

Estudio de precursores aromáticos en clones comerciales de Tannat y seguimiento de su evolución durante la maduración

N. Nieto¹, C. Da Silva², A. Coniberti³, E. Boido¹, F. Carrau¹, E. Dellacassa⁴, and L. Fariña^{1,*}

¹Área Enología y Biotecnología de Fermentaciones, CYTAL, Facultad de Química

²PDU Espacio Biología Vegetal del Noreste, sede Tacuarembó, CENUR NE, UdelaR

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas

⁴Laboratorio de Biotecnología de Aromas, DQO, Facultad de Química

Resumen. La variedad Tannat desde el punto de vista del aroma, resulta una variedad neutra pero capaz de aportar precursores aromáticos que son de interés en la elaboración de vinos de guarda. Los principales precursores aromáticos presentes son compuestos glicosidados y carotenoides. Durante 3 vendimias consecutivas se estudió el contenido de precursores aromáticos de 8 clones comerciales de Tannat (ENTAV-INRA: 398, 399, 472, 474, 475, 717, 794 Y 944). En base a los resultados obtenidos se seleccionaron los clones 717 y 474 por su alta y baja performance en la producción de precursores glicosidados. En la siguiente vendimia se estudió el comportamiento de precursores glicosidados (SPE-GC-MS) y carotenoides (HPLC-DAD) en los clones seleccionados durante 4 estadios de madurez de la uva, donde se identificaron 14 xantofilas y 1 caroteno. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de carotenoides entre los dos clones estudiados a lo largo del periodo de maduración. Mientras que su degradación no presentó diferencias significativas. Conjuntamente se identificaron 10 norisoprenoides glicosidados en la uva de los clones estudiados pero el contenido de estos no presentó diferencias significativas entre los clones durante esta vendimia. Las diferencias entre los clones 717 y 474 son tales que no se expresan todos los años teniendo variabilidad con el año y donde el clima juega un rol fundamental.

Abstract. From the viewpoint of aroma, the Tannat is a neutral variety but it is capable of providing aromatic precursors that are of interest in the production of wines for ageing. The main aromatic precursors present are glycosidic compounds and carotenoids. The content of aromatic precursors of 8 commercial Tannat clones (ENTAV-INRA: 398, 399, 472, 474, 475, 717, 794 and 944) was studied during 3 consecutive harvests. Based on the results obtained, clones 717 and 474 were selected for their high and low performance in the production of glycosidic precursors. In the following vintage, the behaviour of glycosidic precursors (SPE-GC-MS) and carotenoids (HPLC-DAD) was studied in the selected clones during 4 stages of grape maturity, where 14 xanthophylls and 1 carotene were identified. Significant differences in carotenoid content were found between the two clones studied throughout the ripening period. While their degradation did not show significant differences. Jointly, 10 glycosidised norisoprenoids were identified in the grapes of the clones studied, but the content of these did not show significant differences between the clones during this harvest. The differences between clones 717 and 474 are such that they are not expressed every year, having variability with the year and where climate plays a fundamental role.

1 Introducción

Durante la década de 1990, Uruguay se orientó a la producción de vinos finos a partir de la variedad de uva *Vitis vinifera* cv Tannat. Para lo cual se importaron materiales certificados desde Francia, el clon 398 se convirtió en el más cultivado, aunque previamente no se habían realizado ensayos de campo ni estudios de sus atributos cualitativos en territorio uruguayo [1,2]. Posteriormente, gracias a la experiencia de los productores, el clon 717 fue ganando terreno.

Los estudios sobre los clones de vid buscan evaluar la adaptación, la producción y la presencia de una

composición aromática diferenciada, siendo la viabilidad de un clon en un lugar determinado altamente influenciada por el entorno y dependiendo del uso final de las uvas producidas [3]. En el caso de la variedad Tannat es una variedad neutra desde el punto de vista aromático pero capaz de aportar precursores de compuesto volátiles que son de interés en la elaboración de vinos de guarda. Los principales precursores aromáticos presentes son compuestos glicosidados y carotenoides.

*Corresponding author: lfarina@fq.edu.uy

El objetivo de este trabajo fue evaluar el contenido de precursores aromáticos glicosidados en uvas de la variedad Tannat durante 3 vendimias consecutivas. A partir de estos resultados se seleccionaron 2 clones (por baja y alta performance en la biosíntesis de precursores glicosidados) y durante una cuarta vendimia se evaluó durante todo el período de maduración la evolución de carotenoides y precursores glicosidados.

2 Materiales y métodos

2.1 Muestras

El viñedo utilizado se encuentra ubicado en la estación experimental INIA “Las Brujas” en el Departamento de Canelones situado al sur de Uruguay. Este viñedo fue plantado en el año 2002 con 8 Clones Franceses comerciales de Tannat ENTAV-INRA: 398, 399, 472, 474, 475, 717, 794 Y 944. El viñedo está conformado por 6 bloques de 8 parcelas en donde en cada una se encuentra uno de los 8 clones distribuidos aleatoriamente.

Se realizó el muestreo de clones de Tannat durante tres vendimias consecutivas (2016, 2017, 2018) donde se evaluó el contenido de precursores aromáticos. Durante el año 2020 se realizaron en el mismo viñedo los muestreos de los clones ENTAV-INRA 474 y 717. Los muestreos se realizaron en cuatro momentos específicos del desarrollo de las uvas: a 5 semanas de la floración (G), en envero (10 semanas de la floración) con bayas de color verde (VG), en envero (10 semanas de la floración) con bayas completamente moradas (VR) y en el momento de madurez enológica cuando habían pasado las 15 semanas de la floración (M) (Fig. 1). Se tomaron muestras por triplicado de cada clon en cada uno de los momentos de muestreo mencionados de acuerdo al protocolo de Da Silva et al [4].

El seguimiento de la maduración: se realizó mediante la medida de parámetros físico químicos clásicos (pH, acidez, alcohol probable, tamaño y peso promedio de granos). Una vez determinada la fecha óptima la uva cosechada se almacenó en el freezer hasta su análisis.

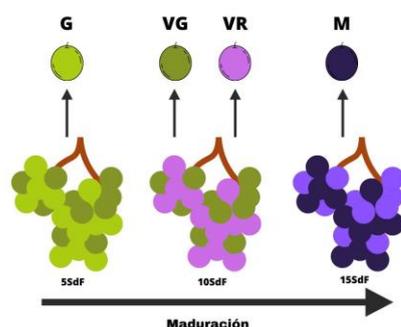


Figura 1. Diagrama que representa los momentos de toma de muestras de los clones 717 y 474 de Tannat. La muestra G se tomó a las 5 semanas luego de la floración, cuando las bayas se encontraban recién cuajadas. Las muestras VG (verdes) y VR (moradas) se tomaron a las 10 semanas luego de la floración, en el momento del envero. La muestra M se tomó a las 15 semanas después de la floración donde las bayas estaban en madurez enológica.

2.2 Análisis de precursores aromáticos

Los precursores aromáticos glicosidados de las bayas fueron extraídos mediante SPE y posteriormente se realizó la hidrólisis enzimática con la enzima poligalacturonasa donde el extracto obtenido se analizó por cromatografía gaseosa acoplada a masa (GC-MS) siguiendo las condiciones descritas por Fariña et al. [4]. Como estándar interno se utilizó nonil glucósido para cuantificar los componentes volátiles.

2.3 Análisis de carotenoides

Se realizó la extracción de carotenoides de las muestras mediante extracción líquido-líquido siguiendo el proceso descrito por Crupi, et al. [5]. Los extractos obtenidos fueron almacenados en el freezer protegidos de la luz UV hasta ser analizados.

Los carotenoides fueron identificados y cuantificados mediante HPLC-DAD de fase reversa. Se empleó para la separación una columna C30 (3 mm, 4,6 x 150 mm) (Dionex Bonded Silica Products - Thermo scientific). Para la cuantificación se utilizaron como estándar interno 8-apo-β- carotenal y se construyeron curvas de calibración de β-caroteno y luteína.

2.4 Análisis estadístico

A partir de los resultados de los componentes glicosidados obtenidos para los diferentes clones de la variedad de uva Tannat en los años 2016, 2017 y 2018, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la presencia de diferencias significativas entre los clones. Posteriormente, se procedió a ordenar los clones según su potencial aromático, utilizando el test de Fischer.

Por otra parte, se evaluaron los resultados de los carotenoides y los componentes glicosidados de los clones 717 y 474 mediante ANOVA, con el objetivo de determinar si las diferencias observadas entre clones y muestras eran estadísticamente significativas. Para llevar a cabo estos análisis, se utilizó el software Statistics [6] (Zaiontz et al., 2019). En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de $p \leq 0,05$.

3 Resultados y Discusión

3.1 Selección de clones con mayor y menor potencial aromático

Se analizaron 38 precursores glicosidados de compuestos volátiles los cuales fueron agrupados en 4 familias: terpenos, compuestos C6, compuestos fenólicos y norisoprenoides. Se analizó en conjunto los resultados de precursores aromáticos de las vendimias 2016, 2017 y 2018 de este análisis surgió la selección del clon 717 por su mayor contenido de precursores aromáticos, mientras que el clon 474 se seleccionó por su menor contenido de precursores aromáticos. Esta selección se realizó fundamentalmente en base al contenido de norisoprenoides glicosidados (Tabla 1) ya que estos

compuestos tienen un impacto fundamental en el aroma de los vinos con crianza (Tabla 2). En base a estos resultados se estudió durante la vendimia 2020 durante el período de madurez la evolución de carotenoides y precursores glicosidados en los clones 717 y 474.

Tabla 1. Norisoprenoides cuantificados y su índice de Kovatz (IK).

IK	Norisoprenoides
2418	3,4-Dihydro-3-oxoactinidol I
2458	3,4-Dihydro-3-oxoactinidol III
2479	3,4-Dihydro-3-oxoactinidol II
2537	3-Oxo- α -ionol
2651	3-Oxo-7,8-dihydroxy- α -ionol
2658	4-Oxo- β -ionol
2694	4-Oxo-7,8-dihydroxy- β -ionol
2726	7,8-Dihydrovomifoliol
3167	3-Hydroxy- β -damascenone
3181	Vomifoliol

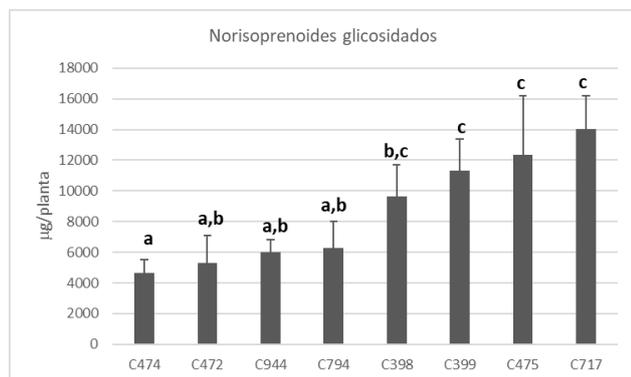


Figura 2. Norisoprenoides glicosidados en las vendimias 2016 a 2018.

3.2 Contenido de carotenoides en los clones 474 y 717

El clon 717 produjo un contenido significativamente superior respecto al clon 474 de β -caroteno y xantofilas incluida luteína ($p \leq 0,05$). Mientras que entre los distintos muestreos hubo una disminución significativa del contenido de β -caroteno y xantofilas (incluida luteína) ($p \leq 0,05$) para ambos clones. Las diferencias significativas fueron entre VG y VR así como entre VR y M. No así entre G y VG donde la disminución no fue significativa. Al alcanzar la madurez, ambos clones mostraron una disminución significativa del contenido de beta-caroteno y xantofilas siendo este muestreo (M) el que mostró la menor cantidad de carotenoides.

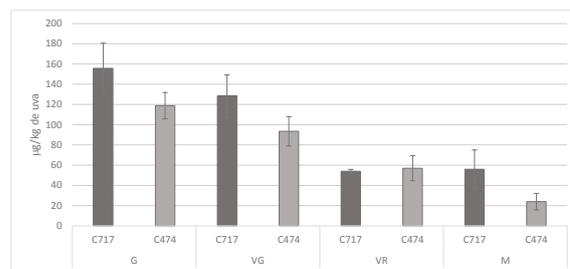


Figura 3. Contenido de la suma de xantofilas (neoxanthin, violaxanthin, 8R-auroxanthin, 8R-neochrome, lutein like structure, flavoxanthin, 8S-auroxanthin) sin luteína expresado en microgramos/kilo de uva, durante la vendimia 2020, en las cuatro fechas de muestreo.

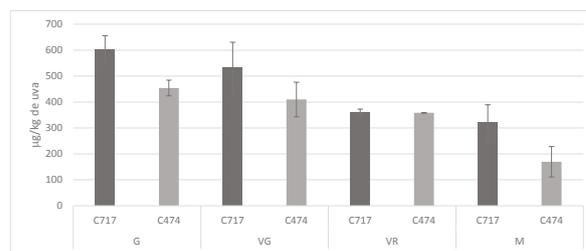


Figura 4. Contenido de luteína expresado en microgramos/kilo de uva, durante la vendimia 2020, en las cuatro fechas de muestreo.

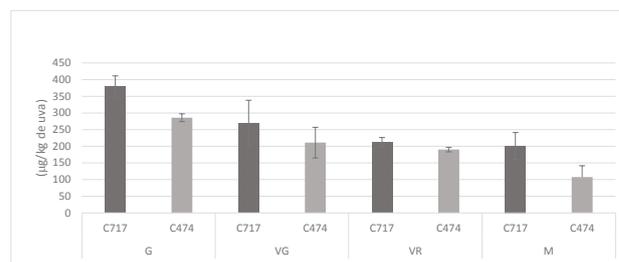


Figura 5. Contenido de β -caroteno expresado en microgramos/kilo de uva, durante la vendimia 2020, en las cuatro fechas de muestreo.

La Fig. 6 muestra la degradación de carotenoides entre los estadios G y M. A pesar de que lo observado en los gráficos 3, 4 y 5 existen diferencias significativas en el contenido de carotenoides entre los clones, la cantidad degradada fue la misma para ambos clones.

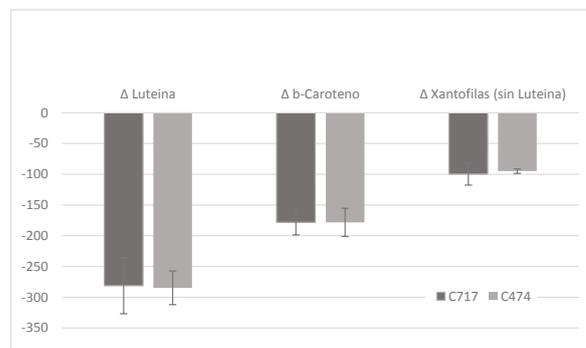


Figura 6. Variación de la concentración de carotenoides (xantofilas y β -caroteno) en el período de madurez (expresado en mg/kg).

3.3 Contenido de precursores aromáticos en los clones 474 y 717

En la Tabla 1 se muestran los 10 norisoprenoides analizados para este estudio, y en la Figura 7 se muestra como fue la evolución de la sumatoria de los mismos en los dos clones estudiados durante los 4 muestreos de la vendimia 2020.

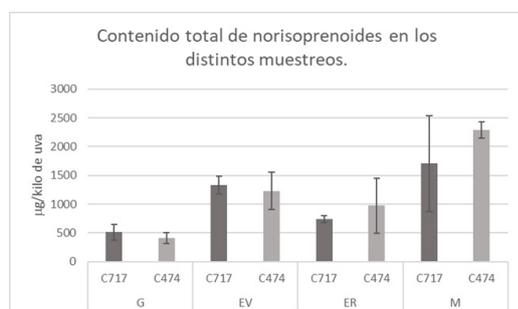


Figura 7. Contenido total de norisoprenoides en los distintos muestreos.

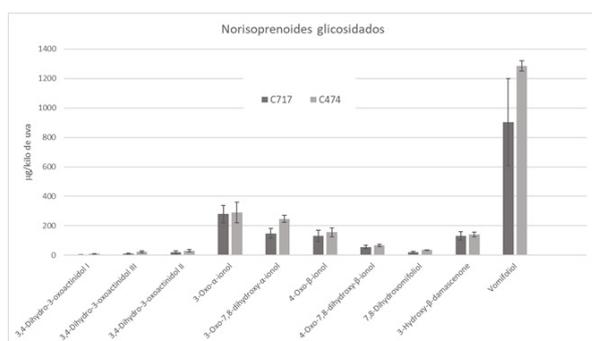


Figura 8. Contenido total de norisoprenoides en los clones 474 y 717 en la fecha de madurez durante el año 2020.

4 Conclusiones

Durante los muestreos realizados en los años 2016, 2017 y 2018 en los 8 clones ENTAV-INRA (398, 399, 472, 474, 475, 717, 794 y 944) de Tannat se observaron diferencias significativas en la biosíntesis de precursores glicosilados de norisoprenoides. Al realizar el análisis en forma anual en 2 de los años existieron diferencias significativas, mientras que en el tercer año se ven tendencias claras pero no significativas.

En base a los resultados del análisis de los tres años previamente estudiados se seleccionaron los clones 717 y 474 como mayor y menor producción (respectivamente) de norisoprenoides glicosilados.

Durante la vendimia 2020 se analizaron carotenoides en 4 estados de maduración de la uva de los clones 474 y 717 donde se lograron identificar 14 xantofilas y 1 caroteno. El clon 717 presentó un contenido significativamente superior de carotenoides y xantofilas respecto al clon 474. El contenido de carotenos y xantofilas disminuyó significativamente en ambos clones entre las muestras VG vs VR así como VR vs M.

Conjuntamente durante la vendimia 2020 se identificaron 10 norisoprenoides glicosilados en la uva de los dos clones franceses estudiados, pero el contenido de estos no presentó diferencias significativas entre los clones. En un análisis preliminar se determinó que la expresión de genes involucrados en la degradación de carotenoides no mostraban diferencias significativas entre ambos clones (datos no mostrados) y tampoco existieron diferencias en la insolación del viñedo por el diseño que tenía mismo. El clima anual y las distintas variables del mismo pueden matizar las diferencias existentes entre clones en el contenido de precursores glicosilados de norisoprenoides y hacer que no se expresen en forma anual.

Beca CAP finalización de Maestría Nicolas Nieto. Beca maestría ANII FCE_1_2017_1_136560. Proyecto FCE_1_2017_1_136560. Estudios metabólicos y transcriptómicos en *Vitis vinifera* cv. Tannat financiado por ANII.

References

- Disegna, E. Coniberti, A. Ferrari, V. Clones de Tannat. Revista del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), 2014, 109, 1-6
- Entav; INRA; Ensam; Onivins. Catalogue des varieties et clones de vigne cultivés en France. Ed: Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation. France 1995 (357 pp)
- Prévide, A. Oliveira, E. de Purgatto, F.M. de Medeiros Câmara, I. Peregrino, M. de Albuquerque R. da Mota. OENO One **56**(4), 117-124 (2022)
- C. Da Silva, G. Zamperin, A. Ferrarini, A. Minio, Dal Molin, L. Venturini, G. Buson, P. Tononi, C. Avanzato, E. Zago, E. Boido, E. Dellacassa, C. Gaggero, M. Pezzotti, F. Carrau, M. Delledonne, Plant Cell. **25**, 4777-4788 (2013)
- Fariña, L., Carrau, F., Boido, E., Disegna, E., Dellacassa, E. American Journal of Enology and Viticulture, 2010, **61**(4), 451-456