugio, apareamiento u ovoposición lo suelen hacer en unas especies concretas que son localizadas por su olor, color y morfología, distinguiéndolas así del resto (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007).

Defensa. La mayoría de metabolitos secundarios se consideran parte de la defensa química de la planta porque son tóxicos para muchos insectos y microorganismos como es el caso de los terpenos. Hay compuestos volátiles que se emiten cuando la planta es dañada por un insecto herbívoro como una señal para activar el mecanismo de defensa, disminuyendo, por un lado, la ovoposición de dichos insectos y atrayendo, por otro lado, a los predadores de sus huevos como es el caso de terpenos, aldehídos y compuestos C6 (Kessler y Baldwin, 2001). Tanto los compuestos fenólicos, ya mencionados, como los volátiles son sintetizados por la planta como parte de los mecanismos de defensa inducidos por moléculas señal como el ácido salicílico y los jasmonatos para protegerla ante un ataque.

Comunicación entre plantas. Parece que hay plantas que pueden reconocer volátiles emitidos por otras cercanas tras sufrir un ataque por un herbívoro o patógeno, activando así su mecanismo de defensa y estando preparadas para un posible ataque (Dicke y Bruin, 2001).

Interacción con feromonas. Los volátiles de las plantas pueden interactuar con las feromonas de ciertos insectos provocando distintos comportamientos en éstos: algunos los secuestran para usarlos como hormonas sexuales o precursores, otros liberan dichas hormonas en respuesta a los volátiles de la planta huésped y,

finalmente, los volátiles pueden tener un efecto sinérgico o inhibitorio con dichas hormonas (Reddy y Guerrero, 2004).

Antioxidantes y termorreguladores. Volátiles como el isopreno y algunos monoterpenos tienen actividad antioxidante ya que atrapan los radicales libres, protegiendo a las membranas del daño oxidativo (Holopainen, 2004). Igualmente, existe la hipótesis de que estos mismos compuestos protegen a la planta de altas temperaturas porque las que los producen parecen ser más termorresistentes (Peñuelas y Llosia, 2004).

1.6 MECANISMOS PARA AUMENTAR LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y VOLÁTILES EN LAS UVAS

Por todo lo comentado hasta ahora y que pone de manifiesto la importancia de los compuestos fenólicos y volátiles, diferentes mecanismos se han ensayado para el incremento de sus niveles en las plantas.

1.6.1 Prácticas culturales

Las técnicas más utilizadas para este fin afectan a prácticas culturales como poda, aclareo de racimos y riego deficitario. En esta línea, Pérez-Lamela et al. (2007) estudiaron la influencia del sistema de conducción y la poda en la intensidad de color, los polifenoles totales y los antocianos y taninos totales de vino elaborado con tres variedades de uva tinta. El efecto de la intensidad de poda en los fenoles totales también ha sido investigado en otras frutas como mangos, y los resultados indicaron que la poda moderada aumenta dichos compuestos comparado con el control (Singh et al., 2010). El aclareo de racimos y la poda aumentaron la cantidad de antocianinas totales tanto en uvas tintas Tannat como Malbec (González-Neves et al., 2002; Fanzone et al., 2011), mientras que Soufleros et al. (2011) también encontraron que el aclareo de racimos aumentaba la concentración de antocianos (de 52 a 89%) y taninos (de 56,2 a 114%) en uva tinta durante la maduración. El aclareo de racimos y de hojas basales también se ha estudiado en diversas variedades de uva como Merlot, Cabernet Franc y Cabernet Sauvignon resultando en

modificaciones en el aroma de los vinos resultantes (Di Profio et al., 2011). El aclareo de sarmientos aumentó los niveles de antocianinas y disminuyó los de alcoholes C6 en uvas de la variedad Marechal Foch (Sun et al., 2011).

Otra práctica cultural que puede modificar el contenido de los compuestos estudiados es el riego deficitario que, especialmente cuando se aplica antes del envero, produce un aumento en antocianos de hollejo en uvas de Cabernet Sauvignon (Koundouras et al., 2009). Basile et al. (2011) estudiaron distintos regímenes de irrigación durante tres estados de desarrollo distinto de la uva, encontrando que la concentración de antocianos y polifenoles aumentó cuando la escasez de agua se produjo de la antesis hasta la fructificación, seguido de estrés hídrico moderado entre el cuajado del fruto y la maduración y de estrés hídrico de moderado a severo tras la maduración. Este parámetro también influye el aroma del vino, por ejemplo, se han encontrado aromas y sabores retronasales diferentes en vinos elaborados con uvas de Pinot Noir cultivadas a bajo régimen de irrigación y un menor aroma floral y especiado, aunque se observó una influencia de la añada estudiada (Ledderhof et al., 2014). La deshidratación tras la vendimia de uva de la variedad Tempranillo para la elaboración de vinos dulces también resultó útil en el incremento de compuestos aromáticos con notas a especias y fruta madura y para la disminución de alcoholes C6 y aldehídos con notas herbáceas (De Lerma et al., 2014).

1.6.2 Mejora clásica, selección clonal e híbridos

Los métodos de mejora para modificar ciertas características en las plantas se han practicado a lo largo de muchos años. Esto se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas como la mejora clásica (selección de plantas con las características deseadas y su propagación vegetativa), el cruce entre individuos relacionados o no para producir nuevas variedades o híbridos con las propiedades deseadas y la selección de clones de la misma variedad que expresen atributos interesantes.

En esta línea, el perfil antociánico y las características cromáticas de una colección de 143 plantas provenientes de cruces de uvas tintas de las variedades Monastrell x Cabernet Sauvignon han sido estudiadas para seleccionar las más interesantes según sus características enológicas, detectando descendientes con perfiles fenólicos muy interesantes (Gómez-Plaza et al., 2008). Hernández-Jiménez et al. (2009) estudiaron el perfil tánico de hollejo y semilla de cruces de uva tinta de

Monastrell x Syrah (*Vitis vinifera* L.). Cadwallader et al. (2004) estudiaron una nueva variedad de uva, Chardonel, resultado del cruzamiento entre Chardonnay x Seyval, caracterizando su composición aromática mediante la identificación de varios esteroides, β -damascenona, 3-metil-1-butanol y 2-feniletanol.

La selección clonal también ha sido una herramienta importante para mejorar el contenido de estos compuestos. La composición fenólica de clones de una variedad dada puede ser usada como factor discriminante entre clones. Un ejemplo de ello es el análisis de antocianos, flavonoles y ácidos hidroxicinámicos para distinguir entre clones de *Vitis vinifera* L. de la variedad Barbera (Ferrandino y Guidoni, 2010). Durante el estudio de distintos clones de uva Tempranillo, Revilla et al. (2009) observaron diferencias con respecto a su contenido fenólico. Además, algunos clones han mostrado la capacidad de producir vinos con un color, un perfil cromático y un contenido fenólico distintivos (Gómez-Plaza et al., 2000). Burin et al. (2011) estudiaron vinos de Cabernet Sauvignon elaborados a partir de dos clones distintos y observaron diferencias en sus características cromáticas. Igualmente, se detectaron diferencias en la composición de aromas en vinos elaborados con siete clones de la variedad Monastrell como en el total de alcoholes y esteroides (Gómez-Plaza et al., 1999).

1.6.3 Ingeniería genética

La ingeniería genética ha sido utilizada para modificar la biosíntesis de flavonoides en tejidos vegetales (Martens et al., 2003). Schijlen et al. (2006) produjeron tomates transgénicos al introducir genes estructurales de flavonoides, siendo así capaces de sintetizar estilbenos, deoxichalconas, flavonas y flavonoles. Mayores niveles de catequina (41 veces) y epicatequina (14 veces) se han encontrado en líneas transgénicas de manzanas a las que se le introdujeron un gen de maíz (Li et al., 2007). También se ha utilizado para aumentar la resistencia de las plantas a hongos (Punja, 2001). En el caso de las uvas, se han descrito diversos métodos para la transformación genética de esta planta (Perl y Eshdat, 1998), como por ejemplo la transformación genética vía organogénesis de uva de mesa (Mezzetti et al., 2002), aunque se han descrito muchos más casos del uso de genes de la uva para transformar otras frutas que de transformaciones de uva para aumentar sus niveles de polifenoles. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que la

transformación genética es tediosa, cara e involucra muchas cuestiones de regulación y no tiene mucha aceptación pública.

1.6.4 Uso de elicitores

Un nuevo campo de interés ha comenzado en los últimos años al descubrir que los mecanismos de defensa de la planta, entre ellos el aumento de compuestos fenólicos y algunos compuestos volátiles, se pueden activar en ausencia de un estímulo con el uso de elicitores. Éstos son sustancias que al aplicarlas exógenamente desencadenan todos los mecanismos defensivos de la planta (Thaler et al., 2002; Filella et al., 2006; Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013). Por ello, el uso dichos elicitores puede ser beneficioso por el aumento en la resistencia a estrés biótico y abiótico y el incremento de la síntesis de fenoles (Iriti et al., 2004; Fumagalli et al., 2006) y compuestos aromáticos (Lalel et al., 2003; Ayala-Zabala et al., 2005; Kondo et al., 2005).

1.7 EL USO DE ELICITORES

A pesar de que los elicitores fueron usados inicialmente para inducir la resistencia de la planta frente a patógenos, se encontró que dicho mecanismo involucra el aumento de compuestos fenólicos y aromáticos. Por tanto, los elicitores pueden ser considerados como una alternativa interesante para obtener plantas con altos contenido de dichos compuestos. La activación de dichos mecanismos de defensa se puede alcanzar en ausencia de un ataque mediante elicitación física o química.

1.7.1 Elicitores físicos

Los elicitores físicos son estímulos que, al aplicarlos a células vivas, desencadenan mejoras en la biosíntesis de compuestos específicos. Esto se debe a que producen estrés en la planta y así se ve afectado su metabolismo secundario promoviéndose la síntesis de compuestos que pueden resultar de interés como los

flavonoides y los compuestos volátiles. Dentro de estos agentes se incluyen por ejemplo altas y bajas temperaturas, luz ultravioleta, rayos gamma, ozono, etc.

1.7.1.1 Irradiaciones de luz

Las distintas irradiaciones pueden presentar un ambiente estresante que puede servir de señal en la planta para el control y la regulación de su crecimiento y desarrollo (Chen et al., 2004). Así, través de distintos fotorreceptores como fitocromos y criptocromos, se detectan las distintas condiciones ambientales en las que la planta se encuadra y es capaz de emitir una respuesta (Smith, 2000).

Luz ultravioleta. Se denomina luz ultravioleta a la radiación electromagnética que está comprendida entre los 15 y los 400 nm de longitud de onda. El tratamiento con este agente físico se lleva a cabo con diversos sistemas de lámparas que pueden irradiar luz de diversos tipos: A (con longitudes de onda de 320 a 400 nm), B (de 280 a 320 nm) o C (de 200 a 280 nm).

Esta es la irradiación más estudiada como tratamiento para el incremento de metabolitos secundarios en la fruta y su conservación. Se ha comprobado que someter a irradiación con luz UV-C estimula tanto la producción de resveratrol como la activación de la estilbeno sintasa en hojas de vid (Wang et al., 2010). Además, el contenido en estilbenos de uvas Monastrell irradiadas con luz UV-C y de sus vinos fue mayor que en uvas control y su vino (Cantos et al., 2003). En otras frutas, el tratamiento post cosecha con radiación UV de arándanos incrementó los compuestos fenólicos volátiles y no volátiles (Eichholz et al., 2011) y en mangos se observaron mayores niveles de polifenoles y flavonoides totales y de actividad de la fenilalanina amonio liasa (González-Aguilar et al., 2007).

Otras irradiaciones. En uva, también se ha comprobado que la acumulación de antocianos es altamente inducida por la exposición a luz roja, infrarroja y azul, mientras que la luz entre el verde y el amarillo es menos efectiva (Kataoka et al., 2004). En el caso de estilbenos, el tratamiento con luz roja ha mostrado un aumento en estilbenos libres y monogucosilados en suspensiones celulares de *Vitis vinifera* (Tassoni et al., 2012). La combinación de elicitores físicos y químicos también se ha estudiado, concretamente el efecto de la combinación de luz roja y metil jasmonato,

que en este mismo estudio de cultivos celulares incrementaba aún más la producción de estilbenos.

1.7.1.2 Gases

Diversos gases como dióxido de carbono u ozono también se pueden utilizar como elicitores físicos. Por ejemplo, la exposición a ozono parece aumentar la resistencia del tomate a *Botrytis cinérea* (Tzortzakis et al., 2011) y el tratamiento post cosecha en arándanos con dióxido de carbono de uvas indujo la síntesis de proantocianidinas (Becatti et al., 2010).

1.7.2 Elicitores químicos

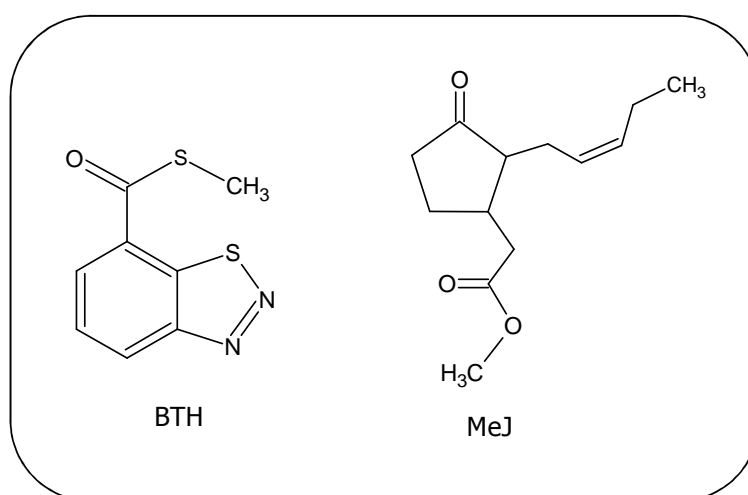
Los elicitores químicos como el quitosano, el benzotiadiazol (BTH) o la harpina, entre otros, son agroquímicos que imitan la acción de moléculas señal (como el ácido salicílico o el jasmónico o sus derivados) o simulan el ataque de un patógeno. Dichas moléculas interactúan con receptores en la planta activando la respuesta defensiva y una reacción de hipersensibilización. Por ejemplo, las principales sustancias de resistencia como fenoles totales y lignina aumentaron tras el tratamiento post cosecha con BTH en mangos (Pan y Liu, 2011) y la incidencia de la enfermedad causada por *Penicillium expansum* en melocotones tratados con BTH fue inferior que en los no tratados (Liu et al., 2005). Otro ejemplo se encuentra en la aplicación foliar de harpina en tomates que redujo la infección bacteriana (Obradovic et al., 2004).

Es más, se ha visto que el mecanismo de defensa de la planta responde más rápidamente al desafío del ataque por patógenos tras haber recibido un tratamiento con este tipo de inductores químicos (Gozzo, 2003) y, por este motivo, se diseñaron en un principio para mejorar la resistencia de las plantas a patógenos. Estos compuestos no matan a los patógenos por sí mismos, pero desencadenan el mecanismo que la planta posee para aumentar su resistencia, entre otros, aumentando los niveles de compuestos fenólicos y volátiles.

1.7.2.1 Benzotiadiazol (BTH)

Este compuesto es un análogo del ácido salicílico y tiene un peso molecular de 136,17 (Figura 1.10). Es conocido por inducir la activación de la enzima fenilalanina amino liasa que como ya se ha mencionado anteriormente participa en la ruta del ácido siquímico, lo que se ha comprobado en diversas frutas como mangos (Zhu et al., 2008) y melocotones (Liu et al., 2005), aumentando el contenido en compuestos fenólicos. Otras enzimas de la misma ruta también son activadas por BTH como son la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, siquimato deshidrogenasa, tirosina amonio liasa, cinamato-4-hiroxilasa, cumarato-coenzima A ligasa y dihidroflavonol-4-reductasa (Cao et al., 2010) (Figura 1.11).

Figura 1.10: Estructura química de los elicitores benzotiadiazol (BTH) y metil jasmonato (MeJ).



Además de los estudios ya mencionados en actividades enzimáticas, el efecto general del BTH en los compuestos polifenólicos y volátiles ha sido estudiado en diversas frutas, aunque menos en este último tipo de compuestos. Por ejemplo, el tratamiento precosecha en fresas produjo un incremento en quercetina y kaempferol (Anttonen et al., 2003), incrementó la resistencia a *Botrytis cinerea* y el contenido en antocianos y resveratrol (Iriti et al., 2004) y de las proantocianidinas de hollejo (Iriti et al., 2005; Fumagalli et al., 2006) en uva tinta. Tratamientos post cosecha con este elicitor también resultaron en un aumento de polifenoles y antocianos en fresas (Cao et al., 2011).

Como se ha comentado con anterioridad, hay menos estudios del efecto del BTH en los compuestos volátiles, éste aplicado en campo a uvas de la variedad Gropello Gentile dió lugar a vinos con mayor cantidad de acetales y ésteres totales (Vitalini et al., 2014).

1.7.2.2 Metil jasmonato (MeJ)

Este elicitor es un compuesto volátil natural derivado del ácido jasmónico con un peso molecular de 224,3 (Figura 1.10). Tiene una actividad similar al mediador químico del que deriva, por lo que es capaz de activar las enzimas responsables de la biosíntesis de polifenoles como la fenilalanina amino liasa en liches (Yang et al., 2011), melocotones (Jin et al., 2009), manzanas, uva de mesa, fresas (Heredia y Cisneros-Zevallos, 2009) con el subsecuente aumento de fenoles totales (Figura 1.11). La activación de otras enzimas de dicha ruta también ha sido confirmada junto con la consecuente acumulación de estilbenos y antocianos (Belhadj et al., 2008).

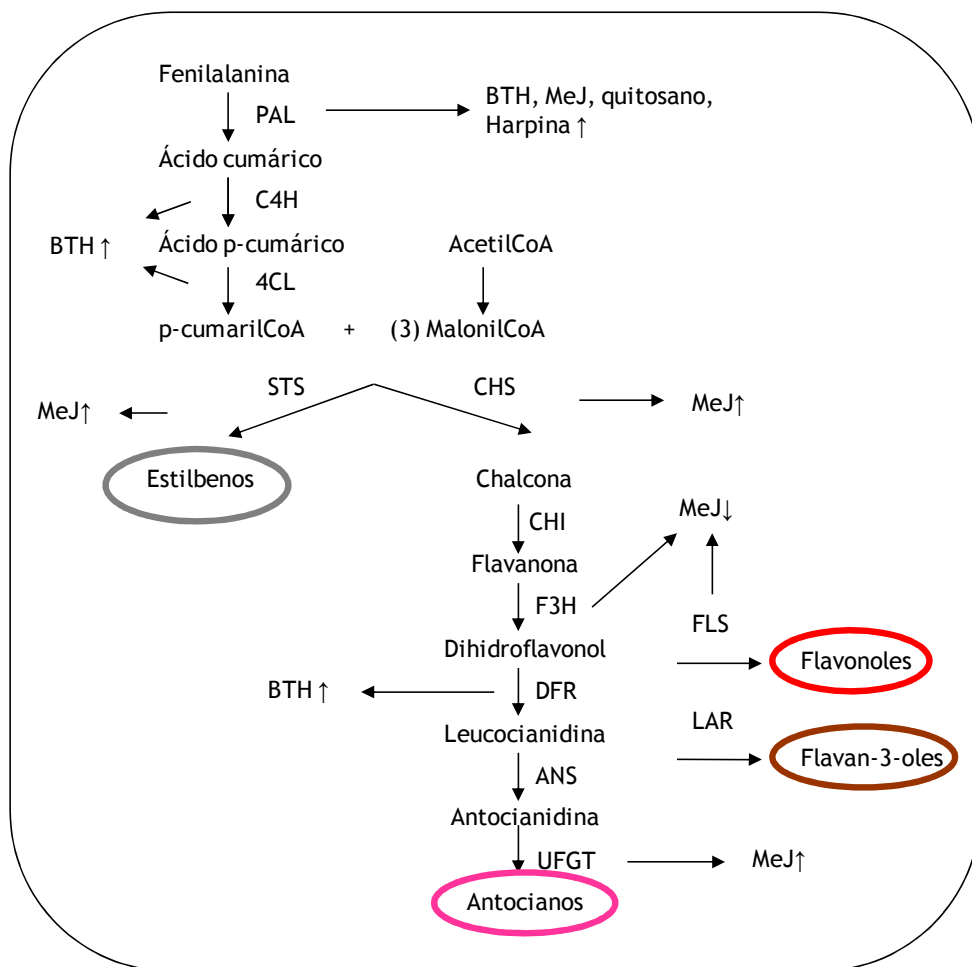
Además, el tratamiento combinado entre MeJ y etefon (liberador de la hormona etileno), estudiado en cultivos celulares de Cabernet Sauvignon, ha mostrado una activación de la fenilalanina amino liasa y la estilbeno sintasa y una acumulación de estilbenos (Faurie et al., 2009). En este último análisis, se ha visto que el etefon inhibe la inducción de proteínas de resistencia por parte del MeJ.

Muchos otros estudios en distintas frutas describen cómo el MeJ afecta a los compuestos polifenólicos y volátiles. Así, el tratamiento post cosecha con MeJ resultó en cantidades más altas de fenoles totales y antocianos en varias frutas como tomates (Tzortzakis y Economakis, 2007), granadas (Sayyari et al., 2011) y fresas (Moreno et al., 2010). Finalmente, tratamientos precosecha con dicha molécula señal han mostrado un aumento en los niveles de flavonoides (Percival y MacKenzie, 2007; Wang et al., 2008) y de resveratrol (Wang et al., 2007; Esna-Ashari y Pour, 2011; Vezzulli et al., 2007) en diversas bayas.

También se han descrito cambios en la producción de compuestos volátiles. En esta línea, se demostró el efecto inhibitorio del MeJ en las enzimas formadoras de esterres volátiles en manzanas (Ollas et al., 1992). Por el contrario, en fresas y mangos se observó un incremento en compuestos volátiles tras el tratamiento con este elicitor (Ayala-Zabala et al., 2005; De la Peña-Moreno et al., 2010; Lalel et al., 2003). En cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. se mostró un aumento en la

concentración de sesquiterpenos en respuesta a jasmonatos (D'Onofrio et al., 2009) y en hojas de uva se activó la biosíntesis de novo de terpenoides (Hampel et al., 2005).

Figura 1.11: Resumen de la síntesis de polifenoles y la activación de ciertos enzimas por la acción de elicitores.



Abreviaturas: PAL, fenilalanina amino liasa; C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4-CL, 4-coumarato/coenzima A ligasa; STS, estilbeno sintasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavonoide hidroxilasa; FLS, flavonol sintasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; ANS, antocianidina sintasa; UFGT, UDPglucosa: flavonoide-O-transferasa; LAR, leucoantocianidina reductasa.

1.7.2.3 Antagonismo y sinergismo entre BTH y MeJ

Como ya se ha comentado al exponer los mecanismos de defensa de las plantas, las respuestas mediadas por ácido salicílico y jasmónico son compartidas en algunos casos. Por tanto, no sería de extrañar que pudiera existir algún tipo de interacción tanto de tipo antagónico como sinérgico entre ellas. Por ello, se ha considerado interesante investigar a cerca de la acción conjunta de los dos elicitores. Diversos estudios indican que hay comunicación entre los dos mecanismos de defensa, la mayoría indican que dicha interferencia es negativa, aunque también se han descrito relaciones sinérgicas.

Por ejemplo, en tomates se han encontrado interacciones negativas sobre todo de la ruta del ácido salicílico sobre la del ácido jasmónico (más que al contrario) y especialmente cuando se aplicaban los dos compuestos simultáneamente y en altas dosis. Al comprobar la resistencia que se confería con dichos tratamientos, se observó que la interacción afectaba reduciendo la resistencia al ataque por el herbívoro *Spodoptera exigua* pero no al patógeno *Pseudomonas syringae* (Thaler et al., 2002). Sin embargo, también en tomates, se ha observado una interacción sinérgica ya que la acción secuencial del ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico era necesaria para inducir una respuesta defensiva de la planta contra *Xanthomonas campestris* (O'Donnell et al., 2003). A pesar de que el mecanismo molecular de la reacción entre el ácido salicílico y el jasmonato se ha estudiado en plantas modelo como *Arabidopsis* (Spoel et al., 2003; Anderson et al., 2004), está clara la necesidad de más estudios para la determinación del tipo de interacciones existentes entre estos dos elicitores.

Como se puede advertir, los ejemplos que se han comentado son a cerca del efecto del tratamiento simultáneo de estos dos elicitores en la resistencia de la planta. Hasta nuestro conocimiento, no se han comunicado resultados a cerca del efecto de dicho tratamiento sobre los compuestos fenólicos y volátiles en la uva y el vino tinto. D'Onofrio et al. (2009) observó en líneas celulares de uva que el ácido salicílico reprimía el aumento de sesquiterpenos y proantocianidinas asociado al tratamiento con MeJ, pero no el de la producción de estilbenos. Por la falta de estudios y dado que los tratamientos con BTH o MeJ tienen efectos positivos en los compuestos fenólicos y volátiles de las uvas, uno de los puntos a abordar en la presente Tesis Doctoral es el efecto del tratamiento simultáneo con estos dos elicitores.

1.7.2.4 Harpina

La harpina es otro ejemplo de elicitor químico utilizado para este fin. Es una proteína termoestable, rica en glicina y de origen bacteriano. Se describió originariamente como producto del patógeno vegetal *Erwinia amylovora* (Wei et al., 1992). Puede actuar como un elicitor debido a que provoca una respuesta de hipersensibilidad en las plantas no hospedadoras (He et al., 1993) y activa el mecanismo mediado por ácido salicílico (Dong et al., 1999) y por etileno (Dong et al., 2004), contribuyendo así a su resistencia.

La harpina se ha utilizado en tratamiento precosecha para controlar enfermedades causadas por patógenos y post cosecha para prevenir el deterioro en diversas frutas (Boro et al., 2011; Saour et al., 2010; Bastas y Maden, 2007; Lucon et al., 2010; de Capdeville et al., 2003). Además se ha descrito como un activador de la enzima fenilalanina amino liasa en tratamientos tanto pre como post cosecha produciendo así un aumento de polifenoles (Wang et al., 2011; Danner et al., 2008; Li et al., 2012) (Figura 1.11).

1.7.2.5 Quitosano

El quitosano es un polisacárido de N-acetil D-glucosamina con unión β -(1-4), derivado de la deacetilación de la quitina de la concha de crustáceos. A pesar de tener propiedades antimicrobianas, puede actuar como elicitor por la inducción de callosa y fenoles en plantas susceptibles (Gozzo, 2003).

Su aplicación en campo controla enfermedades posteriores en fresas (Reddy et al., 2000; Romanazzi et al., 2013) y tratamientos pre y post cosecha activan la fenilalanina amino liasa con el aumento de polifenoles totales (Romanazzi et al., 2002; Meng et al., 2012; Mazarro et al., 2008) (Figura 1.11). Además de esto, los vinos elaborados con uvas tratadas con quitosano mostraron mayor cantidad de polifenoles totales (Iriti et al., 2011) y de los compuestos volátiles tales como acetales y alcoholes totales (Vitalini et al., 2014).

1.7.2.6 Otros elicitores químicos

Hay ejemplos de muchas otras sustancias químicas que se han estudiado como posibles elicitores en diversas frutas. Así, el ácido oxálico y el cloruro de calcio

activaron enzimas de defensa como fenilalanina amonio liasa, β -1,3-glucanasa, peroxidasa y polifenol oxidasa y redujo la incidencia de la enfermedad causada por *Alternaria alternata* en peras (Tian et al., 2006). Otro ejemplo son el fosfito y el acibenzolar-S-metilo que inducen la síntesis de trans-resveratrol en manzanas (Sautter et al., 2008). Finalmente el silicato de potasio aumenta los niveles de catequina y epicatequina en aguacate (Tesfay et al., 2011).

Para contribuir al biocontrol de enfermedades vegetales también se han utilizado diversos extractos naturales. Por ejemplo, se han analizado extractos de diversos microorganismos algunos de los cuales protegían frente a enfermedades, inducían proteínas de resistencia y metabolitos relacionados con la defensa en vid (Harm et al., 2011). También se han usado proteínas de algas como la laminarina que mostró una reducción de la incidencia de infección por *Botrytis cinerea* y *Plasmopara viticola* en vid y elicitación de las respuestas de defensa en sus cultivos celulares (Aziz et al., 2003). Otro ejemplo es el uso del fructooligosacárido de la raíz de *Arcitum lappa* y la oligandrina secretada por *Pythium oligandrum* que inhiben la pobredumbre causada por *B. cinérea* en tomates y activan la fenilalanina amino liasa, activando la biosíntesis de compuestos fenólicos (Wang et al., 2009; Wang et al., 2011). Incluso se ha estudiado el efecto de extractos derivados del orujo que elicitaron una serie de respuestas de resistencia en plantas de tabaco (Goupil et al., 2012).

Un caso un poco especial es el ácido abscísico (ABA) que, a pesar de ser una hormona vegetal, también se ha utilizado como un elicitador químico por sus efectos en la planta. Esta hormona, con importantes funciones dentro de la planta, participa en procesos de desarrollo y crecimiento como la germinación de la semilla, la maduración del embrión, la senescencia de las hojas, la apertura de los estomas, así como en la respuesta adaptativa a estrés tanto de tipo biótico como abiótico.

La aplicación exógena de ABA a uvas de la variedad Cabernet Sauvignon produjo un aumento de antocianos y polifenoles totales (Quiroga et al., 2009) y la activación de los genes que codifican enzimas de la ruta biosintética de los flavonoides (Koyama et al., 2010; Peppi et al., 2008). Sin embargo, un poco después se observó que el ABA tiene un efecto sobre los taninos que depende del momento del desarrollo del fruto, reduciendo su contenido en uvas verdes y aumentándolo durante el envero (Lacampagne et al., 2010). Además, se ha comprobado que el efecto del ABA depende de la variedad de uva ya que no en todas se produce el resultado ya comentado (Sandhu et al., 2011). Por otro lado, también es una cuestión

interesante que el aumento en la proporción de fenoles con alta capacidad antioxidante causado por la aplicación exógena de ABA proteja a las uvas frente al daño producido por la radiación ultravioleta (Berli et al., 2011).

Bibliografía

- Aggarwal, B.B. y Shishodia, S. (2006) Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology* **71**, 1397-1421.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehler, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., Kazan, K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3460-3479.
- Anderson, M.D., Chen, Z.X., Klessig, D.F. (1998) Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochemistry* **47**, 555-566.
- Anttonen, M., Hukkanen, A., Tiilikkala, K., Karjalainen, R. (2003) Benzothiadiazole induces defence responses in berry crops. *Acta Horticulturae* **626**, 177-182.
- Athar, M., Back, J.H., Tang, X., Kim, K.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., Kim, A.L. (2007) Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology* **224**, 274-283.
- Ayala-Zabala, F., Wang, S., Wang, C., y González-Aguilar, G. (2005) Methyl jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, volatile compounds and postharvest life of strawberry fruit. *European Food Research Technology* **221**, 731-738.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bezier, A., Lambert, B., Joubert, J.M., Pugin, A. (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 1118-1128.
- Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F., Casetta, B. (1995) HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis Vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 2104-2109.
- Basile, B., Marsal, J., Mata, M., Vallverdu, X., Bellvert, J., Girona, J. (2011) Phenological sensitivity of Cabernet Sauvignon to water stress: Vine physiology and berry composition. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 452-461.
- Bassa, I.A., Francis, F.J. (1987) Stability of anthocyanins from sweet-potatoes in a model beverage. *Journal of Food Science* **52**, 1753-1754.

- Bastas, K.K. y Maden, S. (2007) Evaluation of host resistance inducers and conventional products for fire blight management in loquat and quince. *Phytoprotection* **88**, 93-101.
- Bayonove, C., Baumes, R., Cruzet, J., Gunata, Z. (2000) Capítulo 5: Aromas. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV, Madrid.
- Becatti, E., Chkaiban, L., Tonutti, P., Forcato, C., Bonghi, C., y Ranieri, A. M. (2010) Short-term postharvest carbon dioxide treatments induce selective molecular and metabolic changes in grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 8012-8020.
- Beckers, G., Spoel, S. (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* **8**, 1-10.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., Merillon, J.M. (2008) Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 493-499.
- Berli, F., Moreno, D., Piccoli, P., Hesphanol-Viana, L., Silva, M., Bressan-Smith, R., Cavagnaro, J., Bottini, R. (2010) Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell and Environment* **33**, 1-10.
- Boro, M.C., Beriam, L.O.S., Guzzo, S.D. (2011) Induced resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* in passion fruit plants. *Tropical Plant Pathology* **36**, 74-80.
- Boulton, R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 67-87.
- Brossaud, F., Cheynier, V., Noble, A.C. (2001) Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **7**, 33-39.
- Bureau, S.M., Baumes, R.L., Razungles, A.J. (2000a) Effects of vine or bunch shading on the glycosylated flavor precursors in grapes of *Vitis vinifera* L. Cv. Syrah. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 1290-1297.
- Bureau, S.M., Razungles, A.J., Baumes, R.L. (2000b) The aroma of Muscat of Frontignan grapes: effect of the light environment of vine or bunch on

- volatiles and glycoconjugates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 2012-2020.
- Burin, V., Freitas Costa, L., Rosier, J. P., Bordignon-Luiz, M. T. (2011) Cabernet Sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *Food Science and Technology* **44**, 1931-1938.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A. (2002) Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 3337-3340.
- Cadwallader, K.R., López, J.R., Menke, S.D., Surakarnkul, R. (2004) Capítulo 27: Aroma components of wines from Chardonnay: A French-American hybrid grape. En: ACS Symposium Series. American Chemical Society, Nueva York, 365-378.
- Cantos, E., Espín, J.C., Fernández, M.J., Oliva, J., Tomás-Barberán, A. (2003) Postharvest UV-C-Irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1208-1214.
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., Lu, B. (2010) Effect of BTH on Anthocyanin Content and Activities of Related Enzymes in Strawberry after Harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 5801-5805.
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., Yang, Z., y Lu, B. (2011) Effect of BTH on antioxidant enzymes, radical-scavenging activity and decay in strawberry fruit. *Food Chemistry* **125**, 145-149.
- Chen, M., Chory, J., Fankhauser, C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics* **38**, 87-117.
- Chen, Z.X., Silva, H., Klessig, D.F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired-resistance by salicylic acid. *Science* **262**, 1883-1886.
- Cheyrier, V., Remy, S., Fulcrand, H (2000) Mechanisms of anthocyanin and tannin changes during winemaking and aging. En: The ASEV 50th Anniversary Annual Meeting, Rautz, J., ASEV, Davis, 337-344.
- Condelli, N., Dinnella, C., Cerone, A., Monteleone, E., Bertuccioli, M. (2006) Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference* **17**, 96-107.
- Cordonnier, R. y Bayonove, C. (1981) Etude de la phase préfermentaire de la vinification. Extraction et formation des certains composés de l'arôme: cas

- des terpénoles, des aldehydes et des alcools en C6. *Connaissance Vigne Vin* **15**, 269-286.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **26**, 1001-1043.
- Czochanska, Z., Foo, L.Y., Newman, R.H., Porter, J.L. (1980) Polymeric proanthocyanidins. Stereochemistry, structural units and molecular weight. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions* **1**, 2278-2286.
- Danner, M.A., Sasso, S.A.Z., Medeiros, J.G.S., Marchese, J.A., Mazaro, S.M. (2008) Induction of resistance to brown-rot on peaches by elicitors use in post-harvest. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **43**, 793-799.
- Darias-Martín, J. (2001) Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry* **73**, 217-220.
- De Capdeville, G., Beer, S.V., Watkins, C.B., Wilson, C.L., Tedeschi, L.O., Aist, J.R. (2003) Pre- and post-harvest harpin treatments of apples induce resistance to blue mold. *Plant Disease* **87**, 39-44.
- De la Peña-Moreno, F., Blanch, G., Flores, G., y Ruiz del Castillo, M. L. (2010) Impact of postharvest methyl jasmonate treatment on the volatile composition and flavonol content of strawberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 989-994.
- De Lerma, N.L., Moreno, J., Peinado, R.A. (2014) Determination of the Optimum Sun-Drying Time for *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo Grapes by E-nose Analysis and Characterization of Their Volatile Composition. *Food and Bioprocess Technology* **7**, 732-740.
- Demiglio, P., Pickering, G.J. (2008) The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *Journal of Food Agriculture & Environment* **6**, 143-150.
- Di Profio, F., Reynolds, A.G., Kasimos, A. (2011) Canopy Management and Enzyme Impacts on Merlot, Cabernet franc, and Cabernet Sauvignon. II. Wine Composition and Quality. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 152-168.
- Dicke, M., Bruin, J. (2001) Chemical information transfer between plants: back to the future. *Biochemical Systematics and Ecology* **29**, 981-994.
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L. (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* **214**, 895-901.

- Dinnella, C., Recchia, A., Fia, G., Bertuccioli, M., Monteleone, E. (2009) Saliva characteristics and individual sensitivity to phenolic astringent stimuli. *Chemical Senses* **34**, 295-304.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B. (1999) Scientific concepts of functional foods in Europe consensus document. *British Journal of Nutrition* **81**, S1-S27.
- Dong, H.P., Peng, J.L., Bao, Z.L., Meng, X.D., Bonasera, J.M., Chen, G.Y., Beer, S.V., Dong, H.S. (2004) Downstream divergence of the ethylene signaling pathway for harpin-stimulated Arabidopsis growth and insect defense. *Plant Physiology* **136**, 3628-3638.
- Dong, H.S., Delaney, T.P., Bauer, D.W., Beer, S.V. (1999) Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant Journal* **20**, 207-215.
- D'Onofrio, C., Cox, A., Davies, C., Boss, P.K. (2009) Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates. *Functional Plant Biology* **36**, 323-338.
- Douillet-Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M., Bessis, N. (1999) Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4456-4461.
- Downey, M.O., Dokoozlian, N.K., Krstic, M.P. (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**, 257-268.
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., Keller, A., Ulrich, D., Kroh, L.W., Rohn, S. (2011) UV-B-induced changes of volatile metabolites and phenolic compounds in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry* **126**, 60-64.
- Esna-Ashari, M., Pour, A.M. (2011) Effect of methyl jasmonate on resveratrol production in organs and cell suspension cultures of two Iranian grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **86**, 557-562.
- Fan, E.G., Zhang, L.J., Jiang, S., Bai, Y.H. (2008) Beneficial effects of Resveratrol on Atherosclerosis. *Journal of Medicinal Food* **11**, 610-614.
- Fanzone, M., Zamora, F., Jofre, V., Assof, M., y Peña-Niera, A. (2011) Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from Valle de Uco (Mendoza,

- Argentina) during ripening. Effect of cluster thinning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 6120-6136.
- Fauconneau, B., WaffoTeguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., Merillon, J.M. (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sciences* **61**, 2103-2110.
- Faurie, B., Cluzet, S., Corio-Costet, M.F., Merillon, J.M. (2009) Methyl jasmonate/ethephon cotreatment synergistically induces stilbene production in *Vitis vinifera* cell suspensions but fails to trigger resistance to *Erysiphe necator*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **43**, 99-110.
- Ferrandino, A. y Guidoni, S. (2010) Anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamates: an attempt to use them to discriminate *Vitis vinifera* L. cv 'Barbera' clones. *Food Science and Technology* **44**, 1931-1938.
- Filella, I., Peñuelas, J., Llusia, J. (2006) Dynamics of the enhanced emissions of monoterpenes and methyl salicylate, and decreased uptake of formaldehyde, by *Quercus ilex* leaves after application of jasmonic acid. *New Phytologist* **169**, 135-144.
- Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. (1997) New anthocyanin pigments formed after condensation with flavonols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **45**, 2262-2266.
- Fulcrand, H., Cameira dos Santos, P., Sarni Manchado, P., Cheynier, V., Favre Bonvin, J. (1996) Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal Chemical Society PT.1* **7**, 735-739.
- Fumagalli, F., Rossoni, M., Iriti, M., di Gennaro, A., Faoro, F., Borroni, E., Borgo, M., Scienza, A., Sala, A., Folco, G. (2006) From field to health: a simple way to increase the nutraceutical content of grape as shown by NO-dependent vascular relaxation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 5344-5349.
- Gawel, R. (1998) Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4**, 74-95.
- Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance Vigne Vin* **18**, 253-271.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., Carreño-Espín, J., Fernández-López, J.A., Martínez-Cutillas, A. (1999) Investigation on the aroma of wines from seven clones of Monastrell grapes. *European Food and Research Technology* **209**, 257-260.

- Gómez-Plaza, E., Gil-Munoz, R., Hernández-Jiménez, A., Lopez-Roca, J.M., Ortega-Regules, A., Martínez-Cutillas, A. (2008) Studies on the anthocyanin profile of *Vitis vinifera* intraspecific hybrids (Monastrell x Cabernet Sauvignon). *European Food Research and Technology* **227**, 479-484.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., Martínez-Cutillas, A. (2000) Multivariate classification of wines from seven clones of Monastrell grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 497-501.
- González-Aguilar, G.A., Zavaleta-Gatica, R., Tiznado-Hernández, M.E. (2007) Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharvest Biology and Technology* **45**, 108-116.
- González-Neves, G., Gil, G., Ferrer, M. (2002) Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Science and Technology International* **8**, 315-321.
- Goupil, P., Benouaret, R., Charrier, O., Halle, A., Richard, C., Eyheraguibel, B., Thiery, D., Ledoigt, G. (2012) Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology* **21**, 1541-1549.
- Gozzo, F. (2003) Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4487-4503.
- Halsam, E., Lilley, T.H. (1988) Natural astringency in foodstuffs-a molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **27**, 1-40.
- Hammerschmidt, R. (1999) Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 77-84.
- Hampel, D., Mosandl, A., Wust, M. (2005) Induction of de novo volatile terpene biosynthesis via cytosolic and plastidial pathways by methyl jasmonate in foliage of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 2652-2657.
- Harborne, J. B. y Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Harborne, J.B. (1980) Plant phenolics. En: *The Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 8, Secondary Plant Products, Bell EA and Charlwood BV. Springer, Berlin, 329-402.
- Harborne, J.B. (1999) The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**, 335-367.

- Harborne, J.B. (2001) Secondary metabolites attracting pollinators. John Wiley and Sons Ltd, Chichester.
- Harm, A., Kassemeyer, H.H., Seibicke, T., Regner, F. (2011) Evaluation of chemical and natural resistance inducers against downy mildew (*Plasmopara viticola*) in grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 184-192.
- He, S.Y., Huang, H.C., Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* Pv Syringae Harpin (Pss) - A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**, 1255-1266.
- Heredia, J. B. y Cisneros-Zevallos, L. (2009) The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce. *Food Chemistry* **115**, 1500-1508.
- Hernández-Jiménez, A.; Gómez-Plaza, E.; Martínez-Cutillas, A.; Kennedy, J. Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell x Syrah Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 10798-10803.
- Holopainen, J.K. (2004) Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science* **9**, 529-533.
- Iqbal, Z., Singh, Z., Khangura, R., Ahmad, S. (2012) Management of citrus blue and green moulds through application of organic elicitors. *Australasian Plant Pathology* **41**, 69-77.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Faoro, F. (2004) Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4406-4413.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Ferrara, L., Faoro, F. (2005) Induction of resistance to gray mold with benzothiadiazole modifies amino acid profile and increases proanthocyanidins in grape: primary versus secondary metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 9133-9139.
- Iriti, M., Vitalini, S., Di Tomasso, G., D'Amico, S., Borgo, M., Faoro, F. (2011) New chitosan formulation prevents grapevine powdery mildew infection and improves polyphenol content and free radical scavenging activity of grape and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **17**, 263-269.
- Jeandet, P., Bessis, R., Gautheron, B. (1991) The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture* **42**, 41-46.

- Jeandet, P., Douillt-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M. (2002) Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2731-2741.
- Jin, P., Zheng, Y. H., Tang, S. S., Rui, H. J., y Wang, C. Y. (2009) Enhancing disease resistance in peach fruit with methyl jasmonate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **89**, 802-808.
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., El-Zajouli, A., Kefalas, P. (2001) The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry* **75**, 355-363.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M.N. (1997) Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. *J.Food.Sci.* **62**, 416-420.
- Kataoka, I., Beppu, K., Yanagi, T., Okamoto, K. (2004) Light components contributing to accumulation of anthocyanins in Cros Colman grape berries. *Acta Horticulturae* **640**, 333-339.
- Kawano, T. y Muto, S. (2000) Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *Journal of Experimental Botany* **51**, 685-693.
- Kessler, A., Baldwin, I.T. (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141-2144.
- Kondo, S., Setha, A., Rudell, D., Buchanan, D., y Mattheis, J. (2005) Aroma volatile biosynthesis in apple affected by 1-MCP and methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology* **36**, 61-68.
- Koundouras, S., Hatzidimitriou, E., Karamolegkou, M., Dimopoulou, E., Kallithraka, S., Tsialtas, J., Zioziou, E., Nikolaou, N., y Kotseridis, Y. (2009) Irrigation and rootstock effects on the phenolic concentration and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 7805-7813.
- Koyama, K., Sadamatsu, K., Goto-Yamamoto, N. (2010) Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Functional and Integrative Genomics* **10**, 381.
- Lacampagne, S., Gagne, S., Geny, L. (2010) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: New elements regarding the regulation of tannin composition and

- leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**, 81-90.
- Lalel, H., Singh, Z., y Tan, S. (2003) The role of methyl jasmonate in mango ripening and biosynthesis of aroma volatile compounds. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**, 470-484.
- Ledderhof, D., Reynolds, A.G., Manin, L., Brown, R. (2014) Influence of water status on sensory profiles of Ontario Pinot noir wines. *LWT - Food Science and Technology* **57**, 65-82.
- Leifert, W.R., Abeywardena, M.Y. (2008) Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* **28**, 729-737.
- Li, H., Flachowsky, H., Fischer, T., Hanke, M.V., Forkmann, G., Treutter, D., Schwab, W., Hoffmann, T., Szankowski, I. (2007) Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Planta* **226**, 1243-1254.
- Li, M., Yu, M.L., Zhang, Z.Q., Liu, Z.G., Pan, Y. (2012) Control of black spot disease caused by *Alternaria alternata* on jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. cv. Dongzao) using Harpin(Xoo) protein. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **87**, 250-254.
- Liao, H., Cai, Y., Haslam, E. (1992) Polyphenol interactions anthocyanins, copigmentation and color changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **59**, 299-305.
- Liu, H.X., Jiang, W.B., Bi, Y., Luo, Y.B. (2005) Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology* **35**, 263-269.
- Lucon, C.M.M., Guzzo, S.D., de Jesus, C.O., Pascholati, S.F., de Goes, A. (2010) Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. *Crop Protection* **29**, 766-772.
- Marín-Loaiza, J. C. y Céspedes, C. L. (2007) Compuestos volátiles de la planta, origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana* **30**, 327-351.
- Martens, S., Knott, J., Seitz, C.A., Janvari, L., Yu, S.N., Forkmann, G. (2003) Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. *Biochemical Engineering Journal* **14**, 227-235.

- Mateus, N., de Freitas, V.A.P. (2001) Evolution and stability of anthocyanin derived pigments during port wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5217-5222.
- Mateus, N., De Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C., De Freitas, V. (2002) Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chemistry* **76**, 335-342.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., Gunata, Z. (2005) A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2721-2731.
- Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer, S. (1995) Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1820-1823.
- Mazaro, S.M., Deschamps, C., de Mio, L.L., Biasi, L.A., de Gouvea, A., Sautter, C.K. (2008) Post harvest behavior of strawberry fruits after pre harvest treatment with chitosan and acibenzolar-S-methyl. *Revista Brasileira de Fruticultura* **30**, 185-190.
- Mazza, G., Brouillard, R. (1987) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry* **25**, 207-225.
- Meng, X.C., Tang, Y.X., Zhang, A.Y., Huang, X.M., Zhang, Z.Q. (2012) Effect of oligochitosan on development of *Colletotrichum musae* in vitro and in situ and its role in protection of banana fruits. *Fruits* **67**, 147-155.
- Merkle, T., Frohn Meyer, H., Schulze-Lefert, P., Dangl, J.L., Hahlbrock, K., Schafer, E. (1994) Analysis of the parsley chalcone-synthase promoter in response to different light qualities. *Planta* **193**, 275-282.
- Mezzetti, B., Pandolfini, T., Navacchi, O., Landi, L. (2002) Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnology* **2**, 18.
- Moreno, F.P., Blanch, G.P., Flores, G., del Castillo, M.L.R. (2010) Impact of postharvest methyl jasmonate treatment on the volatile composition and flavonol content of strawberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 989-994.
- Noble, A.C. (1994) Bitterness in Wine. *Physiology & Behavior* **56**, 1251-1255.
- Obradovic, A., Jones, J. B., Momol, M. T., Balogh, B., y Olson, S. M. (2004) Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Disease* **88**, 736-740.

- Obreque-Slier, E., Lopez-Solis, R., Peña-Neira, A., Zamora-Marín, F. (2010) Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation: experience with two oenological tannins and a gelatin. *International Journal of Food Science & Technology* **45**, 2629-2636.
- O'Donell, P., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J., Klee, H. (2003) Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology* **133**, 1181-1189.
- Oliva, J., Zalacain, A., Paya, P., Salinas, M.R., Barba, A. (2008) Effect of the use of recent commercial fungicides [under good and critical agricultural practices] on the aroma composition of Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta* **617**, 107-118.
- Oliveira, C., Ferreira, A.C., Costa, P., Guerra, J., De Pinho, P.G. (2004) Effect of some viticultural parameters on the grape carotenoid profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4178-4184.
- Oliveira, J., Fernandes, V., Miranda, C., Santos-Buelga, C., Silva, A., De Freitas, V., Mateus, N. (2006) Color properties of four cyanidin-pyruvic acid adducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 6894-6903.
- Ollas, J., Sanz, L., Rios, J., y Pérez, A. (1992) Inhibitory effect of methyl jasmonate on the volatile ester-forming enzyme system in Golden Delicious apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 266-270.
- Ortega-Heras, M., González-Sanjose, M.L., González-Huerta, C. (2007) Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chemistry* **103**, 1434-1448.
- Pan, Y. y Liu, X. (2011) Effect of benzo-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) treatment on the resistant substance in postharvest mango fruits of different varieties. *African Journal of Biotechnology* **10**, 15521-15528.
- Parr, A. y Bolwell, G. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 985-1012.
- Passos, C.P., Cardoso, S.M., Domingues, M.R., Domingues, P., Silva, C.M., Coimbra, M.A. (2007) Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. *Food Chemistry* **105**, 1457-1467.
- Peñuelas, J. y Llusia, J. (2001) The complexity of factors driving volatile organic compound emissions by plants. *Biologia Plantarum* **44**, 481-487.

- Penumathsa, S.V. y Maulik N (2009) Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **87**, 275-286.
- Peppi, M.C., Walker, M.A., Fidelibus, M.W. (2008) Application of abscisic acid rapidly upregulated UFGT gene expression and improved color of grape berries. *Vitis* **47**, 11-14.
- Percival, D., MacKenzie, J.L. (2007) Use of plant growth regulators to increase polyphenolic compounds in the wild blueberry. *Canadian Journal of Plant Science* **87**, 333-336.
- Pérez-Lamela, C., García-Falcon, M.S., Simal-Gándara, J., Orriols-Fernández, I. (2007) Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry* **101**, 601-606.
- Pérez-Prieto, L.J., De la Hera Orts, M.L., López-Roca, J.M., Fernández-Fernández, J.I., Gómez-Plaza, E. (2003) Oak matured wines. Influence of the characteristics of the barrell on wine colour and sensory characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1445-1450.
- Perl, A. y Eshdat, Y. (1998) DNA Transfer and gene expression in transgenic grapes. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **15**, 365-386.
- Pezzuto, J.M. (2007) Grapes and human health: a perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 6777-6784.
- Pieterse, C.M.J. y Van Loon, L.C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **4**, 52-58.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. (1994) Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **36**, 781-784.
- Provinciali, M.; Re, F.; Donnini, A.; Orlando, F.; Bartozzi, B.; Di Stasio, G.; Smorlesi, A. (2005) Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *International Journal of Cancer* **115**, 36-45.
- Punja, Z.K. (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens-a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Physiology* **23**, 216-235.
- Quiroga, A.M., Berli, F.J., Moreno, D., Cavagnaro, J.B., Bottini, R. (2009) Abscisic acid sprays significantly increase yield per plant in vineyard-grown wine grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon through increased berry set

- with no negative effects on anthocyanin content and total polyphenol index of both juice and wine. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 28-35.
- Reddy, G.V.P., Guerrero, A. (2004) Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science* **9**, 253-261.
- Reddy, M.V.B., Belkacemi, K., Corcuff, R., Castaigne, F., Arul, J. (2000) Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* **20**, 39-51.
- Renaud, S., Delorgeril, M. (1992) Wine, Alcohol, Platelets, and the French Paradox for Coronary Heart-Disease. *Lancet* **339**, 1523-1526.
- Revilla, E., Garcia-Beneytez, E., Cabello, F. (2009) Anthocyanin fingerprint of clones of Tempranillo grapes and wines made with them. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **15**, 70-78.
- Ribéreau-Gayon, P. (1964) Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides. *Annales de Physiologie Végétale* **6**, 211-242.
- Ricardo da Silva, J.M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., Moutounet, M. (1991) Procyanidin dimers and trimers from grapes seeds. *Phytochemistry* **30**, 1259-1264.
- Rodríguez-Rodríguez, P. y Gómez-Plaza, E. (2011) Effect of Volume and Toast Level of French Oak Barrels (*Quercus petraea* L.) on Cabernet Sauvignon Wine Characteristics. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 359-365.
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., Landi, L. (2013) Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology* **75**, 24-27.
- Romanazzi, G., Nigro, E., Ippolito, A., Di Venere, D., Salerno, M. (2002) Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* **67**, 1862-1867.
- Romero, C. y Bakker, J. (2001) Anthocyanin and colour evolution during maturation of four port wines: effect of pyruvic acid addition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 252-260.
- Romero-Pérez, A.I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R.M., de La Torre-Boronat, M.C. (1999) Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1533-1536.

- Ruiz-García, Y. y Gómez-Plaza, E. (2013) Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture* **3**, 33-52.
- Sandhu, A., Gray, D., Lu, J., Gu, L. (2011) Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* L.) skins. *Food Chemistry* **128**, 982-988.
- Saour, G., Ismail, H., Hashem, A. (2010) Impact of kaolin particle film, spiroadiclofen acaricide, harpin protein, and an organic biostimulant on pear psylla *Cacopsylla pyri* (Hemiptera: Psyllidae). *International Journal of Pest Management* **56**, 75-79.
- Sarni Manchado, P., Deleris, A., Avallone, S., Cheynier, V., Moutounet, M. (1999) Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by protein used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 81-86.
- Sautter, C.K., Storck, L., Rizzatti, M.R., Mallmann, C.A., Brackmann, A. (2008) Synthesis of trans-resveratrol and rotting control in apples with use of elicitors in post-harvest. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **43**, 1097-1103.
- Sayyari, M., Babalar, M., Kalantari, S., Martinez-Romero, D., Guillen, F., Serrano, M., y Valero, D. (2011) Vapour treatments with methyl salicylate or methyl jasmonate alleviated chilling injury and enhanced antioxidant potential during postharvest storage of pomegranates. *Food Chemistry* **124**, 964-970.
- Schijlen, E., de Vos, C.H.R., Jonker, H., van den Broeck, H., Molthoff, J., van Tunen, A., Martens, S., Bovy, A. (2006) Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. *Plant Biotechnology Journal* **4**, 433-444.
- Schwarz, M., Quast, P., von Baer, D., Winterhalter, P. (2003) Vitisin A content in Chilean wines from *Vitis vinifera* Cv. Cabernet Sauvignon and contribution to the color of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6261-6267.
- Singh, S.K., Singh, S.K., Sharma, R.R. (2010) Effects of pruning intensity on the biochemical status of shoot buds in three mango (*Mangifera indica* L.) cultivars planted at high density. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* **85**, 483-490.
- Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants[mdash]an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585-591.

- Soufleros, E. H., Stavridou, K., Dagkli, V. (2011) The effect of cluster thinning on phenolic maturity of *Vitis vinifera* cv. Xnomavro grapes. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **45**, 171-179.
- Souquet, J., Cheynier, V., Broussaud, F., Moutounet, M. (1996) Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **43**, 509-512.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X.N., Pieterse, C.M.J. (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**, 760-770.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Metraux, J.P. (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **35**, 235-270.
- Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F. (2011) Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38**, 1145-1159.
- Sun, Q., Sacks, G., Lerch, S., Heuvel, J.E.V. (2011) Impact of Shoot Thinning and Harvest Date on Yield Components, Fruit Composition, and Wine Quality of Marechal Foch. *American Journal of Enology and Viticulture* **62**, 32-41.
- Tassoni, A., Durante, L., Ferri, M. (2012) Combined elicitation of methyl-jasmonate and red light on stilbene and anthocyanin biosynthesis. *Journal of Plant Physiology* **169**, 775-781.
- Tesfay, S.Z., Bertling, I., Bower, J.P. (2011) Effects of postharvest potassium silicate application on phenolics and other anti-oxidant systems aligned to avocado fruit quality. *Postharvest Biology and Technology* **60**, 92-99.
- Thaler, J., Findantsef, A., Bostock, R. (2002) Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 1131-1159.
- Thaler, J., Karban, R., Ullman, D., Boege, K., Bostock, R. (2002) Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defence pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* **131**, 227-235.
- Tian, S.P., Wan, Y.K., Qin, G.Z., Xu, Y. (2006) Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbiology and Biotechnology* **70**, 729-734.

- Tzortzakis, N. G. y Economakis, C. D. (2007) Maintaining postharvest quality of the tomato fruit by employing methyl jasmonate and ethanol vapor treatment. *Journal of Food Quality* **30**, 567-580.
- Tzortzakis, N., Taybi, T., Roberts, R., Singleton, I., Borland, A., Barnes, J. (2011) Low-level atmospheric ozone exposure induces protection against *Botrytis cinerea* with down-regulation of ethylene-, jasmonate- and pathogenesis-related genes in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* **61**, 152-159.
- Vezzulli, S., Civardi, S., Ferrari, F., Bavaresco, L. (2007) Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture* **58**, 530-533.
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.M., Fulcrand, H., Cheynier, V. (2002) Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2261-2266.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E.J. (2003) The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 564-573.
- Vitalini, S., Ruggiero, A., Rapparini, F., Neri, L., Tonni, M., Iriti, M. (2014) The application of chitosan and benzothiadiazole in vineyard (*Vitis vinifera* L. cv Gropello Gentile) changes the aromatic profile and sensory attributes of wine. *Food Chemistry* **162**, 192-205.
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.C., Merillon, J.M., Teissedre, P.L. (2005) Determination of stilbenes (delta-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 5664-5669.
- Wang, A.Y., Lou, B.G., Xu, T., Lin, C. (2011) Defense responses in tomato fruit induced by oligandrin against *Botrytis cinerea*. *African Journal of Biotechnology* **10**, 4596-4601.
- Wang, F., Feng, G., Chen, K. (2009) Defense responses of harvested tomato fruit to burdock fructooligosaccharide, a novel potential elicitor. *Postharvest Biology and Technology* **52**, 110-116.
- Wang, J.J., Bi, Y., Zhang, Z.K., Zhang, H.Y., Ge, Y.H. (2011) Reduction of latent infection and enhancement of disease resistance in muskmelon by preharvest

- application of harpin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 12527-12533.
- Wang, S.Y., Bowman, L., Ding, M. (2008) Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry* **107**, 1261-1269.
- Wang, S.Y., Chen, C.T., Wang, C.Y., Chen, P. (2007) Resveratrol Content in Strawberry Fruit Is Affected by Preharvest Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 8269-8274.
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.R., Wen, P.F., Zhang, P., Wang, H.L., Huang, W.D. (2010) Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 142-152.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., Beer, S.V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia-Amylovora*. *Science* **257**, 85-88.
- Xu, Y., Chang, P.F.L., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1994) Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077-1085.
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition* **21**, 381-406.
- Yang, S. Y., Chen, Y. L., Feng, L. Y., Yang, E., Su, X. G., y Jiang, Y. M. (2011) Effect of Methyl jasmonate on pericarp browning of portharvest lychees. *Journal of Food Processing and Preservation* **35**, 417-422.
- Zamora, F. (2003) Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMV, Madrid.
- Zamuz, S., Blanco, M., Masa, A., y Vilanova, M. (2009) Efecto de clima sobre la componente varietal del cultivar Albariño en la Denominación de Origen Rías Baixas. *Nuevos Horizontes enla Viticultura y Enología VI-6*, 23-26.
- Zhu, X., Cao, J., Wang, Q., Jiang, W. (2008) Postharvest infiltration of BTH reduces infection of mango fruits (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances resistance inducing compounds. *Journal of Phytopathology* **156**, 68-74.
- Zoecklein, B.W., Wolf, T.K., Duncan, S.E., Marcy, J.E., Jasinski, Y. (1998) Effect of fruit zone leaf removal on total glycoconjugates and conjugate fraction

concentration of Riesling and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.) grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **49**, 259-265.

2

Objetivos



La Región de Murcia es una zona histórica en el cultivo de vid. La principal variedad de uva cultivada en esta región, principalmente por su adaptación a nuestras condiciones climatológicas particulares es Monastrell, una variedad tinta, de grano mediano, resistente a la sequía y robusta. Esta variedad es nuestra seña de identidad y por ello es de gran importancia todos los estudios y trabajos que puedan conducir a su mejora. Esta variedad aporta un carácter distintivo a los vinos de la zona y se debe luchar para que dicha variedad no sea desplazada por otras variedades foráneas.

Varias estrategias se han estado utilizando en los últimos años para mejorar las características de esta variedad. Hace ya unos años se realizó una selección clonal y sanitaria de la variedad Monastrell, para obtener una colección de clones con distintas características, entre ellas, características que se adapten a las demandas cambiantes del mercado del vino. Otra de las herramientas de mejora de la variedad que se están llevando a cabo es la producción de plantas híbridas entre la variedad Monastrell y otras variedades que le puedan aportar características mejorantes, por ejemplo, mayor contenido fenólico, mayor acidez, mayor resistencia a enfermedades, pero siempre manteniendo los caracteres valorados enológico de la variedad autóctona. Finalmente, otra herramienta que podría resultar útil es el uso de elicitores para desencadenar en la planta la producción de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y aromáticos que aumenten la resistencia de la planta al ataque de patógenos y a situaciones de estrés y paralelamente, la calidad tanto de la uva como del vino producido.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es, precisamente, determinar el efecto de la aplicación de elicitores en el momento del envero en uvas de la variedad Monastrell sobre los niveles de ciertos compuestos de interés enológico como son los compuestos fenólicos y aromáticos en uvas y si este incremento, si existe, permite mejorar la calidad de los vinos obtenidos.

Con este fin, se han propuesto los siguientes objetivos parciales:

- Examinar, durante un periodo de dos años consecutivos, si el tratamiento de las uvas con BTH y MeJ, en el momento del envero, afecta a la acumulación de los principales flavonoides (antocianos,

flavonoles y flavanoles) en uvas de la variedad Monastrell y sus vinos resultantes.

- Establecer si el efecto sobre los compuestos fenólicos del tratamiento precosecha con BTH y MeJ en uvas Monastrell es dependiente del clon utilizado.
- Determinar si el tratamiento con BTH y MeJ afecta al contenido de compuestos volátiles de uvas Monastrell y sus vinos resultantes.
- Estudiar si la aplicación precosecha de ácido abscísico en las uvas tiene también un papel de elicitación de compuestos fenólicos.
- Averiguar si el tratamiento combinado de BTH y MeJ de las uvas tiene algún efecto significativo sobre los compuestos fenólicos y volátiles de los vinos y comprobar si dicho efecto es positivo o negativo.

3

Resultados y Discusión

- 3.1 Improving Grape Phenolic Content and Wine chromatic Characteristics through the Use of Two Different Elicitors: Methyl Jasmonate versus Benzothiadiazole
- 3.2 Increasing Bioactive Phenolic Compounds in Grapes: Response of Six Monastrell Grape Clones to Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate Treatments
- 3.3 Effect of Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate on the Volatile Compound Composition of *Vitis vinifera* L. Monastrell Grapes and Wines
- 3.4 Increasing the Phenolic Compound Content of Grapes by Preharvest Application of Abscisic Acid and a Combination of Methyl Jasmonate and Benzothiadiazole
- 3.5 Effect of Combined Use of Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate on Volatile Compounds of Monastrell Wine



3.1

Incremento del contenido fenólico y de las características cromáticas de los vinos por medio del uso de dos diferentes elicitores: Metil jasmonato y Benzotiadiazol.

Improving Grape Phenolic Content and Wine Chromatic Characteristics through the Use of Two Different Elicitors: Methyl Jasmonate versus Benzothiadiazole

Yolanda Ruiz-García, Inmaculada Romero-Cascales, Rocio Gil-Muñoz, Jose Ignacio Fernández-Fernández, Jose María López-Roca, and Encarna Gómez-Plaza

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60, 1283–1290

ABSTRACT: Benzothiadiazole (BTH) and methyl jasmonate (MeJ) have been described as exogenous elicitors of some plant defense compounds, polyphenols among them. The objective of this study was to determine whether the application of BTH or MeJ to grape clusters at the beginning of the ripening process had any effect on the accumulation of the main flavonoid compounds in grapes (anthocyanins, flavonols, and flavanols) and the technological significance of these treatments in the resulting wines. The results obtained after a 2 year experiment indicated that both treatments increased the anthocyanin, flavonol, and proanthocyanidin content of grapes. The wines obtained from the treated grapes showed higher color intensity and total phenolic content than the wines made from control grapes. The exogenous application of these elicitors, as a complement to fungicide treatments, could be an interesting strategy for vine protection, increasing, at the same time, the phenolic content of the grapes and the resulting wines.

URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf204028d>

3.2

Incremento de contenido de compuestos bioactivos en las uvas: Respuesta de seis clones de Monastrell a los tratamientos de Benzotiadiazol y Metil jasmonato.

Increasing Bioactive Phenolic Compounds in Grapes: Response of Six Monastrell Grape Clones to Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate Treatments

Yolanda Ruiz-García, Inmaculada Romero-Cascales, Ana Belén Bautista-Ortín, Rocío Gil-Muñoz, Adrián Martínez-Cutillas, and Encarna Gómez-Plaza

American Journal of Enology and Viticulture, 2013, 64, 459–465

ABSTRACT: The application of different elicitors to plants has proved a useful technique for the improvement of their phenolic content. However, studies have shown that the exact response of plants to elicitors depends both on variety and clone. In the present study, two elicitors (benzothiadiazole and methyl jasmonate) were applied in a vineyard where a collection of the six selected clones of Monastrell grape variety were planted to determine whether any observed effect was clone-dependent. The analysis of anthocyanins, flavonols, stilbenes, and seed and skin tannins showed that, in general, both elicitors increased the levels of phenolic compounds in the treated plants, although the extent of the response differed among different clones from the same variety. The positive effect of both benzothiadiazole and methyl jasmonate indicated that such treatments could be regarded as useful for improving grape and wine color while also increasing resistance to some pathogens. However, a preliminary and exploratory field study should be carried out since differences in the response of the grapes to treatment might occur, depending on the clone.

URL: <http://www.ajevonline.org/content/64/4/459.abstract>

3.3

Efecto del Benzotiadiazol y el Metil jasmonato en los componentes volátiles de uvas y vinos de *Vitis vinifera* L. variedad Monastrell

Effect of Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate on the Volatile Compound Composition of *Vitis vinifera* L. Monastrell Grapes and Wines

Encarna Gómez-Plaza, Laura Mestre-Ortuño, **Yolanda Ruiz-García**, Jose Ignacio Fernández-Fernández, and Jose María López-Roca

American Journal of Enology and Viticulture, 2012, 63, 394–401

ABSTRACT: Benzothiadiazole and methyl jasmonate have been described as exogenous elicitors of some plant defence compounds. The objective of this study was to determine whether the application of benzothiadiazole and methyl jasmonate to *Vitis vinifera* L. Monastrell grape clusters at the beginning of the ripening process affects the synthesis of volatile compounds in grapes (as has been observed in other fruits) and whether this effect has a technological significance in the resulting wines. Results indicated that both treatments increased the levels of volatile compounds in grapes, especially terpenes and norisoprenoids in benzothiadiazole-treated grapes. The wines obtained from the treated grapes also showed higher levels of terpene and norisoprenoids. Wines from methyl jasmonate-treated grapes had levels of these volatile compounds almost two times higher than the wines made from control grapes. These differences in the volatile compound levels could be sensorially detected.

URL: <http://ajevonline.org/content/63/3/394.abstract>

3.4

Incremento del contenido fenólico de uvas mediante la aplicación de ácido abscísico y una combinación de Metil jasmonato y Benzotiadiazol.

Increasing the Phenolic Compound Content of Grapes by Preharvest Application of Abscisic Acid and a Combination of Methyl Jasmonate and Benzothiadiazole

Yolanda Ruiz-García, Rocío Gil-Muñoz, Jose María López-Roca, Adrián Martínez-Cutillas, Inmaculada Romero-Cascales, and Encarna Gómez-Plaza

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61, 3978–3983

ABSTRACT: Benzothiadiazole (BTH) and methyl jasmonate (MeJ) have been described as exogenous elicitors of some plant defense compounds, polyphenols among them. Given that they activate different arrays of biochemical reactions to induce resistance, the objective of this study was to determine whether the joint application of BTH and MeJ to grape clusters affects the level of the main flavonoid compounds in grapes and in the resulting wines. The results are compared with those obtained when abscisic acid (ABA), a plant growth regulator involved in several physiological processes, was sprayed in the same vineyard. The results obtained indicated that, although the application of ABA increased the content of skin anthocyanins and tannins, these positive effects were not reflected in the wines made from these grapes. BTH+MeJ-treated grapes also presented higher anthocyanin and flavonol contents, and in this case, their wines presented better chromatic characteristics than the wine made from control grapes.

URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf400631m>

3.5

Efecto del uso combinado de Benzotiadiazol y Metil jasmonato en los componentes volátiles de los vinos de Monastrell

Effect of Combined Use of Benzothiadiazole and Methyl Jasmonate on Volatile Compounds of Monastrell Wine

Yolanda Ruiz-García, Jose María López-Roca, Ana Belén Bautista-Ortín, Rocío Gil-Muñoz, and Encarna Gómez-Plaza

American Journal of Enology and Viticulture, 2014, 65, 238-243

ABSTRACT: One effect of applying elicitors to plants is an increase in phenolic and volatile compound content. In this study, grapes treated at veraison with a combination of benzothiadiazole (BTH) and methyl jasmonate (MeJA) were vinified and the volatile composition of the resulting wines was analyzed. Results indicate that the combined application of BTH and MeJA to the grapes led to wines with a similar composition in higher alcohols and esters as wines made with untreated grapes. Treated grapes led to wines with a significantly higher concentration of terpenes, with some of the terpenes only detected in wines from treated grapes. A descriptive sensory analysis indicated that these differences in volatile composition could be detected in wines, with wines made from treated grapes having significantly greater fruity notes, aroma, and mouthfeel quality.

URL: <http://www.ajevonline.org/content/65/2/238.abstract>

4

Discusión general



Como ya se ha explicado con anterioridad, los objetivos primordiales para el uso de elicitors en tratamientos en campo han sido: a) aumentar la resistencia de la planta a patógenos, b) minimizar el impacto sobre la salud humana y el medioambiente por el uso de agroquímicos convencionales y c) prevenir la aparición de patógenos resistentes a ciertos fungicidas, al mismo tiempo que cubrir la demanda de productos de uva libres de residuos (Vitalini et al., 2011). Sin embargo, varios estudios han demostrado que el mecanismo involucrado en la respuesta de la planta tras el uso de elicitors implica un aumento en la concentración de compuestos polifenólicos y volátiles.

Basándonos en estas premisas, hemos diseñado una experiencia de tres años para determinar el efecto de BTH, MeJ y ABA en la concentración de compuestos fenólicos y volátiles en uva y sus vinos correspondientes.

Los primeros dos años evaluamos el efecto de la aplicación pre-cosecha de BTH y MeJ en uvas de la variedad Monastrell en la acumulación de compuestos fenólicos y volátiles en uva y vinos. Los resultados obtenidos en los compuestos fenólicos tras los experimentos de dos años consecutivos ([Publicación 3.1](#)) fueron el aumento del contenido de antocianos, flavonoles y proantocianidinas en uvas. Los vinos elaborados con uvas tratadas mostraron mayor intensidad de color y contenido fenólico total que los vinos de las uvas control, especialmente en el caso de los vinos elaborados con uvas tratadas con BTH. Por tanto, a pesar de que BTH y MeJ son moléculas señal de diferentes rutas que promueven mecanismos de defensa, nuestros resultados indican que los dos son capaces de activar la enzima fenilalanina amonio liasa y la ruta fenilpropanoide, aumentando el contenido fenólico en las uvas. Los vinos obtenidos de las uvas tratadas mejoraron sus características cromáticas y fueron preferidos sensorialmente, indicando que estos tratamientos pueden ser de interés para obtener vinos con un color estable y con mayor valor en el mercado.

Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la respuesta de las plantas a elicitors no depende solo de la variedad (Pan and Liu, 2011; Vitalini et al., 2011) sino también del clon (Jayasena and Cameron, 2009). A fin de determinar si hay un efecto clon en respuesta de las vides al tratamiento con elicitors con respecto al contenido fenólico, aplicamos BTH y MeJ a un viñedo con una colección de seis de los clones más importantes de la variedad Monastrell ([Publicación no 3.2](#)).

El análisis de antocianos, flavonoles, estilbenos y taninos de semilla y hollejo mostró que, en general, los dos elicitors aumentaban los niveles de compuestos

fenólicos en las plantas tratadas, aunque el grado de respuesta difería entre los clones de la misma variedad.

En este artículo, también se midió el nivel de estilbenos en uva y, en general, los dos elicitores aumentaron dichos niveles. Considerando cada clon individualmente, la aplicación de MeJ aumentó los niveles totales de estilbenos en cuatro de los clones estudiados, llegando a cuadruplicarse en uno de ellos. El tratamiento con BTH aumentó el contenido de estilbenos en tres de los clones estudiados. Se observaron diferencias entre los clones, pero no es la primera vez que se han encontrado estas discrepancias en la respuesta a infecciones y elicitación física de diversas variedades de uva o clones de la misma variedad (Van Leeuwen et al., 2013; Van Zeller et al., 2011). Por tanto, es necesario realizar un estudio preliminar exploratorio porque el grado de respuesta puede variar entre clones de la misma variedad e incluso entre campañas, ya que también pueden existir interacciones entre clones y condiciones medioambientales.

Los compuestos volátiles aromáticos son factores importantes que afectan el flavor y la calidad de la uva y también contribuye al carácter sensorial del vino. Se han descrito cambios en la producción de compuestos volátiles vegetales debido a estimulación biológica o estrés medioambiental (Kobayashi et al., 2011). Con respecto al uso de elicitores, se ha presentado un efecto inhibitorio del MeJ en enzimas formadoras de ésteres volátiles en manzanas almacenadas (Ollas et al., 1992). Por el contrario, se ha descrito un incremento de compuestos volátiles en fresas (Ayala-Zabala et al., 2005; De la Peña-Moreno et al., 2010) y mangos (Lalel et al., 2003). Este tipo de estudios no se han realizado en uvas, aunque sí se ha observado que los compuestos de tipo sesquiterpeno aumentaban en respuesta a jasmonatos en cultivos celulares de *Vitis vinifera* L. (D'Onofrio et al., 2009) y que la biosíntesis de novo de terpenoides se activaba en hojas de uva tras la aplicación de MeJ (Hampel et al., 2005).

En la [Publicación 3.3](#), hemos publicado por primera vez el efecto de la aplicación de BTH y MeJ en los compuestos volátiles de las uvas y sus vinos correspondientes. Las uvas tratadas con BTH mostraron mayores concentraciones en muchos de los compuestos analizados que las tratadas con MeJ y las uvas control, aunque las uvas tratadas con MeJ presentaron mayores niveles de terpenos y norisoprenoides que las no tratadas. Estos elicitores pueden haber estimulado la síntesis de algunos compuestos volátiles, probablemente incrementando la actividad de los enzimas involucrados en su biosíntesis. Esta es la primera vez que se ha

publicado el efecto del BTH en la síntesis de los compuestos volátiles, mientras que la aplicación con MeJ si que ha sido estudiada más extensamente. Así, estudios de otros autores mostraron que el tratamiento con MeJ aumentó la cantidad de monoterpenos, sesquiterpenos y norisoprenoides, alcoholes y ésteres aromáticos en fresas (Peña-Cortés et al., 2005) y mayores niveles de ésteres también en fresas (Ayala-Zabala et al., 2005). Aumentos en ácidos grasos y compuestos volátiles totales también se han descrito en pulpa de mango con tratamientos similares (Lalel et al., 2003).

En los vinos correspondientes, hemos estudiado los compuestos volátiles procedentes del proceso de fermentación y de la uva. Entre los últimos, se han detectado varios terpenos, incluyendo el sesquiterpeno nerolidol y los monoterpenos linalool, citronelol y α -mirceno. Los vinos control mostraron las menores concentraciones de compuestos volátiles y los elaborados con la uva tratada con MeJ las mayores, a pesar de que las máximas concentraciones de terpenoides y norisoprenoides fueron encontradas previamente en las uvas tratadas con BTH. Estos compuestos en las uvas aparecen o en su forma libre, contribuyendo así directamente al aroma, o en su forma no volátil como conjugados con azúcares (mayoritariamente disacáridos). Durante el proceso de elaboración del vino, algunos de estos compuestos pueden liberar la forma odorante por acción de glicosilasas de levaduras y bacterias o por la hidrólisis ácida durante el almacenamiento del vino. Por ello, esta podría ser la explicación de la alta concentración de estos compuestos en los vinos elaborados con uvas tratadas con MeJ que no se corresponde con la cantidad de dichos compuestos en sus uvas.

Para determinar si las diferencias observadas en los niveles de compuestos volátiles de los vinos se podían detectar a nivel sensorial, se realizó un análisis triangular a los vinos y se pidió a los panelistas puntuar las diferencias encontradas a nivel de color, aroma y sensación en boca. Para el caso de los vinos que fueron diferenciados correctamente, los panelistas indicaron que las diferencias encontradas lo fueron en el aroma y el sabor del vino.

En 2011, se probó un nuevo compuesto, el ácido abscísico (ABA)([Publication 3.4](#)). ABA es un regulador del crecimiento involucrado en varios procesos fisiológicos en la planta, siendo molécula señal bajo situaciones de estrés por alta salinidad, bajas temperaturas y/o infecciones (Leung y Giraudat, 1998). Algunos resultados indican que puede jugar un rol significativo en el contenido fenólico de plantas,

desencadenando la ruta metabólica de los flavonoides (Lacampagne et al., 2009; Berli et al., 2011).

Esta publicación también cubre los resultados del efecto de la aplicación conjunta de BTH y MeJ. Como se ha comentado, tanto el ácido jasmónico como el salicílico desencadenan una serie de respuestas y activan una serie de rutas, algunas de las cuales se solapan y otras son claramente distintas (Beckers y Spoel, 2006). En la naturaleza, parece ser que dependiendo del tipo de predador, la planta activa un tipo de respuesta u otro para sintetizar la mezcla de compuestos de defensa adecuados (Beckers y Spoel, 2006). Sin embargo, cuando se aplican exógenamente, se han detectado interacciones tanto sinérgicas como antagónicas (Thaler et al., 2002b; Thaler et al., 2002a; O'Donnell et al., 2003; Fumagalli et al., 2006; Gu et al., 2010; Sandhu et al., 2011; Omran, 2011; Garibaldi et al., 2010). Todos los estudios acerca de las interacciones entre MeJ o ácido jasmónico y BTH o ácido salicílico se basan en resistencia a patógenos o estudios moleculares. Por tanto, no pudimos encontrar otra investigación a cerca del efecto del tratamiento conjunto de BTH y MeJ en los compuestos fenólicos de plantas en general o uvas en particular.

La aplicación de BTH+MeJ dobló las cantidades de antocianos en uva tanto expresadas como $\mu\text{g/g}$ de hollejo o como mg/kg de uva. El tratamiento con ABA también incremento significativamente dicha concentración. En nuestro estudio (**Publicación no 3.1**), el BTH aumentó los niveles de antocianos en un 14-23% y el MeJ un 16%. El aumento de compuestos fenólicos observado cuando estos elicitors fueron aplicados al mismo tiempo indicó que no hay interacción negativa entre ellos. Sin embargo, no se puede afirmar que exista un efecto sinérgico, ya que en este estudio no se aplicaron también dichos tratamientos por separado. Al contrario de lo encontrado para antocianos, los niveles de flavonoles no aumentaron con los tratamientos.

La aplicación de ABA también aumentó los niveles de taninos en hollejo, pero sólo expresados como mg/kg de uva, mientras que no se encontraron diferencias entre las uvas control y las tratadas con BTH+MeJ. Estos resultados no concuerdan con nuestros estudios previos, ya que, cuando se aplicaron los elicitors por separado se observó un aumento de taninos de hollejo, especialmente en el caso de MeJ. Quizá, el hecho de que el BTH pueda anular el efecto del MeJ, como ya ha sido demostrado por otros autores (Thaler et al., 2002b; Considine et al., 2009; Leon-Reyes et al., 2010), podría explicar parcialmente la falta de efecto positivo sobre los taninos de hollejo al aplicar los dos elicitors al mismo tiempo.

Se ha observado que a pesar de que la aplicación exógena pre-cosecha de ABA en uvas aumentaba tanto los antocianos como los taninos de hollejo, este efecto positivo no se vio reflejado en los vinos elaborados con dichas uvas. Las uvas tratadas con BTH+MeJ también presentaron mayor contenido de antocianos y, en este caso, sus vinos sí que presentaron mejores características cromáticas que el vino control. A pesar de ello, esta mejora no fue mayor que en el estudio anterior con el tratamiento individual (**Publicación no 3.1**). Como se ha comentado anteriormente, dichos tratamientos, mostraron mayores aumentos especialmente en el caso de vinos de uvas tratadas con BTH. Estos resultados no prueban de la existencia de una interacción antagónica entre BTH y MeJ, pero claramente indica que la respuesta no es mayor que en el caso de la aplicación por separado.

También se ha estudiado el efecto de la aplicación conjunta de BTH y MeJ sobre la composición de compuestos volátiles y características sensoriales de los vinos elaborados con uvas tratadas (**Publicación no 3.5**). La diferencia principal se observó en la concentración de terpenos. Como se ha comentado, los terpenos se consideran importantes por la expresión de características varietales en el vino. Dichos compuestos tienen un umbral olfatorio bajo asociado con aromas florales y cítricos. En los vinos estudiados, se detectaron varios terpenos, encontrándose la mayor concentración para el linalool, α -terpineol y citronelol. La aplicación conjunta de BTH y MeJ a las uvas conlleva una concentración mayor de terpenos en sus correspondientes vinos, viéndose doblado la concentración total comparada con los vinos control. Algunos compuestos como óxido de cis-linalool, 2, 6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol (que puede producir ho-trienol y óxido de nerol) y alcohol de lila sólo se detectaron en los vinos de uvas tratadas. Los panelistas encontraron las diferencias principalmente en el aroma de los vinos y el tratamiento aumentó significativamente las notas de fruta y la calidad general del aroma y disminuyó las notas herbáceas.

Como conclusión, los resultados mostraron que el tratamiento pre-cosecha de uvas con BTH conllevó mejores resultados con respecto a la composición fenólica de uvas y vino que con MeJ. (**Publicación 3.1**) mientras que MeJ aumentó los niveles de estilbenos (**Publicación 3. 2**) y compuestos volátiles de uva y vino (**Publicación 3.3**). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la respuesta defensiva que cada elicitor desencadena. Por ejemplo, la respuesta que depende del ácido salicílico es efectiva frecuentemente contra patógenos biotróficos (los que se pueden alimentar de células vivas del hospedador), mientras que la respuesta mediada por ácido

jasmónico es mayoritariamente efectiva contra patógenos necrotróficos (aquellos que destruyen la célula del hospedador antes de alimentarse) e insectos (Beckers y Spoel, 2006). Un nivel aumentado de compuestos fenólicos puede ser tóxico para microorganismos que se estén alimentando de la planta y limitar su acción, mientras que un alto nivel de estilbenos y terpenos puede limitar a los herbívoros y patógenos invasivos por su toxicidad (Phillips y Croteau, 1999). Los terpenos también pueden servir como señales que se transportan por el aire para disuadir herbívoros, ataque por predadores y participan en la señalización entre plantas (Kessler y Baldwin, 2002; Paré y Tumlinson, 1999; Pichersky y Gershenzon, 2002).

Considerando el tratamiento conjunto de BTH y MeJ, nuestros resultados indican que su uso aumenta positivamente las características cromáticas de los vinos resultantes, de forma similar que cuando se aplicó BTH por separado ([Publicación 3.4](#)). Por otro lado, el aroma de los vinos elaborados con las uvas tratadas con BTH+MeJ fue aumentado de forma similar que cuando se aplicó MeJ por separado. Al contrario de lo esperado, y a pesar de que no se observó un efecto negativo, nuestros resultados parecen indicar que la aplicación conjunta de BTH y MeJ no sirve para optimizar las dos líneas de acción ([Publicación 3.5](#)).

Los resultados observados pueden ser importantes para la planta, ya que una de las consecuencias más destacadas del uso de elicitores exógenos es la reducción de la incidencia y severidad de la infección por mohos, como se ha demostrado en varios estudios. Considerando que el MeJ es un metabolito de origen natural en la planta y que el BTH es translocado y degradado en el tejido vegetal y, por tanto, no se esperan problemas de persistencia y residuos, los dos productos se pueden considerar una estrategia interesante para proteger la viña, como una alternativa o complemento a los tratamientos con fungicidas, aumentando al mismo tiempo, el contenido fenólico. Sin embargo, es importante indicar que estos primeros resultados deben ser completados, ya que se deben realizar más investigaciones con respecto a la dosis utilizada, los momentos de aplicación e las posibles interacciones entre la uva y las condiciones climatológicas que pueden suponer diferentes resultados.

5

Summary



When evaluating the quality of wine, three main aspects have to be considered: color, taste and aroma. Color and also taste, although to a lesser extent, are due to the presence of phenolic compounds, especially important in the case of red wines, whereas the aroma of wines is due to the presence of volatile compounds, which origin may be the grapes themselves, the fermentative process or the aging processes (Schreier et al., 1976). The commercial potential of a winegrape variety can be in part determined by the ability of the cultivar to produce the phenolic and aroma compounds that will determine the wine quality (D'Onofrio et al., 2009).

Phenolic and volatile compounds are secondary metabolites of grapes. Plants produce a wide variety of this type of metabolites through diverse biosynthesis pathways and their production is sometimes a response to external stimuli, either environmental or biotic stresses (D'Onofrio et al., 2009). Some of them may act as chemical defences against pathogens or herbivores and their synthesis is increased when the attack exists (Lattanzio et al., 2006; Chen, 2008; Eyles et al., 2009).

Therefore, in plants, phenolic and volatile compounds are part of the plant-inducible defense mechanisms, which, upon recognition of the attacker, are activated at the site of infection as well as in uninfected distant tissues, using signaling molecules and processes for the activation (Beckers and Spoel, 2006). Among these, the resistance process mediated by the accumulation of endogenous salicylic acid (SA) is called systemic acquired resistance (SAR), and involves the induction of secondary metabolic pathways and the increased synthesis of products from this metabolism, phenolic compounds among them, as a response to pathogen attack (Gozzo, 2003). However, defense signaling pathways that are independent of SA have also been described. For example, jasmonic acid (JA) and its derivative methyl jasmonate (MeJ) are also signaling molecules that can orchestrate a large set of defense responses (Beckers and Spoel, 2006), including the synthesis of new phenolic and volatile compounds.

However, it is remarkable that the synthesis of these interesting compounds can be activated even when the stimulus is not present, with the use of elicitors. These are substances that mimic or are the naturally occurring substances that when applied exogenously trigger the biosynthetic pathways conducting to the synthesis of these defence compounds (Thaler et al., 2002b; Filella et al., 2006; Ruiz-García and Gómez-Plaza, 2013). For this reason, a novel field of interest has opened up with the results obtained when using certain elicitors since the benefits of the use of these elicitors could be an increase resistance to biotic and abiotic stresses together with

an increased in the synthesis of phenolic (Iriti et al., 2004; Fumagalli et al., 2006) and aroma compounds (Lalel et al., 2003; Ayala-Zabala et al., 2005; Kondo et al., 2005) in plants.

The primary objectives in using these elicitors as field treatments was a) to increase plant resistance to pathogens, b) to minimize the impact on human health and the environment of using conventional agrochemicals and c) to prevent the development of pathogen resistance to certain fungicides, while covering the demand for residue-free grape products (Vitalini et al., 2011). However, several studies demonstrated that the mechanism involved in the response of the plant after the use of elicitors implied an increased concentration of polyphenol and volatile compounds.

Based on these premises, we designed a three years experience to determine the effect of BTH, MeJ, and ABA on the concentration of phenolic and volatile compounds in grapes and their corresponding wines.

The first two years we evaluated the effect of the preharvest application of BTH and MeJ on Monastrell grapes on the accumulation of phenolic compounds and volatile compounds in grapes and wines. The results on the phenolic compounds ([Publication 3.1](#)) obtained after a 2-years-experiment indicated that both treatments increased the anthocyanin, flavonol, and proanthocyanidin content of grapes. The wines obtained from the treated grapes showed higher color intensity and total phenolic content than the wines made from control grapes, especially the wine elaborated with BTH-treated grapes. Therefore, although BTH and MeJ activate different signal transduction pathways to promote the plant defense mechanisms, our findings meant that both of them activated the enzyme phenylalanine ammonia lyase and the phenyl propanoid pathway, increasing grape phenolic content. The wines obtained from the treated grapes improved their chromatic characteristics and were sensorially preferred, indicating that these treatments could be of interest to obtain wines with a deep and stable color and a potentially higher market value.

However, several studies have shown that the response of plants to elicitors may depend not only on variety (Pan and Liu, 2011; Vitalini et al., 2011) but also on clone (Jayasena and Cameron, 2009). In order to determine if there was a clone-effect in the response of the vines to the elicitor treatment, we applied BTH and MeJ in a vineyard containing a collection of six of the most important selected clones of Monastrell variety to determine whether the effect on phenolic compound content is clone-dependent ([Publication no 3.2](#)).

The analysis of anthocyanins, flavonols, stilbenes, and seed and skin tannins showed that, overall, both elicitors increased the levels of phenolic compounds in the treated plants, although the extent of the response differed among clones from the same variety.

In this paper, the level of stilbenes was also measured in the grapes and, in general, both elicitors increased the level of stilbenes. Considering each clone individually, the application of MeJ increased total levels of stilbenes in four of the studied clones, reaching a five-fold increase in one of them. BTH treatment increased stilbene content in three of the studied clones. Differences were observed among clones, but this is not the first time that discrepancies in the response to infections or physical elicitation have been reported in diverse grape varieties or clones of the same variety (Van Leeuwen et al., 2013; Van Zeller et al., 2011). However, the results indicate that a preliminary exploratory study should be conducted because the extent of the observed response may vary between clones from the same variety and between campaigns, as clone-environment interactions may also exist.

Volatile aroma compounds are important factors that affect grape flavor and quality and also contribute to the sensory character of wine. Changes in the production of plant volatile compounds due to biological stimulation or environmental stress have been described (Kobayashi et al., 2011). As regard the effect of elicitors, an inhibitory effect of MeJ on the volatile ester-forming enzymes in stored apples has been reported (Ollas et al., 1992). Conversely, an increase in volatile compounds in MeJ-treated strawberries (Ayala-Zabala et al., 2005; De la Peña-Moreno et al., 2010) and mango (Lalel et al., 2003) has also been described. These studies have not been conducted in grape berries, although it has been observed sesquiterpene-like compounds in *Vitis vinifera* L. cell cultures increased in response to jasmonates (D'Onofrio et al., 2009) and a strong activation of the de novo biosynthesis of terpenoids in grape leaves after MeJ application has been demonstrated (Hampel et al., 2005).

In [Publication 3.3](#), we report for the first time the effect of the application of BTH and MeJ to ripening grapes on the volatile compounds of these grapes and the differences found in the resulting wines. BTH-treated grapes had higher concentrations of many of the compounds analyzed than the MeJ-treated grapes and untreated control grapes, although MeJ-treated grapes also had higher levels of terpenes and norisoprenoids than untreated control grapes. The elicitors used in this

study may have stimulated the synthesis of some volatile compounds, probably by enhancing the activity of the enzymes involved in their biosynthesis. This is the first time that an effect of BTH on volatile compounds has been reported, whereas the effects of the application of MeJ have been more extensively studied. Application of MeJ has been reported to increase the amount of monoterpenes, sesquiterpenes, aromatic norisoprenoids, alcohols, and esters in strawberries (Peña-Cortés et al., 2005), and higher levels of esters have been reported in MeJ-treated strawberries (Ayala-Zabala et al., 2005). Similar increases in fatty acids and total volatile compounds in the pulp of mango due to MeJ treatments have been described (Lalel et al., 2003).

Our results indicated that the effects of BTH on grape volatile compounds were more evident, indicating that BTH, as an activator of defence mechanisms, may also increase the activity of enzymes related to the synthesis of volatile compounds in a similar way to the effect already described for MeJ.

In the corresponding wines, we studied the volatile compounds arising from the fermentation process and those compounds that were originated in the grapes. Among the latter compounds, several terpenes were detected, including the sesquiterpene nerolidol and the monoterpenes linalool, citronellol, and β -myrcene. Control wines had the lowest concentrations and wines from MeJ-treated grapes had the highest relative concentration, even though the maximum concentration of terpenoids and norisoprenoids was previously found in the BTH-treated grapes. These compounds in grapes appear either in their free form, directly contributing to aroma, or as nonvolatile sugar-bound conjugates (mainly disaccharide glucosides). During winemaking, some of these bound volatile compounds may give rise to odorant compounds, through the function of yeast and bacteria glycosidases or because of acid hydrolysis during wine storage. Therefore, a possible explanation for the high relative concentration of these compounds found in wines made from MeJ-treated grapes, but not in the grapes themselves, could be that the MeJ treatment increased the production of these compounds in grapes, in their bound form, which, during winemaking and malolactic fermentation, were released.

To determine whether the differences observed in volatile compound levels in the different wines could be sensorially detected, wines were tested using a triangle test and panelists were asked to indicate which sample was different and to rate the differences observed in color, aroma, and mouthfeel of the wines. For those wines

that were correctly differentiated, panelists reported that the differences were mainly found in the aroma and taste of the wine.

In 2011, a new compound, abscisic acid (ABA) was tested ([Publication 3.4](#)). ABA is a plant growth regulator involved in various physiological processes, including signaling when a plant is under stress as a result of high salinity, cold and/or microbial infections, etc (Leung and Giraudat, 1998). Some results indicate that it may play a significant role in triggering the flavonoid biosynthetic pathway (Lacampagne et al., 2009; Berli et al., 2011).

Also, this same publication covers the results of the effect of a joint application of BTH and MeJ. As mentioned previously, jasmonic acid and salicylic acid each trigger an array of biochemical response and products, some of which overlap although many are distinct (Beckers and Spoel, 2006). In nature, it seems that, depending on the type of attacker, the plant activates different signaling pathways to synthesize an optimal mixture of defensive compounds (Beckers and Spoel, 2006). However, when applied exogenously, both synergistic and antagonistic interactions between these molecules have been reported (Thaler et al., 2002b; Thaler et al., 2002a; O'Donnell et al., 2003; Fumagalli et al., 2006; Gu et al., 2010; Sandhu et al., 2011; Omran, 2011; Garibaldi et al., 2010). All the studies of cross-talk and interactions between MeJ (or JA) and BTH (or SA) are based on pathogen resistance or molecular studies. Therefore, we could not find any other research on the effect of jointly applying MeJ and BTH on the phenolic content of plants in general or grapes, in particular.

The application of BTH+MeJ doubled the quantities of grape anthocyanins, both expressed as $\mu\text{g/g}$ of skin or mg/kg of grapes. The treatment with ABA also significantly increased the concentration of anthocyanins. In our previous study ([Publication no 3.1](#)), BTH increased the anthocyanin concentration by 14-23%, and MeJ by 16%. The greater increases observed in this study when BTH and MeJ were applied together indicated that there was no negative interaction. However, a positive interaction cannot be totally ruled out since, in this study, BTH and MeJ were not applied separately. Contrary to the results found in the level of anthocyanins, the concentration of flavonols did not increase following the treatments.

The application of ABA also increased grape skin tannin levels although only when expressed as mg/kg of berries, whereas no difference was found between the control and BTH+MeJ-treated grapes. These results do not agree with our previous

findings, since, when both elicitors were applied separately, an increase in skin tannins was observed, especially when MeJ was applied. Perhaps, the fact that BTH may override the effect of MeJ, as stated by many authors (Thaler et al., 2002b; Considine et al., 2009; Leon-Reyes et al., 2010), would partially explain the lack of positive effect on skin tannins when both elicitors were applied at the same time.

It was observed that although the preharvest exogenous application of ABA to grapes increased the skin content of anthocyanins and tannins, these positive effects were not reflected in the wines elaborated from these grapes. BTH+MeJ-treated grapes also presented higher anthocyanin content. Despite that, in this case, their wines presented better chromatic characteristics than the wine made from control grapes, these results did not improve on those observed in our previous study (**Publication no 3.1**). As stated before, such treatments, which involved the separated application of BTH and MeJ, showed higher increases especially in the case of BTH treated-grapes and wines when comparing to their corresponding control. This actual results do not prove the existence of a negative cross-talk between BTH and MeJ when they were applied jointly to preharvest grapes but they clearly indicate that the response was not improved, compared with the results obtained with the separate application of these compounds.

The effect of the joint application of these two elicitors on the volatile composition and sensory characteristics of wines was also studied (**Publication no 3.5**). The main differences were observed in terpene concentration. As stated before, terpenes are considered important for the expression of varietal characteristics in wine. Such compounds have a low olfactory threshold and are generally associated with floral and citric aromas. In the studied wines, several terpenes were detected, the highest concentration being found for linalool, α -terpineol, and citronellol. The combined application of BTH and MeJ to the grapes led to a higher concentration of terpenes in the wines elaborated from these grapes, doubling their total concentration compared with the levels found in control wines. Some compounds such as cis-linalool oxide, 2, 6-dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol (that can lead to ho-trienol and nerol oxide) and lilac alcohol were only detected in wines from treated grapes. Panellists reported that the differences were mainly found in the aroma of the wines, the treatment significantly increasing fruity and overall aroma quality and decreasing herbaceous notes.

As a conclusion, the results showed that BTH treatment of preharvest grapes generally led to better results as regard the phenolic composition of grapes and

wines than MeJ treatment (**Publication 3.1**) whereas MeJ largely increased the levels of stilbenes (**Publication 3.2**) and grape and wine volatile compounds (**Publication 3.3**) These differences may be related with the defence responses that each elicitor triggered. For instance, defence responses that depend on SA are often effective against biotrophic pathogens (pathogens that feed on the living host cell), whereas defences dependent on JA are mostly effective against necrotrophic pathogens (pathogens that kill the host cell before feeding) and insects (Beckers and Spoel, 2006). An increased level of phenolic compounds may be toxic for the feeding microorganisms and limit their action, while an increase in stilbenes and terpenes may limit herbivore and pathogen invasion because of their toxicity (Phillips and Croteau, 1999). Terpenes may also serve as airborne signals that deter herbivores, attract predators and act in plant-to-plant signaling (Kessler and Baldwin, 2002; Paré and Tumlinson, 1999; Pichersky and Gershenzon, 2002).

Considering the combined treatment of BTH and MeJ, on one hand, our results indicate that the use of such combination positively increases the chromatic characteristics of the resulting wines, in a similar way to when BTH was applied separately (**Publication 3.4**). On the other hand, the aroma of the wines elaborated with BTH+MeJ treated grapes were increased in a similar way to when MeJ was applied separately. Contrary to expectations, and although a negative effect was not observed, our results seem to indicate that the combined application of BTH and MeJ did not serve to increase both lines of action (**Publication 3.5**).

The results observed may be important for the plant since a reduced incidence and severity of gray mold infection is one of the most outstanding consequences of the use of exogenous elicitors, as demonstrated in several studies. Taking into account that MeJ is a naturally occurring plant metabolite and BTH was detected to be completely translocated and degraded in plant tissues, and therefore, no persistence or residue problems are expected, both products could be considered an interesting strategy to protect the vine, as an alternative or complement to fungicide treatments, increasing, at the same time, the phenolic content of the grapes. However, it is important to indicate that these first results should be completed. Further investigations must be done specially regarding doses, moments of application and grape-environment interactions that may exist and may make a difference on the results.

Bibliography

- Ayala-Zabala, F., Wang, S., Wang, C., and Gonzalez-Aguilar, G. (2005) Methyl jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, volatile compounds and postharvest life of strawberry fruit. *European Food Research and Technology* **221**, 731-738.
- Beckers, G. and Spoel, S. (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* **8**, 1-10.
- Berli, F., 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**, 4874-4884.
- Chen, M. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* **15**, 101-114.
- Considine, M., Gordon, C., Croft, K., Ching, S. (2009) Salicylic acid overrides the effect of methyl jasmonate on the total antioxidant capacity of table grapes. *Acta Horticulturae* **841**, 495-498.
- D'Onofrio, C., Cox, A., Davies, C., Boss, P.K. (2009) Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates. *Functional Plant Biology* **36**, 323-338.
- De la Peña-Moreno, F., Blanch, G., and Ruiz del Castillo, M. L. (2010) Effect of (-)- and (+)-methyl jasmonate on the bioformation of aroma-active esters in strawberry fruits. *European Food Research and Technology* **231**, 829-834.
- Eyles, A., Bonello, P., Ganley, R., Mohamed, C. (2009). Induced resistance to pests and pathogens in trees. *New Phytologist* **185**, 893-906.
- Filella, I., Peñuelas, J., Llusia, J. (2006). Dynamics of the enhanced emissions of monoterpenes and methyl salicylate, and decreased uptake of formaldehyde, by *Quercus ilex* leaves after application of jasmonic acid. *New Phytologist* **169**, 135-144.
- Fumagalli, F., Rossoni, M., Iriti, M., di Gennaro, A., Faoro, F., Borroni, E., Borgo, M., Scienza, A., Sala, A., Folco, G. (2006) From field to health: a simple way to increase the nutraceutical content of grape as shown by NO-dependent vascular relaxation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 5344-5349.
- Garibaldi, M., Geny, L., Delrot, S., and Schubert (2010) Proteomic analysis of the effects of ABA treatments on ripening *Vitis vinifera* berries. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2447-2458.
- Gozzo, F. (2003) Systemic Acquired Resistance in Crop Protection: From Nature to a Chemical Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4487-4503.

- Gu, S., Jacobs, S., Du, G. (2010) Efficacy, rate and timing of applications of abscisic acid to enhance fruit anthocyanin contents in Cabernet Sauvignon grapes. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **86**, 505-510.
- Hampel, D., Mosandl, A., Wust, M. (2005) Induction of de novo volatile terpene biosynthesis via cytosolic and plastidial pathways by methyl jasmonate in foliage of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 2652-2657.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Faoro, F. (2004) Benzothiadiazole Enhances Resveratrol and Anthocyanin Biosynthesis in Grapevine, Meanwhile Improving Resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 4406-4413.
- Kondo, S., Setha, A., Rudell, D., Buchanan, D., and Mattheis, J. (2005). Aroma volatile biosynthesis in apple affected by 1-MCP and methyl jasmonate. *Postharvest Biology and Technology* **36**, 61-68.
- Jayasena, V. and Cameron, I. (2009) The effect of ethephon and clone on physical characteristics and sensory quality of Crimson Seedless table grapes after one month storage. *International Journal of Food Science and Technology* **44**, 409-414.
- Kessler, A. and Baldwin, I. (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 299-358.
- Kobayashi, H., Takase, H., Suzuki, Y., Tanzawa, F., Takata, R., Fujita, K., Kohno, M., Mochizuki, M., Suzuki, S., and Konno, T. (2011) Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1325-1336.
- Lacampagne, S., Gagne, S., Geny, L. (2009) Involvement of abscisic acid in controlling the proanthocyanidin biosynthesis pathway in grape skin: new elements regarding the regulation of tannin composition and leucoanthocyanidin reductase (LAR) and anthocyanidin reductase (ANR) activities and expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**, 81-90.
- Lalel, H., Singh, Z., and Tan, S. (2003) The role of methyl jasmonate in mango ripening and biosynthesis of aroma volatile compounds. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**, 470-484.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M., Cardinali, A. (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In 'Phytochemistry: Advances in Research'. (Ed. F Imperato) pp. 23-67. (Research Singpost: Kerala, India).
- Leon-Reyes, A., Van der Does, D., De Lange, E., Delker, C., Wasternack, C., Van Wees, S., Ritsema, T., Pieterse, C. (2010) Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* **232**, 1423-1432.

- Leung, J. and Giraudat, J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 199-122.
- O'Donell, P., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J., Klee, H. (2003) Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology* **133**, 1181-1189.
- Ollas, J., Sanz, L., Rios, J., and Perez, A. (1992) Inhibitory effect of methyl jasmonate on the volatile ester-forming enzyme system in Golden Delicious apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 266-270.
- Omran, Y. (2011) Enhanced yield and fruit quality of Red Globe grapevines by abscisic acid (ABA) and ethanol applications. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **45**, 13-18.
- Pan, Y. and Liu, X. (2011) Effect of benzo-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) treatment on the resistant substance in postharvest mango fruits of different varieties. *African Journal of Biotechnology* **10**, 15521-15528.
- Paré, P. and Tumlinson, J. (1999) Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology* **121**, 325-332.
- Peña-Cortés, H., Barrios, P., Dorta, F., Polanco, V., Sanchez, E., Sanchez, C., and Ramirez, I. (2005) Involvement of jasmonic acid and derivatives in plant responses to pathogens and insects and in fruit ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**, 246-260.
- Phillips, M. and Croteau, R. (1999) Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science* **4**, 183-190.
- Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinions in Plant Biology* **5**, 237-243.
- Ruiz-García, Y. and Gómez-Plaza, E. (2013) Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture* **3**, 33-52.
- Sandhu, A., Gray, D., Lu, J., Gu, L. (2011) Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of muscadine grapes (*Vitis rotundifolia* L.) skins. *Food Chemistry* **128**, 982-988.
- Schreier, P., Drawert, F., Junker, A. (1976). Identification of volatile constituents from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**, 331-336.
- Thaler, J., Findantsef, A., Bostock, R. (2002a) Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 1131-1159.
- Thaler, J., Karban, R., Ullman, D., Boege, K., Bostock, R. (2002b) Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defence pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* **131**, 227-235.

- Van Leeuwen C, Roby JP, Alonso-Villaverde V, Gindro K (2013) Impact of clonal variability in *Vitis vinifera* Cabernet franc on grape composition, wine quality, leaf blade stilbene content, and downy mildew resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**, 19-24.
- Van Zeller MI, Bavaresco L, Civardi S, Ferrari F (2011) Interactions between *Plasmopara viticola* infection and stilbene synthesis in leaves and berries of ten Cabernet Sauvignon clones. *Vitis* **50**, 119-122.
- Vitalini, S., Gardana, C., Zanzotto, A., Fico, G., Simonetti, P., and Iriti, M. (2011) From vineyard to glass: agrochemicals enhance the melatonin and total polyphenol contents and antiradical activity of red wines. *Journal of Pineal Research* **51**, 278-285.

6

Conclusiones

1. Tras dos años de evaluación, y teniendo en cuenta las diferencias en las condiciones climáticas, podemos concluir que los dos elicitores aumentan los niveles de flavonoides en uvas. A pesar de que BTH y MeJ activan diferentes rutas para promover mecanismos de defensa de la planta, nuestros resultados indican que los dos activan la fenilalanina amonio liasa y la ruta fenilpropanoide, aumentando el contenido fenólico de las uvas. Desde un punto de vista tecnológico, los resultados demuestran que los vinos obtenidos de uvas tratadas mostraron mayor intensidad de color y contenido fenólico total que los vinos de las uvas control y fueron preferidos a nivel sensorial.
2. El análisis de antocianos, flavonoles, estilbenos y taninos de hollejo y semilla de seis clones de uvas Monastrell tratadas con BTH y MeJ en el momento del envero mostró que, en general, los dos elicitores, pero especialmente BTH, aumentaron los niveles de compuestos flavonoides en las plantas tratadas, mientras que MeJ aumentó la biosíntesis de estilbenos. Sin embargo, los resultados también mostraron variaciones en la cantidad de respuesta de los diferentes clones por la aplicación de dichos elicitores.
3. El uso de BTH y MeJ en el momento del envero contribuyó positivamente al aroma de las uvas y de sus vinos resultantes. Las uvas tratadas con MeJ tuvieron mayor concentración relativa de terpenoides y norisoprenoides. Los vinos elaborados con uvas tratadas fueron preferidos por los panelistas en un análisis sensorial de tipo triangular, encontrándose las diferencias principalmente en el aroma y sabor.
4. A pesar de que la aplicación exógena en campo de ABA a las uvas aumentó el contenido de antocianos y taninos de hollejo, estos efectos positivos no se reflejaron en los vinos elaborados con dichas uvas.
5. El tratamiento combinado de BTH+MeJ en el momento del envero produjo uvas con mayor contenido de antocianos y vinos con mejores características cromáticas que el vino elaborado con las uvas control. Sin embargo, estos resultados no mejoraron los obtenidos con la aplicación por separado de BTH o MeJ, especialmente en el caso de uvas tratadas con BTH y sus vinos.

6. Cuando las uvas Monastrell fueron tratadas en el momento del envero con una combinación de BTH y MeJ, la concentración de terpenos aumentó en los vinos resultantes, doblando su concentración con respecto a los niveles obtenidos en el vino control. El tratamiento aumentó significativamente las notas frutales y la calidad aromática general de los vinos y disminuyó las notas herbáceas. A pesar de ello, estos resultados no mejoraron los obtenidos con anterioridad con el tratamiento por separado de BTH o MeJ, indicando que la aplicación conjunta de BTH y MeJ no sirve para aumentar las líneas de acción de los dos elicitores.

7. En general, los resultados han demostrado que el tratamiento pre-cosecha con BTH en uvas generalmente conlleva mejores resultados en cuanto al aumento en compuestos fenólicos en uvas y vinos, mientras que el tratamiento con MeJ aumenta los niveles de estilbenos y los compuestos volátiles de uvas y vinos. Estas diferencias pueden estar relacionadas con las distintas respuestas defensivas que cada uno desencadena.

8. Tanto benzotriazol como metil jasmonato podrían considerarse una estrategia interesante para proteger la viña, como una alternativa o complemento de tratamientos con fungicidas, aumentando al mismo tiempo el contenido fenólico y aromático de las uvas. Por lo tanto, esta podría ser una línea de acción para producir vinos más aromáticos, con un color más intenso y estable, incrementando potencialmente su valor en el mercado. Sin embargo, deben realizarse futuras investigaciones en esta línea de trabajo, especialmente con respecto a la dosis a emplear, los momentos de aplicación y posibles interacciones existentes entre las condiciones climáticas y las uvas.

7

Conclusions



1. After two years of evaluation, and taking into account the differences in climatic conditions, we can conclude that both elicitors increased the level of grape flavonoids. Although BTH and MeJ activate different signal transduction pathways to promote the plant defense mechanisms, our findings indicate that both of them activated phenylalanine ammonia lyase and the phenyl propanoid pathway, increasing grape phenolic content. From a technological point of view, the results demonstrated that the wines obtained from the treated grapes showed higher color intensity and total phenolic content than the wines made from control grapes and were sensory preferred.
2. The analysis of anthocyanins, flavonols, stilbenes, and seed and skin tannins in six clones of Monastrell grapes treated with BTH and MeJ at veraison showed that, overall, both elicitors, but specially BTH, increased the levels of flavonoid compounds in the treated plants, whereas MeJ largely increased stilbene biosynthesis. However, results also showed that variations in the extent of the response of the different grape clones to the application of these compounds exist.
3. The use of both BTH and MeJ to ripening Monastrell grapes contributed positively to the aroma of the grapes and the resulting wines. Those from MeJ-treated grapes had the highest relative concentration of terpenoids and norisoprenoids. The wines elaborated with treated grapes were preferred by the panelists in a triangle sensory test, who found the main differences in their aroma and taste.
4. Although the preharvest exogenous application of ABA to grapes increased the skin content of anthocyanins and tannins, these positive effects were not reflected in the wines elaborated from these grapes.
5. The combine BTH+MeJ treatment at veraison led to grapes with higher anthocyanin content, and wines with better chromatic characteristics than the wine made from control grapes. However, these results did not improve those observed with the separated application of BTH or MeJ, especially, as regards the BTH-treated grapes and wines.

6. When Monastrell grapes were treated at veraison with a combination of BTH and MeJ, the concentration of terpenes increased in the resulting wines, doubling their total concentration compared with the levels found in control wines. The sensory analysis reported that differences were found in the aroma of the wines, the treatment significantly increasing fruity and overall aroma quality and decreasing herbaceous notes. However, these results did not improve on those observed in the previous study, which involved with the separated application of BTH or MeJ, indicating that the combined application of BTH and MeJ did not serve to increase the lines of action of both elicitors simultaneously.
7. Generally, the results showed that BTH treatment of preharvest grapes generally led to better results as regard the phenolic composition of grapes and wines than MeJ treatment whereas MeJ largely increased the levels of stilbenes and grape and wine volatile compounds. These differences may be related with the different defense responses that each elicitor triggered.
8. Both benzothiadiazole and methyl jasmonate could be considered an interesting strategy to protect the vine, as an alternative or complement to fungicide treatments, increasing, at the same time, the phenolic and aroma content of the grapes. Hence, this could be a line of action to produce more aromatic wines, with a deep and stable color, thus potentially increasing their higher market value. However, further investigations must be done specially regarding doses, moments of application and grape-environment interactions that may exist and may make a difference on the results.