



Universitat
de les Illes Balears

TRABAJO FIN DE GRADO

COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE LA VARIEDAD CALLET A DIFERENTE DISPONIBILIDAD HÍDRICA Y EFECTO DE LAS LEVADURAS *SACCHAROMYCES* Y NO *SACCHAROMYCES* EN LA CALIDAD DEL VINO

Andrea Alorda Roca

**Grado de Biología
Facultad de Ciencias**

Año Académico 2020-21

COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE LA VARIEDAD CALLET A DISFERENTE DISPONIBILIDAD HÍDRICA Y EFECTO DE LAS LEVADURAS *SACCHAROMYCES* Y NO *SACCHAROMYCES* EN LA CALIDAD DEL VINO

Andrea Alorda Roca

Trabajo de Fin de Grado

Facultad de Biología

Universidad de las Illes Balears

Año Académico 2020-21

Palabras clave del trabajo:

vino, Callet, estrés hídrico, levadura, *Saccharomyces*

Nombre Tutor/Tutora del Trabajo: Rafael Montero Silvestre

Se autoriza la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio
Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea,
con fines exclusivamente académicos y de investigación

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Listado de abreviaturas y acrónimos

CR Tratamiento Callet con riego.

CS Tratamiento Callet sequía.

EAUi Eficiencia del uso del agua intrínseca.

FA Fermentación alcohólica.

FML Fermentación maloláctica.

IS Tratamiento con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* e inóculo de bacteria.

IM Tratamiento con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* e inóculo de bacteria.

IN tratamiento de fermentación espontánea con inóculo de bacteria.

M Tratamiento con *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*.

N Tratamiento de fermentación espontánea.

NFA Nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras.

LAI Índice de área foliar.

S Tratamiento con *Saccharomyces cerevisiae*.

Resumen

Los cada vez más evidentes efectos del cambio climático condicionan de manera importante la gestión de recursos y el desarrollo de los cultivos, así como la calidad del fruto obtenido. La viña es uno de los cultivos de mayor importancia económica y se encuentra altamente distribuido en todo el mundo. Las variedades autóctonas destacan por su gran capacidad de adaptación al clima propio de cada zona. El uso de variedades locales permite la diferenciación de los vinos en un mercado cada vez más competitivo, así como la obtención de nuevos perfiles aromáticos, haciéndolos más atractivos para el consumidor. Sin embargo, algunos efectos derivados del cambio climático hacen que en un clima mediterráneo incluso variedades adaptadas tengan limitaciones que pueden afectar a la calidad del producto final. El aumento de las temperaturas provocan maduraciones más rápidas, así como un descenso pronunciado de la acidez y aumento de pH, dando como resultado vinos con deficiente capacidad de guarda.

Ante esta situación, las variedades autóctonas se presentan como una gran apuesta dentro del marco vitivinícola futuro, aunque es necesario desarrollar estrategias tanto a nivel de manejo en el campo como a nivel enológico en bodega para obtener vinos que satisfagan al futuro consumidor y permitan una viticultura sostenible.

Con este fin se ha planteado un experimento en dos fases. En campo se ha evaluado la respuesta fisiológica y calidad del fruto de la variedad mallorquina Callet a diferente disponibilidad hídrica. Posteriormente se han establecido tres tratamientos de fermentación: inoculación con *Saccharomyces cerevisiae*, inoculación mixta de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*, y finalmente una fermentación espontánea, para evaluar su efecto sobre la calidad del vino tras la fermentación alcohólica. También se han comprobado los efectos de la inoculación de *Oenococcus oeni* sobre la fermentación maloláctica.

En los resultados obtenidos se observa que la variedad Callet soporta los efectos más restrictivos del déficit hídrico a nivel fisiológico. Ligeras diferencias en la bajada de fotosíntesis y el nitrógeno asimilable para la levadura implican que existen efectos a nivel de absorción de carbono y en el metabolismo del nitrógeno. Los diferentes tratamientos establecidos tanto en la fermentación alcohólica como en la fermentación maloláctica evidencian la capacidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su interacción con la bacteria *Oenococcus oeni* para generar vinos más equilibrados ante una futura perspectiva de cambio climático por la estabilidad que ofrece en los procesos fermentativos.

INDICE

Listado abreviaturas y acrónimos.....	I
Resumen.....	II
Indice.....	III
1. Introducción	1
1.1. La viticultura en la región mediterránea	1
1.2. El clima y la vid.....	2
1.3. Efectos del cambio climático sobre la viña	2
1.4. Tendencias del mercado	3
1.5. Procesos fermentativos	4
1.6. Estrategias de gestión enológica.....	6
2. Objetivos.....	6
3. Material y métodos.....	7
3.1. Localización y material vegetal.....	7
3.2. Evaluación de parámetros fisiológicos y calidad del fruto	8
3.2.1. Diseño experimental.....	8
3.2.2. Humedad del suelo.....	8
3.2.3. Estado hídrico de las plantas.....	8
3.2.4. Intercambio de gases y eficiencia en el uso del agua	9
3.2.5. Crecimiento	9
3.2.6. Clorofila	9
3.2.7. Calidad del fruto	10
3.3. Evaluación de la calidad del vino.....	10
3.3.1. Fermentación alcohólica (FA).....	11
3.3.2. Fermentación malo-láctica (FML)	13
3.4. Análisis estadístico	14
4. Resultados.....	14
4.1. Evaluación de parámetros fisiológicos y calidad del fruto	14
4.2. Evaluación de la calidad del vino.....	16
4.2.1 Fermentación alcohólica.....	16
4.2.2. Fermentación maloláctica.....	17
5. Discusión	19
6. Conclusiones	21
7. Bibliografía.....	22

1. Introducción

1.1. La viticultura en la región mediterránea

Según la FAO, en España (2019) se dedicaron 936.890 ha al cultivo de la vid obteniéndose más de 44 millones de hl de vino ese año, siendo nuestro país es el mayor exportador de vino del mundo (2019 Statistical Report on World Vitiviniculture, OIV). La viticultura se localiza principalmente en zonas semiáridas (Flexas *et al.*, 2010; Medrano *et al.*, 2015), donde el déficit hídrico del suelo es la principal limitación ambiental (Cifre *et al.*, 2005, Chaves *et al.*, 2007). En estas regiones, los meses más secos del año coinciden con la fase de mayor crecimiento vegetal y producción del fruto. Por ello, resulta conveniente la aplicación de un riego moderado, aunque ello implica un importante consumo de agua que en ocasiones genera conflicto con la disponibilidad de esta.

En las Baleares, el 38% de los viñedos está compuesto por variedades autóctonas (**Tabla 1**), de las cuales Callet destaca como una de las variedades más utilizadas (Bota, 2012). Se trata de una variedad originaria y exclusiva de las islas (Marsal *et al.*, 2017), de alto rendimiento y que produce vinos de baja graduación alcohólica, baja concentración fenólica y con un aroma y sabor con fuerte personalidad.

Las variedades autóctonas están fuertemente relacionadas con el terruño vitivinícola y la “tipicidad” de la vid. La estrategia para el mejoramiento de variedades locales debe incluir la caracterización de su comportamiento ecofisiológico y perfil de maduración como base para optimizar las técnicas de cultivo, el momento de la vendimia y el potencial cualitativo de la uva (Failla *et al.*, 2007).

Tabla 1. Lista de variedades autóctonas de Mallorca

Variedades tintas	Variedades blancas
Manto negro	Prensal o moll
Gorgollassa	Giró ros
Fogoneu	Malvasía
Callet	

Aunque la producción vitícola balear ocupa menos del 1% de las tierras de cultivo, esta representa el 15% del PIB agroalimentario. La viña ha resultado ser el cultivo de

secano más rentable en las islas y cada año se plantan nuevos viñedos y aparecen nuevas bodegas (Estadísticas IGPs, Ministerio de Agricultura y Medio Rural y Marino).

1.2. El clima y la vid

Los factores climáticos como la temperatura, precipitación y radiación solar influyen en el rendimiento del viñedo y, como consecuencia, en la composición química de la uva (Kenny y Harrison 1992; Jones *et al.*, 2005). El agua es un factor limitante para la vid y su uso está limitado por las características hídricas del territorio. A todo esto, debemos añadir una previsión de cambio climático que augura un clima más seco y cálido en las próximas décadas (Moreno, 2014), con un aumento en la frecuencia de las sequías (Sheffield y Wood, 2008) y una mayor imprevisibilidad de las precipitaciones.

En relación con la temperatura, la vid es una planta sensible a las heladas y que necesita calor para su desarrollo y correcta maduración de los frutos. La temperatura media óptima para el correcto desarrollo está entre los 11 y 18°C, aunque puede resistir temperaturas de hasta 40°C de forma puntual. La temperatura es un factor determinante en la maduración de la uva, afectando a la concentración de los azúcares, ácidos, polifenoles y otras sustancias que más tarde le otorgarán las características aromáticas al vino (Kliewer y Lider, 1970). Cabe destacar la gran importancia de las diferencias de temperatura día/noche en la época de vendimia, puesto que tienen grandes efectos sobre a la síntesis de polifenoles (Kliewer, 1973).

Referente a las necesidades hídricas, la vid es un cultivo que está muy adaptado a condiciones de sequía, con unas necesidades hídricas muy bajas (400mm/año) y con un máximo de requerimientos durante el desarrollo del fruto. En esta etapa, el agua se convierte en un factor limitante puesto que coincide con el periodo estival, generalmente seco.

1.3. Efectos del cambio climático sobre la viña

Considerando la influencia general del aumento de temperatura, esta provoca una mayor concentración de azúcar, un pH más elevado y una disminución de acidez en los mostos (Mira de Orduña, 2010; Mozell y Thach, 2014). Todo ello se suma a los cambios en la fenología y maduración de la vid, viéndose estos periodos adelantados (Chuine *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2005a; Mira de Orduña, 2010; Dalla Marta *et al.*, 2010; Daux *et al.*, 2011). Estos cambios afectan a las regiones vitícolas, perjudicando a las

zonas cálidas como la región mediterránea en la que se producirá una rápida maduración (Jones *et al.*, 2005) con una pérdida notable de la calidad del vino (Webb *et al.* 2008).

En el envero, momento en el que las bayas crecen en tamaño, toman color violáceo y empieza su maduración, el metabolismo de la planta inicia una movilización de los azúcares acumulados en el tronco y las raíces que se dirigen hacia los racimos y sarmientos. En la baya se acumulan glucosa y fructosa, aunque la proporción de estas depende de muchos factores. Durante esta etapa, el calor induce una degradación respiratoria de los ácidos málico y tartárico (**Figura 1**).

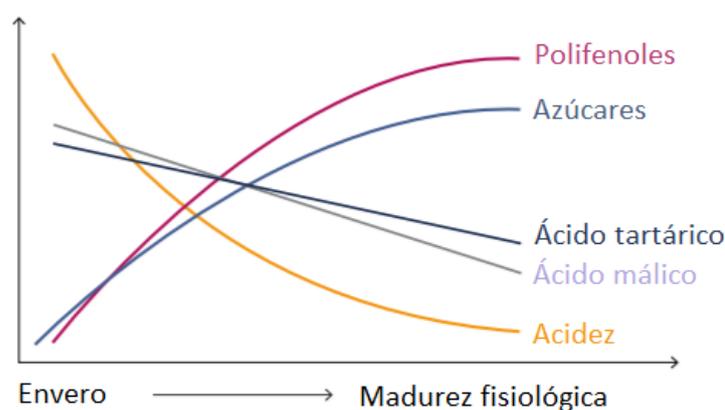


Figura 1. Gráfica que muestra los procesos metabólicos que se llevan a cabo en la uva durante su maduración.

El incremento de la temperatura agrava problemas durante la vendimia como la mayor proliferación de microorganismos no deseados y un aumento de las reacciones biológicas que dan lugar a una menor calidad de la uva con posibles paradas durante la fermentación (Martínez, 2016). Esta probabilidad aumentada de estancamiento durante la fermentación alcohólica se debe al mayor contenido de azúcar que afecta de manera directa a la concentración de etanol que, finalmente, provoca un estrés osmótico y toxicidad sobre las levaduras. El resultado es un vino con mayor concentración de alcohol y menor acidez. Estos cambios en los parámetros químicos de la uva provocan cambios en el color, sabor y aromas del vino final (Drappier *et al.*, 2019).

1.4. Tendencias del mercado

Según señala Rodríguez *et al.* (2016), el vino es la segunda bebida alcohólica más consumida en España, por detrás de la cerveza. Diversos estudios señalan la importancia para el consumidor del equilibrio adecuado entre acidez, dulzura y astringencia (Francis *et al.*, 2010, Lattey *et al.*, 2010). Estas propiedades se complementan con características

aromáticas, donde los sabores afrutados, florales y de roble son altamente apreciados (Sena-Esteves *et al.*, 2018).

Debido a los cambios de preferencias de los consumidores y los efectos de cambio climático, en los últimos años han aparecido nuevas tendencias en las prácticas enológicas en busca de vinos menos alcohólicos y aromas más afrutados, pero también con un buen equilibrio en cuanto a acidez y sensación en boca (Vilela, 2019).

1.5. Procesos fermentativos

En esencia, el vino es el resultado de la fermentación de los azúcares presentes en el mosto de las uvas. La fermentación alcohólica (FA) es el procedimiento por el que las levaduras transforman el azúcar en alcohol, principalmente etanol, y dióxido de carbono. La utilización de glucosa comienza de inmediato y es un poco más rápida, de modo que la proporción de fructosa aumenta a medida que avanza la fermentación (Fleet, 1998). Por ello, las condiciones en las que se lleve a cabo la fermentación es uno de los factores más importantes en la elaboración del vino.

La levadura más utilizada en la elaboración de vino es *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene una alta eficiencia convirtiendo azúcares en alcohol y puede tolerar las elevadas concentraciones de etanol que se producen. En una fermentación natural son las levaduras presentes en la piel de la uva quienes arrancan la reacción de manera espontánea, pero inevitablemente será *Saccharomyces cerevisiae* quien metabolice los azúcares en presencia de los elevados niveles de alcohol presentes al final del proceso (**Figura 2**).

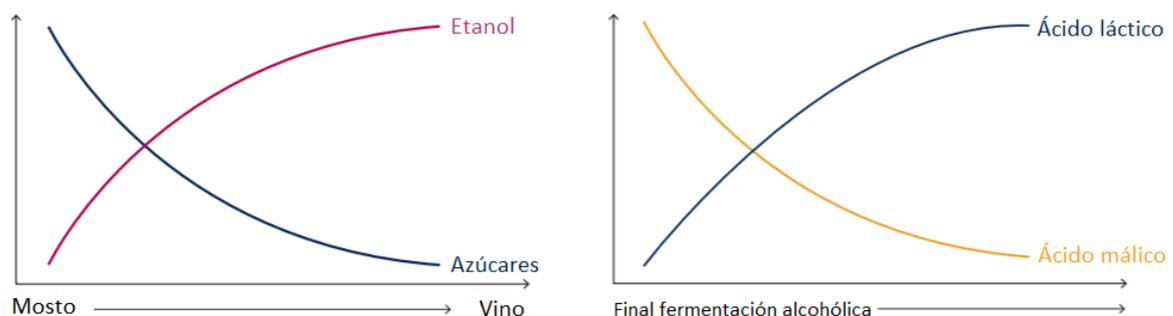


Figura 2. Gráfica que muestra los cambios químicos ocurridos durante la FA. Se produce una degradación de los azúcares a la vez que se produce etanol. Durante la FML se degrada ácido málico que se convierte en ácido láctico.

La selección de las diferentes especies de levaduras implicadas en la fermentación es muy importante ya que éstas juegan un papel relevante en los aromas y complejidad del vino.

Dentro de las levaduras no *Saccharomyces* destaca *Torulaspóra delbrueckii*, la cual podemos encontrar en hábitats silvestres coexistiendo con otras levaduras fermentativas. Se utiliza habitualmente en la industria vinícola por ser muy parecida a *S. cerevisiae* a nivel fermentativo, aunque con menor vigor y tasa de crecimiento que esta, siendo normalmente desplazada por *S. cerevisiae*. La inoculación de *T. delbrueckii* puede mejorar algunos parámetros del vino como disminuir la acidez volátil (Bely *et al.*, 2008) o mejorar el perfil aromático del vino (Herraiz *et al.*, 1990, Ciani y Maccarelli, 1998). En general, esta levadura incrementa la complejidad aromática con aromas a fruta confitada.

Respecto a las levaduras autóctonas o indígenas, que son las que iniciarán una fermentación espontánea en el mosto, estas se encuentran de manera natural en los hollejos de la uva. Se trata de una fermentación en la que participan gran cantidad de levaduras, que van desarrollándose secuencialmente hasta que a partir de valores elevados del contenido alcohólico, *Saccharomyces cerevisiae* se impone, dominando la fermentación hasta el final de esta. Esta secuencia de levaduras que actúan durante la fermentación depende de las condiciones climáticas de la añada y confiere al vino unas características únicas con identidad geográfica.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica algunos vinos pasan por una segunda fermentación conocida como fermentación maloláctica (FML). Esta es llevada a cabo por bacterias lácticas presentes en el vino que metabolizan ácido láctico y lo transforman en ácido acético, otorgando al vino mayor suavidad y complejidad aromática añadida (**Figura 2**). De las bacterias lácticas conocidas, *Oenococcus oeni* es la más relevante en las prácticas enológicas. Se trata de una bacteria muy tolerante a pH bajos y contenidos de etanol superiores al 10% que habitualmente se utiliza para mejorar las propiedades organolépticas y la estabilidad microbiológica de los vinos.

Para evitar la presencia de microorganismos que puedan estropear el vino generalmente se emplea metabisulfito potásico como antioxidante y antiséptico. Este previene la oxidación que afecta al aroma, sabor y color del vino y además ayuda a fijar el color y extraer aromas durante la maceración de los hollejos. Se trata de un compuesto muy reactivo, formando con otras sustancias lo que se conoce como sulfuroso combinado. La parte que no combina con otros elementos químicos se denomina sulfuroso libre y es tóxico en concentraciones muy altas. Por ello, es necesario vigilar las concentraciones de

anhídrido sulfuroso (SO₂) de los vinos resultantes, que por normativa de la Comisión Europea no puede superar los 150 mg/l en los vinos tintos (Reglamento CE 606/2009).

1.6. Estrategias de gestión enológica

Frente a los cambios producidos por el aumento de temperatura, las estrategias de adaptación se enfocan principalmente en cambios en las prácticas de manejo en campo (como el riego o la selección de variedades mejor adaptadas) y cambios en las prácticas enológicas mediante el uso de microorganismos específicos en la fermentación.

Para la producción del vino tinto, el déficit hídrico en etapas específicas del desarrollo de la uva favorece la calidad del vino, ya que reducen el tamaño de la baya y aumentan la composición fenólica del hollejo (Ojeda *et al.*, 2002; Triolo *et al.*, 2019). Recientemente se ha visto que el déficit hídrico en las viñas durante la fase final del desarrollo influye positivamente en la expresión aromática de los vinos (Martínez, 2016).

Por otro lado, el uso de levaduras no *Saccharomyces* pueden ayudar a resolver problemas enológicos específicos como la reducción de la acidez volátil (Benito *et al.*, 2019; Padilla *et al.*, 2016), modular los aromas (Padilla *et al.*, 2016; Escribano-Viana *et al.*, 2018) o ejercer como control biológico para evitar microorganismos no deseados (Berbegal *et al.*, 2018; Kuchen *et al.*, 2019). Estas especies poseen unas propiedades fisiológicas muy interesantes para el proceso de vinificación, como su capacidad fermentativa a bajas temperaturas dando como resultado vinos con etanol reducido cuando se usan junto a *S. cerevisiae* en cultivos secuenciales (Morales *et al.*, 2015; Shekhawat *et al.*, 2016). Por ello, se pueden utilizar fermentaciones mixtas utilizando levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* para mejorar la complejidad del vino y realzar las características particulares de la uva (Contreras *et al.*, 2014; Ciani *et al.*, 2016; Rossouw y Bauer, 2016; Alonso-del-Real *et al.*, 2017; Capozzi *et al.*, 2019). Esta última estrategia es especialmente adecuada para la elaboración de vinos en regiones cálidas, donde el nivel medio de alcohol ha aumentado alrededor de un 2% (v/v) en las últimas décadas (Varela *et al.*, 2015).

2. Objetivos

Objetivo general: estudiar el comportamiento agronómico de variedades locales de viña de Mallorca ante diferente disponibilidad hídrica, determinando sus efectos sobre la calidad de la uva, así como establecer posibles estrategias para satisfacer las demandas del mercado en cuanto a la calidad del vino.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la capacidad adaptativa de *Vitis vinifera* L. cv. Callet a las condiciones mediterráneas en un contexto de cambio climático.
2. Evaluar los efectos del estrés hídrico sobre la calidad de la uva.
3. Analizar la influencia de las levaduras no-*Saccharomyces* sobre el proceso fermentativo y la calidad del vino.
4. Comprobar los efectos de la inoculación de bacterias lácticas sobre la calidad del producto final.

3. Material y métodos

3.1. Localización y material vegetal

El experimento se llevó a cabo en la Finca Son Juliana (Carretera Santa María – Sencelles KM 7.2 07142 Santa Eugenia, Mallorca). La finca cuenta con 7 ha de viña en regadío con 9 variedades diferentes, 5 internacionales (Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon, Chardonnay y Moscatell) y 4 locales (Manto negro, Callet, Giró Ros y Prensal). El portainjerto en todos los casos es el 110-R y el marco de plantación es de 2,10m x 1,40m.

El suelo de la finca es un suelo típicamente mallorquín, se trata de un suelo básico (pH=8,5) pobre en materia orgánica y bajo contenido en fósforo. En general es un suelo franco-arcilloso con proporciones: 28,9% arcilla, 19,3% arena, 13,9% limo grande y 37,7% limo fino.

El clima de la zona se clasifica como mediterráneo suave, con veranos calurosos y secos e inviernos cortos. La precipitación media anual ronda los 450 mm, aunque los eventos torrenciales son cada vez más habituales, concentrándose las lluvias en periodos muy concretos durante la campaña.

Callet fue la variedad seleccionada para el experimento, ya que se trata de una planta autóctona, adaptada a las condiciones climáticas de la zona (Bota *et al.*, 2001). Se evaluaron su comportamiento en campo desde el punto de vista de la fisiología de la planta y calidad de fruto frente a la sequía. Posteriormente se estudió el efecto de diferentes levaduras sobre la calidad del mosto y el vino elaborado de la variedad seleccionada.

3.2. Evaluación de parámetros fisiológicos y calidad del fruto

3.2.1. Diseño experimental

La primera parte del experimento se llevó a cabo íntegramente en el campo con el objetivo de evaluar los efectos del riego deficitario controlado en la fisiología de la planta y la calidad de su fruto.

Las plantas utilizadas en el experimento se seleccionaron durante el periodo de brotación, eligiendo tanto para el tratamiento de riego como para el de sequía, plantas con un vigor uniforme para evitar diferencias previas antes del inicio del experimento. Seis plantas de callet por tratamiento se marcaron con una cinta. Las plantas seleccionadas de ambos tratamientos se regaron acorde a los riegos establecidos de manera rutinaria por la finca hasta el inicio del experimento a mediados de mayo (entre un 30-50% de la evapotranspiración potencial en base a los últimos 5 años), momento a partir del cual se dejó de regar en el tratamiento de sequía y por tanto únicamente contaba en este caso con el agua procedente de las posibles lluvias durante el resto de campaña.

Una vez establecidos los tratamientos e iniciado el experimento se comenzaron a tomar diferentes medidas cada dos semanas haciendo coincidir con los diferentes estadios fenológicos del cultivo. Entre estas medidas se encuentran la disponibilidad de agua en el suelo midiendo la humedad, el estado hídrico de la planta, eficiencia en el uso del agua, crecimiento y clorofilas. Además se realizó el control de maduración en las semanas anteriores a la vendimia así como parámetros de calidad de fruto.

3.2.2. Humedad del suelo

Para obtener valores de la disponibilidad hídrica del suelo se midió la humedad del suelo con una sonda (HH2 Moisture Meter-Delta -T devices) cada 15 días desde el inicio del experimento hasta el momento de vendimia. Se anotó la humedad del suelo marcada por cada uno de los seis sensores a 100, 200, 300, 400, 600 y 1000 mm de profundidad en unidades de %vol.

3.2.3. Estado hídrico de las plantas

Para obtener el estado hídrico de la planta y por tanto poder establecer los diferentes tratamientos, se midió el potencial hídrico de tallo (Ψ_t) y la conductancia estomática (g_s). El potencial hídrico se midió en tres momentos durante el ciclo de maduración del fruto (tamaño guisante, envero y maduración) y la conductancia estomática

cada 15 días desde el inicio del experimento. La medida del potencial hídrico se tomó en hojas sometidas a oscuridad tras 1h en bolsas de papel de aluminio al medio día. Se midió una hoja por planta y tratamiento, la misma que fue utilizada para medir la conductancia, mediante la cámara de presión descrita por Scholander *et al.*, (1965) (PMS 1000, PMS Instrument Company, EAU). Cuanto más alto es el valor, mayor es el estrés hídrico que sufre la planta, donde un valor de -0,81 MPa indica que la planta sufre estrés hídrico (Gálvez *et al.*, 2011).

La conductancia estomática de las hojas se midió entre las 10h y las 12h con un porómetro (Leaf Porometer SC-1, Decagon Devices, Inc., USA). De la misma manera que en el caso del potencial hídrico se midió una hoja por planta y tratamiento, siempre hojas sanas, bien desarrolladas y expuesta a la radiación solar directa.

3.2.4. Intercambio de gases y eficiencia en el uso del agua

En los mismos tres momentos del ciclo de maduración del fruto en los que se midió el potencial hídrico también se midió la fotosíntesis, conductancia y transpiración con un medidor de intercambio de gases (LI-6400XT Portable Photosynthesis System). Se seleccionaron hojas bien formadas y con exposición directa a la radiación solar al medio día. Una vez obtenidos las mediciones se calculó la eficiencia del uso del agua intrínseca (EAU_i), dividiendo la fotosíntesis y la conductancia.

3.2.5. Crecimiento

La cobertura del dosel se midió con la App para IOS "Vitianopy" (De Bei *et al.*, 2016). Para ello se tomaron dos fotografías de la cobertura vegetal con una tablet o móvil y la aplicación calcula las unidades de LAI (m² de hoja/m² de suelo).

El crecimiento de la planta se evaluó tomando dos medidas del diámetro del tronco a la misma altura (a 25 cm desde el suelo) con un pie de rey digital.

3.2.6. Clorofila

Se utilizó un medidor de clorofila (SPAD 502 plus, Minolta Camera Co., Ltd, Japón) en dos hojas de cada planta, ambas hojas adultas que reciban radiación solar directa.

3.2.7. Calidad del fruto

Cuatro semanas antes de la vendimia se comenzó un seguimiento de la maduración de los frutos para estimar la fecha óptima para la vendimia (que se llevó a cabo el 8 de septiembre). Cada siete días se evaluó:

- El peso de 30 uvas con una balanza digital para establecer una relación de peso entre las diferentes plantas y el % de envero haciendo un porcentaje de las uvas que tenían color rojizo sobre el total de uvas;
- Tras el prensado manual de las uvas de cada planta se evaluó la concentración de azúcares solubles con un refractómetro (en grados Brix^o) , colocando en este una única gota del mosto obtenido. A continuación, se midieron el pH y la concentración de ácido tartárico (g/L) mediante una valoración potenciométrica con NaOH 0,33M (Volmer *et al.*, 2017) y un pH metro.

Finalmente se midió la cantidad de nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (NFA) mediante un test enzimático con el analizador OenoFossTM (Minnaar *et al.*, 2017).

En el momento de la cosecha, durante la primera semana de septiembre, se evaluó la producción de cada planta en número de racimos, número de sarmientos y peso de 50 bayas. Para ello se contaron el número de racimos producidos por cada individuo, así como los sarmientos. Se recogieron 50 bayas de cada planta y se pesaron en una báscula digital para poder comparar los valores de producción de cada individuo y tratamiento.

3.3. Evaluación de la calidad del vino

Con el objetivo de acercarse lo máximo a una situación realista de lo que ocurre en el campo y establecer unas condiciones comunes para definir los diferentes tratamientos del experimento realizado en bodega, se unificó la muestra de partida juntando la producción obtenida en ambos tratamientos y no se realizaron correcciones de la acidez ni parámetros nutritivos. Únicamente se estableció un nivel base de sulfuroso para la protección del mosto resultante ante posibles oxidaciones. Dicho nivel fue lo suficientemente bajo para permitir el desarrollo microbiológico en los diferentes tratamientos.

Por tanto, a partir de un único conjunto de muestras de uva Callet se realizaron microvinificaciones en el laboratorio de la Universitat de les Illes Balears para evitar cualquier posible contaminación con otras levaduras que pudieran quedar en los instrumentos de la bodega (**Figura 3**).

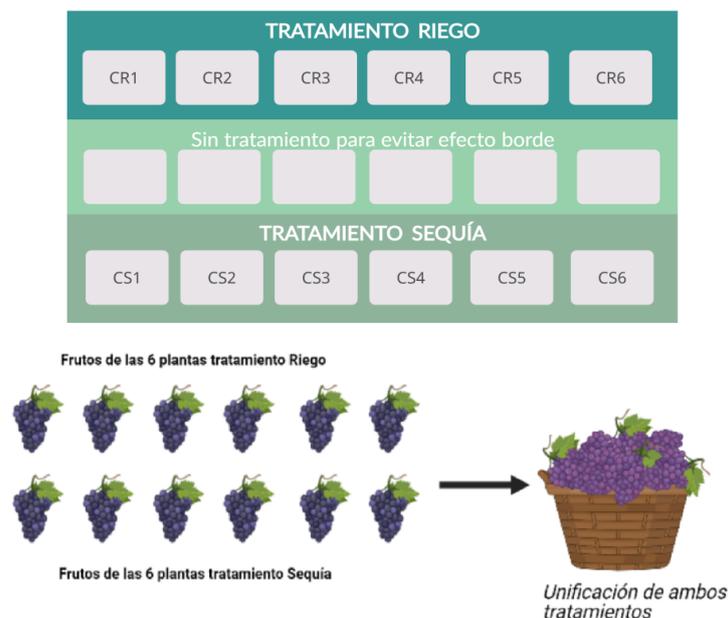


Figura 3. Esquema del diseño estadístico utilizado en la primera parte del experimento. Se seleccionaron 6 plantas tanto para el tratamiento de riego (CR) y como el de sequía (CS).

Para las microvinificaciones se procedió al desgranado de las uvas y su posterior prensado de manera manual. La pasta obtenida de la unión de todas las réplicas de ambos tratamientos, se guardó en 12 depósitos de vidrio con capacidad de 2,6L y se añadieron 50 mg de metabisulfito potásico (Laffort) por kg de pasta. En el interior de los depósitos se colocaron rejillas para asegurar el contacto del hollejo con la parte líquida y la tapa de estos constaba de válvulas para permitir la salida del CO₂ a la vez que evitar la entrada de oxígeno. Los depósitos se mantuvieron a temperatura ambiente (alrededor de 22°C) en todo momento.

A continuación, se llevó a cabo la fermentación alcohólica con tres tratamientos de levaduras y se tomaron muestras del mosto en varios estadios del proceso fermentativo, que duró alrededor de 14 días.

3.3.1. Fermentación alcohólica (FA)

En esta parte del proceso el diseño experimental constó de 3 tratamientos con 4 réplicas (**Figura 4**). El mosto se inoculó, según tratamiento, bien con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (tratamiento S), bien con una mezcla de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* (tratamiento M) o bien sin inoculación de levaduras para permitir una fermentación espontánea (tratamiento N).

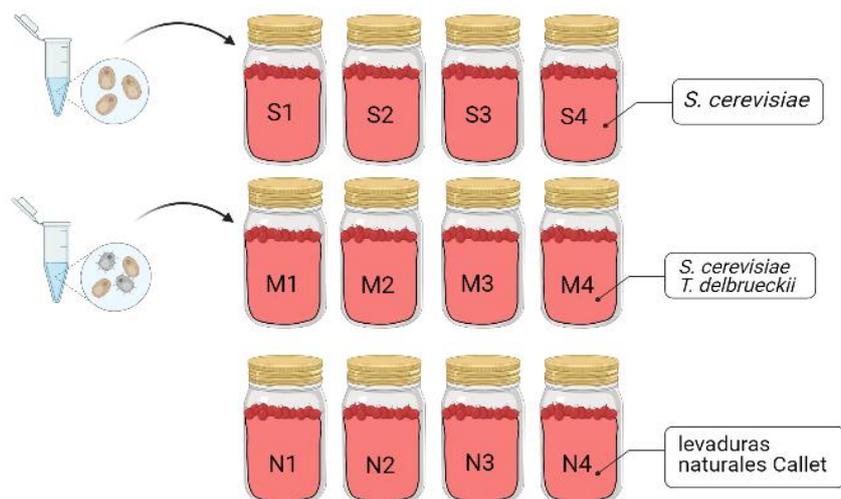


Figura 4. Esquema de las réplicas obtenidas para los tres tratamientos de fermentación alcohólica.

Para el tratamiento S se inocularon 25g/hL de Zymaflore[®] RB2 (Laffort) acorde con las instrucciones del fabricante, mientras que para el tratamiento M se inocularon 30g/hL de Zymaflore[®] Alpha (Laffort) ese mismo día y 20g/hL de Zymaflore[®] RB2 a las 24 horas.

Llegando al final del proceso fermentativo se tomaron medidas de concentración de azúcares residuales en días alternos. Para ello se utilizó un kit de determinación de azúcares según el método del Dr. Rebelein (C. Schliessmann Kellerei-Chemie GmbH & Co.KG).

Tras 14 días de fermentación (16 días para el tratamiento N) se procede al descube y filtrado del vino, se le añaden 60 mg metabisulfito potásico por L, se embotella y se cierran con parafilm a la espera de que la parte sólida sedimente.

Se tomaron muestras y se enviaron al laboratorio Tenim tot per al Vi S.L.U. (Av. Jaume III,21 07320 Santa María del Camí), dónde se analizaron con el espectrofotómetro OenoFoss[™] (Minnaar *et al.*, 2017) la concentración de glucosa+fructosa, ácido L-láctico, ácido málico y ácido volátil (en g/L), etanol (%Vol), pH y densidad (g/ml). También se midió la absorbancia a 420, 520 y 620 nm y se calculó la intensidad colorante de las muestras mediante la suma de estas:

$$I.C. = A_{420\text{ nm}} + A_{520\text{ nm}} + A_{620\text{ nm}}$$

Pasados cinco días el vino se decanta obteniéndose 2 botellas por réplica destinadas a la inoculación de bacterias lácticas. Al finalizar esta primera fermentación se analizó el vino obtenido y se procedió a inocular la mitad de las muestras con bacterias lácticas para inducir una fermentación maloláctica.

3.3.2. Fermentación malo-láctica (FML)

En esta fase del experimento se vuelven a dividir las muestras con el objetivo de simplificar los muestreos. Una de las réplicas de cada tratamiento se inoculó con bacterias lácticas para iniciar la fermentación maloláctica de manera controlada dando lugar a tres tratamientos diferentes (tratamiento con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* e inóculo de bacteria láctica (IS), tratamiento con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* e inóculo de bacteria láctica (IM) y finalmente tratamiento de fermentación espontánea con inóculo de bacteria láctica (IN)), mientras que la otra réplica se mantuvo en las mismas condiciones pero no se inoculó (S, M y N correspondiente a la nomenclatura del apartado anterior) (**Figura 5**).

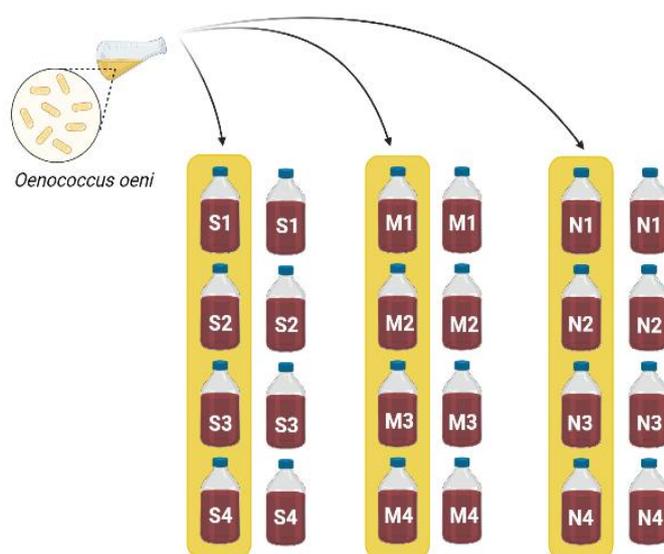


Figura 5. Esquema de las réplicas utilizadas para la fermentación maloláctica.

Se inocularon 0,01g de *Oenococcus oeni* por L de vino a 20°C, tal y como se indica en las instrucciones del fabricante, a la mitad de las botellas de cada tratamiento. Se dejó fermentar a temperatura ambiente (20°C) durante 7 días. Pasados esos 7 días realizamos una cromatografía maloláctica de la marca GAB para evaluar dicho proceso de manera cualitativa. El resultado indicó que la fermentación no se había completado, por lo que se repitió la prueba una semana más tarde. Una vez terminada la FML se evaluó el contenido de ácido tartárico y L-málico con un test enzimático de la marca Megazyme Ltd. y se

añadieron 20mg/L de metabisulfito potásico. Por último, se midieron de nuevo el pH, la acidez total, la concentración de ácido láctico y el contenido de glucosa con el espectrofotómetro OenoFoss™.

3.4. Análisis estadístico

Los valores obtenidos en el campo (cobertura del dosel, humedad del suelo, producción, potencial hídrico foliar, conductancia estomática, fotosíntesis, crecimiento en diámetro y NFA) se analizaron con T Student para muestras no pareadas con Excel. En todos los casos un valor de $p < 0.05$ fue utilizado como criterio estadístico para revelar diferencias significativas.

Para evaluar el efecto de los tratamientos en el mosto y el vino se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. En todos los casos un valor de $p < 0.05$ fue utilizado como criterio estadístico para revelar diferencias significativas. Los procedimientos estadísticos fueron realizados por medio del software RStudio para Windows versión 4.0.2 (2020).

4. Resultados

4.1. Evaluación de parámetros fisiológicos y calidad del fruto

En los parámetros fisiológicos que se muestran a continuación se observan los resultados referentes al punto medido más próximo a vendimia, en el cual sí que observaron diferencias entre los tratamientos de riego (CR) y sequía (CS).

Los resultados muestran que los tratamientos de riego y sequía se establecieron correctamente, mostrándose diferencias en la humedad del suelo captada por las sondas 600mm considerada como nivel representativo del contenido de humedad del suelo (CR (% vol. agua)= $18,56 \pm 5,50$; CS (% vol. agua)= $10,50 \pm 1,61$ (P valor=0.07)), aunque dichas diferencias no fueron significativas, pero el potencial hídrico de la hoja que sí mostró valores de estrés moderado en las plantas de sequía y un buen estatus hídrico en las plantas con riego, mostrando diferencia significativas (CR (ψ_t (Mpa))= $-0,65 \pm 0,03$; CS (ψ_t (MPa))= $-1,04 \pm 0,04$) (Girona *et al.*, 2006). No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas. Aunque no hubo diferencias en la conductancia sí que se observó un descenso significativo en la fotosíntesis en el tratamiento de sequía. Los resultados mencionados no dieron lugar a una diferencia significativa en la eficiencia en el uso del agua (EUAi), pero en el tratamiento de sequía fue ligeramente superior. En el

contenido en clorofila (SPAD) no se produjeron cambios significativos debido al tratamiento de sequía (**Tabla 2**).

Tabla 2. Índice de área foliar (LAI), contenido relativo en clorofilas (SPAD), fotosíntesis, conductancia en estomática y eficiencia en el uso del agua intrínseca (EUAi) en la variedad Callet para los tratamientos de riego (CR) y sequía (CS). Se utilizaron 6 réplicas por tratamiento. Nivel de significancia $P < 0.05$. Los códigos de significancia que se indican son: ***= 0,001 **= 0.01 y *= 0.05, siendo ns el código establecido para valores no significativos.

Tratamiento	LAI	SPAD	Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)	Conductancia ($\text{mmol CO}_2/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)	EUAi
CR	1,886 \pm 0,37	45,941 \pm 3,41	15,51 \pm 1,05	210,11 \pm 10,15	73,53 \pm 2,61
CS	1,669 \pm 0,59	43,333 \pm 4,80	12,39 \pm 1,11	160,21 \pm 20,20	75,63 \pm 4,09
Significancia	ns	ns	*	ns	ns

Durante el seguimiento de la maduración (**Figura 6**), la evolución de azúcares solubles y acidez en el fruto no mostraron diferencias significativas entre tratamientos. Por tanto el déficit hídrico aplicado no produjo cambios en la evolución de la acumulación de azúcares como la caída de la acidez no se vieron afectados y por tanto no se encontraron diferencias en el momento de la vendimia.

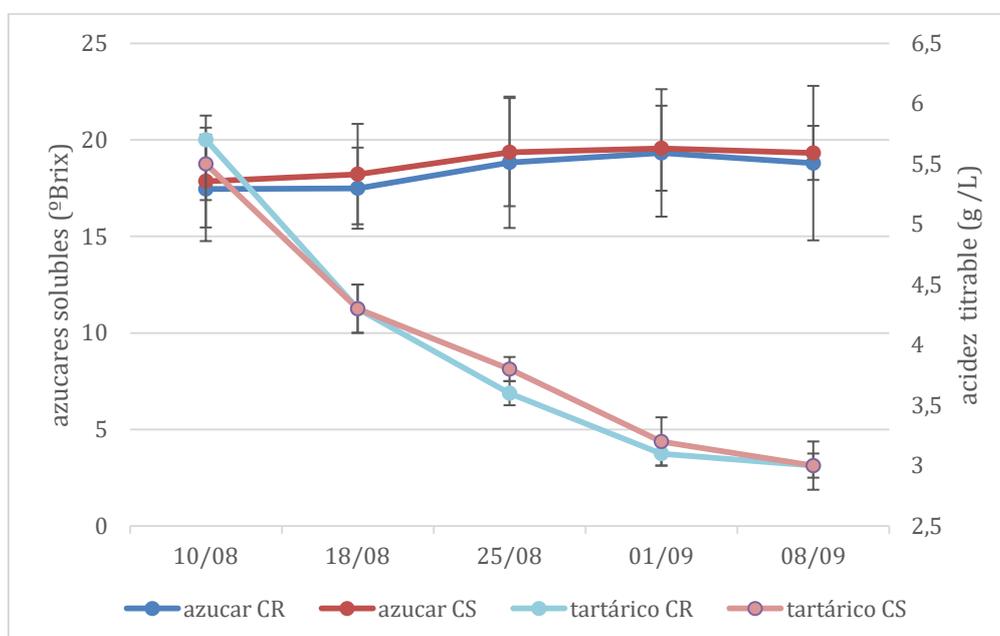


Figura 6. Evolución del contenido de azúcares solubles y acidez en las uvas durante el proceso de maduración hasta la vendimia para los tratamientos de riego (CR) y sequía (CS).

En el momento de la vendimia las plantas no se observaron diferencias significativas en producción, sin embargo, las uvas mostraron diferencias significativas en el contenido de NFA (**Tabla 3**). El valor de NFA fue mayor en las uvas de plantas con riego que las de sequía. En los puntos anteriores de seguimiento de maduración del fruto no se observaron diferencias significativas.

Tabla 3. Producción de las plantas medida el día de vendimia, número de racimos por planta, número de sarmientos y peso total de las uvas de cada planta, así como el peso medio de la uva y su contenido en NFA en los tratamientos de riego (CR) y sequía (CS). Se utilizaron 6 réplicas por tratamiento. Nivel de significancia $P < 0.05$. Los códigos de significancia que se indican son: ***= 0,001 **= 0.01 y *= 0.05, siendo ns el código establecido para valores no significativos.

Parámetro	CR	CS	Significancia
Producción (kg/planta)	4,47 ± 2,71	5,04 ± 3,12	ns
Racimos/planta (n)	14,2 ± 2,23	13,8 ± 4,26	ns
Sarmientos/planta (n)	9,17 ± 1,60	8,5 ± 1,38	ns
Peso uva (g)	3,58 ± 0,527	3,91 ± 0,402	ns
NFA (mg/L)	77,0 ± 15,0	52,5 ± 11,3	**

4.2. Evaluación de la calidad del vino

4.2.1 Fermentación alcohólica

El mosto del tratamiento N tuvo una fermentación más lenta, alcanzando el nivel de azúcares de los tratamientos S y M con 2 días de retraso. Así mismo, la fermentación terminó 2 días más tarde que los otros dos tratamientos. Las diferencias muestran en todo caso que los azúcares solubles del tratamiento N se consumieron más lentamente que los demás tratamientos, pero finalmente en los tres tratamientos se llegó a completar la fermentación correctamente hasta llegar a valores establecidos para considerar que un vino con la calificación de seco (<5 g/l).

Tras la FA, los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas únicamente en el consumo de glucosa y fructosa (**Tabla 4**), siendo mayor en el tratamiento N que en los otros dos tratamientos. El vino no mostró diferencias significativas en la intensidad colorante, acidez, pH, ni grado alcohólico. Es importante destacar que en el caso del ácido málico las diferencias entre el tratamiento S y el N se obtuvo un p valor=0.055 por lo que es un dato a tener en cuenta y que muestra que el efecto de la levadura sobre este

parámetro. En este caso en el tratamiento S se obtuvieron valores más altos que en los otros dos tratamientos. De la misma manera ocurre con el ácido láctico si comparamos de nuevo los tratamientos S y N, con un p valor=0.059. En este caso los valores del tratamiento N eran mayores que en los otros dos tratamientos.

Tabla 4. Análisis del vino una vez finalizada la FA. Se muestran los resultados de intensidad colorante, acidez volátil, acidez total medido en tartárico, ácido málico, ácido L-láctico, grado alcohólico, la suma de glucosa y fructosa, y pH en los tratamientos de *S. cerevisiae* (S), *S. cerevisiae* y *T.delbrueckii* (M) y fermentación espontánea (N). Se utilizaron 4 réplicas por tratamiento. Los diferentes grupos se muestran con letra con un nivel de significancia $P < 0.05$.

Parámetro	S	M	N
Intensidad colorante	0,72 ± 0,041a	0,66 ± 0,041a	0,72 ± 0,049a
Acidez volátil (g acético/L)	0,36 ± 0,017a	0,34 ± 0,045a	0,38 ± 0,039a
Acidez total (g tartárico/L)	4,86 ± 0,085a	4,58 ± 0,108a	4,66 ± 0,264a
Ácido málico (g/L)	2,47 ± 0,036a	2,09 ± 0,278a	2,04 ± 0,413a
Ácido L-láctico (g/L)	0,10 ± 0,017a	0,45 ± 0,293a	0,53 ± 0,345a
Grado alcohólico (%vol)	11,36 ± 0,108a	11,42 ± 0,199a	11,54 ± 0,169a
Glucosa+ fructosa (g/L)	1,00 ± 0,115a	1,25 ± 0,173ab	1,27 ± 0,096b
pH	3,75 ± 0,017a	3,78 ± 0,034a	3,77 ± 0,062a

4.2.2. Fermentación maloláctica

El vino final mostró diferencias en la concentración de ácidos tartárico, málico y láctico, resultando en diferencias también significativas en la acidez total y el pH (**Tabla 5**). Los resultados muestran que las variaciones se deben a la influencia de la inoculación de bacterias lácticas, siendo los valores de ácido tartárico y láctico mayores en las muestras inoculadas, mientras que ocurre al revés para el ácido málico. Esto indica que únicamente en los tratamientos en los que se inoculó la bacteria láctica, la fermentación maloláctica se llegó a completar. Aunque las diferencias no fueron significativas, es destacable la bajada en ácido tartárico en el tratamiento N si lo comparamos con el resto de los tratamientos en los que no se inoculó la bacteria láctica.

Tabla 5. Análisis del vino una vez finalizada la FML. Se muestran los resultados de ácido tartárico, ácido málico, ácido láctico, acidez total, SO₂ libre, SO₂ total y pH en los tratamientos de *S. cerevisiae* (S), *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* (M), fermentación espontánea (N) y los tratamientos en los que se inoculó la bacteria láctica (tratamiento con la levadura *S. cerevisiae* e inóculo de bacteria (IS), tratamiento con la levadura *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* e inóculo de bacteria (IM) y finalmente tratamiento de fermentación espontánea con inóculo de bacteria (IN)). Se utilizaron 4 réplicas por tratamiento. Los diferentes grupos se muestran con letra con un nivel de significancia P<0.05.

Parámetro	IS	S	IM	M	IN	N
Ácido tartárico (g/L)	1,55 ± 0,01c	1,13 ± 0,09ab	1,37 ± 0,17ac	1,09 ± 0,17ab	1,37 ± 0,17bc	1,04 ± 0,147a
Ácido málico (g/L)	0,05 ± 0,02a	2,04 ± 0,25b	0,03 ± 0,01a	1,81 ± 0,42b	0,06 ± 0,03a	1,60 ± 0,30b
Ácido láctico (g/L)	1,54 ± 0,02cd	0,28 ± 0,02a	1,67 ± 0,08d	0,59 ± 0,28ab	1,66 ± 0,08d	1,06 ± 0,48bc
Acidez total (g tartárico/L)	3,74 ± 0,15a	4,55 ± 0,46b	3,77 ± 0,10a	4,57 ± 0,10b	3,78 ± 0,09a	4,40 ± 0,24b
pH	3,93 ± 0,06b	3,79 ± 0,08a	3,92 ± 0,01b	3,78 ± 0,04a	3,89 ± 0,01ab	3,79 ± 0,07a
SO ₂ libre (mg/L)	5,5 ± 1,0a	7,5 ± 2,89a	6,25 ± 3,20a	6,75 ± 2,36a	5,75 ± 0,96a	5,25 ± 0,50a
SO ₂ total (mg/L)	60,25 ± 1,71a	61,0 ± 5,7a	54,75 ± 7,50a	57,5 ± 4,5a	65,5 ± 12,1a	58,25 ± 4,27a

En la **figura 7** se puede ver los componentes mayoritarios de la acidez. En dicha figura se diferencian claramente los tratamientos en los que se inoculó la bacteria láctica, ya que se consumió prácticamente todo el ácido málico transformándose en ácido láctico. Observando la concentración total de ácidos se ve una bajada respecto a los tratamientos en los que no se inoculó la bacteria láctica. Aunque como se observa en los resultados comentados anteriormente (**Tabla 5**), sólo los tratamientos en los que se inoculó la bacteria láctica completó la FML, se puede observar una ligera diferencia en los valores de ácido málico y láctico en el tratamiento N, que sugiere un posible inicio de la FML en este tratamiento (**Figura 7**).

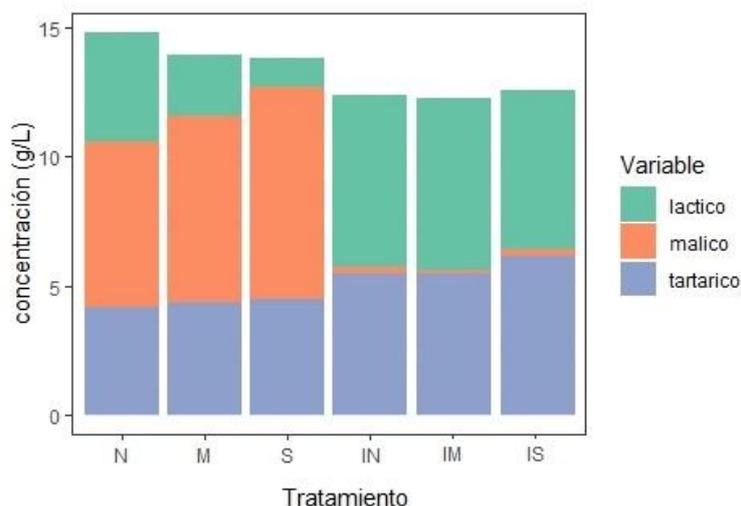


Figura 7. Concentración final de ácidos en el vino tras la FML en los diferentes tratamientos: *S. cerevisiae* (S), *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* (M), fermentación espontánea (N) y los tratamientos de en los que se inoculó la bacteria láctica (tratamiento con la levadura *S. cerevisiae* e inóculo de bacteria (IS), tratamiento con la levadura *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* e inóculo de bacteria (IM) y finalmente tratamiento de fermentación espontánea con inóculo de bacteria (IN)).

5. Discusión

Ante un cambio climático que cada vez afecta más a la productividad de muchos cultivos se hace más necesario establecer estrategias de manejo de los recursos que permitan mitigar sus efectos (Bebegali *et al.*, 2019). Uno de los principales problemas es el estrés hídrico (Cifre *et al.*, 2005, Chaves *et al.*, 2007).

Las variedades locales de una determinada zona vitícola establecen algunas de esas estrategias mediante diferentes procesos adaptativos (Biasi *et al.*, 2019). Callet es una variedad local que en condiciones de estrés hídrico presenta una alta asimilación de carbono a expensas de una gran pérdida de agua (Bota *et al.*, 2001). Por ello, esta variedad es considerada como un cultivar “gastador” (Passioura, 1994), puesto que no reduce el consumo de agua cuando esta escasea. Se ha confirmado que la conductancia no se vio afectada por el estrés hídrico en otros estudios (Bota *et al.*, 2001), al igual que en el presente trabajo en el que se observa que la conductancia estomática no se ve alterada ante la bajada de fotosíntesis (**Tabla 2**). El estrés hídrico moderado reduce el crecimiento vegetativo sin afectar a la actividad fotosintética (Carbonneau y Deloire, 2001), aunque en este estudio los resultados mostraron que el déficit hídrico no supuso cambios en los parámetros de crecimiento. Esta podría deberse a una estrategia basada en un equilibrio entre la fijación y traslación del carbono para compensar las posibles pérdidas generadas por la bajada en la tasa fotosintética, aunque para poder confirmarlo sería necesario

comprobar el balance de carbono como se muestra en otros trabajos que han corroborado esta teoría para algunas variedades autóctonas mallorquinas (Montero *et al.*, 2016, El Aouquad *et al.*, 2016).

La bajada de la tasa fotosintética muestra efectos del déficit hídrico en la absorción de carbono que, junto a los resultados obtenidos en el NFA (disminuido en el tratamiento de sequía) indica que se produce un efecto en el metabolismo del nitrógeno (Castrillo *et al.*, 1990; Bertamini *et al.*, 2006), pero al igual que en el caso de la tasa fotosintética, esta diferencia a nivel nutricional no produjo diferencias en la calidad del fruto. A pesar de tener valores de NFA globales mucho menor a los 120 mg N/l requeridos para una cinética de fermentación adecuada (Bely *et al.*, 1990; Jiranek *et al.*, 1995), la fermentación alcohólica se completó en todos los tratamientos y podemos afirmar que no se produjeron reducciones puesto que no se percibieron aromas anómalos como los provocados por el SH₂ (López-Cordón, 2011). En otros trabajos, los valores de NFA fueron mayores en las plantas con riego (Hannam *et al.*, 2013; De Royer *et al.*, 2014; Valdés *et al.*, 2019).

Los tres tratamientos establecidos finalizaron la fermentación alcohólica con ligeras diferencias en las velocidades de fermentación, siendo la fermentación N la más lenta con dos días de retraso respecto a las demás. La presencia cuantitativa de las diferentes especies durante la fermentación del mosto viene determinada por las condiciones de fermentación, como el inóculo de un cultivo iniciador, la temperatura y la concentración de oxígeno de fermentación y la composición de la uva (Domizio *et al.*, 2007). Cabe pensar que la fermentación natural fue más lenta debido a la cantidad de la propia levadura presente en el hollejo, que pudiera no ser suficiente para iniciar la fermentación en comparación con las muestras inoculadas con levaduras. Aunque a priori no se observan diferencias significativas en los parámetros de calidad, un control organoléptico muestra que los compuestos volátiles generados a diferentes velocidades de fermentación indica una interacción diferencial entre las poblaciones de levaduras y por tanto diferentes compuestos que condicionan el perfil aromático del vino (Ivit & Kemp, 2018). Uno de los valores que sí fue significativo es la suma de glucosa y fructosa aunque no mostró diferencias en contenido alcohólico, lo que podría indicar una gestión diferente de los azúcares por parte de las diferentes levaduras (García *et al.*, 2020). La ausencia de diferencias significativas en el contenido de alcohol confirma aún más esta afirmación, ya que si no fuera el caso se obtendrían también diferencias en el porcentaje de alcohol producido por la levadura.

Una vez finalizada la FA se inició la FML en la mitad de los tratamientos mediante la inoculación de bacterias lácticas. La fermentación maloláctica permite conseguir vinos con

más volumen y equilibrados, por lo que es habitual en la producción de vinos tintos de calidad (Lonvaud-Funel, 1999). Las diferencias de concentración de ácido málico y láctico están directamente relacionadas a la inducción de la FML (más cantidad de bacterias en las muestras inoculadas equivale a una FML más eficiente) (Nardi *et al.*, 2019; Ferrando *et al.*, 2020). Además, otro de los posibles efectos de las diferentes levaduras en este punto es el efecto sobre el ácido tartárico (Vilela, 2019). Los resultados obtenidos sugieren una posible degradación del tartárico por parte de las levaduras no *Saccharomyces* que condicionará el potencial de guarda del vino obtenido (Danilewicz, 2014).

Aunque a nivel analítico no se observaron grandes diferencias, en una cata no oficial realizada con catadores de la Universitat de les Illes Balears se pudieron diferenciar los tratamientos de levaduras y bacterias a nivel organoléptico, por lo que sería necesario realizar un estudio más amplio para poder determinar el perfil aromático del vino y así poder confirmar la hipótesis planteada. En general, las mayores diferencias aromáticas se encontraron en los vinos inoculados con bacterias lácticas resultando ser más complejos y con más volumen y más equilibrado (Lonvaud-Funel, 1999).

6. Conclusiones

- El estudio del comportamiento agronómico de la variedad local Callet muestra que ante condiciones de estrés hídrico no reduce su consumo de agua. El estrés hídrico no afectó a la conductancia estomática ni al crecimiento vegetal, pero sí mostró una bajada en la fotosíntesis además del nitrógeno disponible para la levadura. La calidad del fruto no se vio afectada por estas deficiencias.

- La fermentación espontánea fue más lenta que las demás, aunque se llegó a completar de manera correcta. Las diferencias en el consumo de glucosa y fructosa fueron debidas a una gestión diferente de los azúcares por parte de las diferentes levaduras. La calidad del vino no se vio afectada por estas diferencias en el consumo de azúcares, así como tampoco por la deficiencia nutricional inicial.

- La inoculación de *O. oeni* induce una FML eficiente, poniendo en manifiesto diferencias en el potencial de guarda de los vinos. Los vinos inoculados presentaron más complejidad, volumen y equilibrio aromático.

- La inoculación de levaduras comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias como *Oenococcus oeni* siguen siendo la práctica enológica más estable, aunque sería necesario completar el estudio con un análisis organoléptico más amplio para poder confirmar este resultado en lo referente a las preferencias de los consumidores.

7. Bibliografía

Alonso-del-Real, J., Contreras-Ruiz, A., Castiglioni, G.L., Barrio, E., Querol, A. The Use of Mixed Populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* to Reduce Ethanol Content in Wine: Limited Aeration, Inoculum Proportions, and Sequential Inoculation. *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 2087.

Bely, M., Sablayrolles, J. M., and Barre, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **1990**, 70, 246–252.

Benito, Á., Calderón, F., Benito, S. The Influence of Non-*Saccharomyces* Species on Wine Fermentation Quality Parameters. *Ferment.* **2019**, 5, 54.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, 122, 312–320.

Berbegal, C., Spano, G., Fragasso, M., Grieco, F., Russo, P., Capozzi, V. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, 102, 569–576.

Bertamini, M., Zulini, L., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. Effect of water deficit on photosynthetic and other physiological responses in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Riesling) plants. *Photosynthetica* **2006**, 44(1), 151-154.

Biasi, R., Brunori, E., Ferrara, C., Salvati, L. Assessing impacts of climate change on phenology and quality traits of *Vitis vinifera* L.: The contribution of local knowledge. *Plants* **2019**, 8(5), 121.

Bota, J., Flexas, J. y Medrano, H. Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. *Ann. Appl. Biol.* **2001**, 138(3), 353-361.

Bota, J. Estado actual de las variedades minoritarias de la Islas Baleares. *Gesevid*, **2012**.

Capozzi, V., Berbegal, C., Tufariello, M., Grieco, F., Spano, G., Grieco, F. Impact of co-inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum* and *Oenococcus oeni*

autochthonous strains in controlled multi starter grape must fermentations. *Food Sci. Technol.* **2019**, 109, 241–249.

Carbonneau A. y Deloire A. Plant organization based on source-sink relationships: new findings on developmental, biochemical and molecular responses to environment. *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine* **2001**, 263-268. Springer, Dordrecht.

Castrillo, M., Fernández, D., Fernández, P., Molina, B., Kazandjian, A. Metabolismo del nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. bajo déficit hídrico. *Turrialba* **1990**.

Chaves, M.M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J.M., Santos, T., Regalado, A.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M. Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Ann. Bot.* **2010**, 105, 661–676.

Chuine, I., P. Yiou, N. Viovy, B. Seguin, V. Daux, and E. L. Ladurie. Historical phenology: grape ripening as a past climate indicator. *Nature* **2004**, 432, 289–290.

Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchoni, J., Canonico, L., Curiel, J.A., Oro, L., Rodrigues, A.J., Gonzalez, R. Non-conventional Yeast Species for Lowering Ethanol Content of Wines. *Front. Microbiol.* **2016**, 7, 642.

Ciani, M. y Maccarelli F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with winemaking. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 14(2), 199-203.

Cifre, J., Bota, J., Escalona, J.M., Medrano, H., Flexas, J. Physiological tools for irrigation scheduling in grapevine (*Vitis vinifera* L). An open gate to improve water-use efficiency? *Agric. Ecosyst. Environ.* **2005**, 106, 159–170

Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C. Evaluation of Non-*Saccharomyces* Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80, 1670–1678.

Dalla Marta, A., D. Grifoni, M. Mancini, P. Storchi, G. Zipoli, and S. Orlandini. Analysis of the relationships between climate variability and grapevine phenology in the Nobile di Montepulciano wine production area. *J. Agric. Sci.* **2010**, 148, 657–666.

Danilewicz, J. C. Role of tartaric and malic acids in wine oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62(22), 5149-5155.

Daux, V., Garcia de Cortazar-Atauri, I., Yiou, P., Chuine, I., Garnier, E., Roy Ladurie, E. L., Mestre, O., Tardaguila, J. An open-access database of grape harvest dates for climate research: data description and quality assessment. *Clim. Past* **2012**, 8(5), 1403-1418.

De Bei, R., Fuentes, S., Gilliam, M., Tyerman, S., Edwards, E., Bianchini, N., Smith, J., Collins, C. VitiCanopy: A free computer App to estimate canopy vigor and porosity for grapevine. *Sensors* **2016**, 16(4), 585.

De Royer Dupré, N., Schneider, R., Payan, J. C., Salançon, E., Razungles, A. Effects of vine water status on dimethyl sulfur potential, ammonium, and amino acid contents in Grenache noir grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62(13), 2760-2766.

Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C. D., Sabatelli, M. P. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 115(3), 281-289.

Drappier, J., Thibon, C., Rabot, A., Geny-Denis, L. Relationship between wine composition and temperature: Impact on Bordeaux wine typicity in the context of global warming- Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, 59, 14–30.

El Aou-ouad, H., Montero, R., Medrano, H., Bota, J. Interactive effects of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) and water stress on the physiology of *Vitis vinifera* L. cv. Malvasia de Banyalbufar and Giro-Ros. *J. Plant Physiol.* **2016**, 196, 106-115.

Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R. Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Res. Int.* **2018**, 112, 17–24.

Failla, O., Brancadoro, L., Scienza, A. Actual and possible impact of grapevine local varieties on viticulture: the Italian case. *Acta Hort.* **2007**, 754: 31-38

Ferrando, N., Araque, I., Ortís, A., Thornes, G., Bautista-Gallego, J., Bordons, A., Reguant, C. Evaluating the effect of using non-*Saccharomyces* on *Oenococcus oeni* and wine malolactic fermentation. *Food Res. Int.* **2020**, 138, 109779.

Fleet, G. H. The microbiology of alcoholic beverages. *Microbiology of fermented foods* **1998**, 217-262. Springer, Boston, MA.

Flexas, J., Galmés, J., Gallé, A., Gulias, J., Pou, A., Ribas-Carbó, M., Tomás, M., Medrano, H. Improving water use efficiency in grapevines: potential physiological targets for biotechnological improvement. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2010**, 16, 106–121.

Francis, L., Osidacz, P., Bramley, B., King, E., O'Brien, V., Curtin, C., ... & Pretorius, I. S. Linking wine flavour components, sensory properties and consumer quality perceptions. *Aust. NZ Wine Ind. J* **2010**, 25, 18-23.

Gálvez Pavez, R., Callejas Rodríguez, R., & Reginato Meza, G. Comparación de la cámara de presión tipo Scholander modelo Pump-up respecto a la cámara de presión tradicional en vides de mesa. *Idesia (Arica)* **2011**, 29(2), 175-179.

García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, JM., Arroyo, T.. Sequential Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations to Reduce the Alcohol Content in Wine. *Fermentations (Arica)* **2020**, 6(60).

Girona, J., Mata, M., Del Campo, J., Arbonés, A., Bartra, E., Marsal, J. The use of midday leaf water potential for scheduling deficit irrigation in vineyards. *Irrig. Sci.* **2006**, 24(2), 115-127.

Hannam, K. D., Neilsen, G. H., Forge, T., Neilsen, D. The concentration of yeast assimilable nitrogen in Merlot grape juice is increased by N fertilization and reduced irrigation. *Can. J. Plant Sci.* **2013**, 93(1), 37-45.

Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martin-Alvarez, P. J., Cabezudo, M. D. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41(4), 313-318.

Ivit, N. N., & Kemp, B. The impact of non-*Saccharomyces* yeast on traditional method sparkling wine. *Ferment.* **2018**, 4(3), 73.

Jiranek, V., Langridge, P., and Henschke, P. A. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, 46, 75–83.

Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., and Storchmann, K. Climate change and global wine quality. *Clim. Change* **2005**, 73, 319–343.

Jones, G. V., Duchene, E., Tomasi, D., Yuste, J., Braslavska, O., Schultz, H., ... & Guimberteau, G. Changes in European winegrape phenology and relationships with climate. XIV International GESCO Viticulture Congress, Geisenheim, Germany, 23-27 August, **2005**, 54-61. Groupe d'Etude des Systemes de Conduite de la Vigne (GESCO).

Kenny, G. J., and P. A. Harrison. The effects of climate variability and change on grape suitability in Europe. *J. Wine Res.* **1992**, 3, 163–183.

Kliewer, W. M., Lider, L. A. Effects of day temperature and light intensity on growth and composition of *Vitis vinifera* L. fruits. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1970**, 95, 766-9.

Kliewer, W. M. Berry composition of *Vitis vinifera* cultivars as influenced by photo-and nycto-temperatures during maturation. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1973**, 98, 153-159

Kuchen, B., Maturano, Y.P., Mestre, M.V., Combina, M., Toro, M.E., Vazquez, F. Selection of Native Non-*Saccharomyces* Yeasts with Biocontrol Activity against Spoilage Yeasts in Order to Produce Healthy Regional Wines. *Ferment.* **2019**, 5, 60.

Lattey, Kate A., B. R. Bramley, and I. L. Francis. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2010**, 16(1), 189-202.

Lonvaud-Funel, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications* **1999**, 317-331.

López-Cordón, E. N. Compuestos azufrados volátiles y riesgos de reducción en vinos. *Artículos Técnicos Alimentaria* **2011**, 425, 115-120.

Marsal, G., Bota, J., Martorell, A., Canals, J. M., Zamora, F., Fort, F. Local cultivars of *Vitis vinifera* L. in Spanish islands: Balearic Archipelago. *Sci. Hortic.* **2017**, 226, 122-132.

Martínez, A. El cambio climático y sus efectos sobre la calidad del vino. Trabajo de Fin de Grado en Ingeniería Agroalimentaria y del Medio Rural, **2016**, Universidad Politécnica de Valencia.

Medrano, H., Tomás, M., Martorell, S., Flexas, J., Hernández, E., Rosselló, J., Pou, A., Escalona, J.M., Bota, J. From leaf to whole-plant water use efficiency (WUE) in complex canopies: limitations of leaf WUE as a selection target. *Crop J.* **2015**, 3, 220–228.

Minnaar, P. P., Du Plessis, H. W., Paulsen, V., Ntushelo, N., Jolly, N. P., & Du Toit, M. *Saccharomyces cerevisiae*, non-*Saccharomyces* yeasts and lactic acid bacteria in sequential fermentations: Effect on phenolics and sensory attributes of South African Syrah wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2017**, 38(2), 237-244.

Mira de Orduña, R. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* **2010**, 43, 1844–1855

Montero, R., El aou-ouad, H., Flexas, J., Bota, J. Effects of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) on plant carbon balance in *Vitis vinifera* L. cv. Giró Ros. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **2016**, 28(1), 1-10.

Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., and González, R. The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, 99, 2993-4003.

Moreno, J. M. Evaluación preliminar de los impactos en España por efecto del cambio climático. *Boletín CF+ S* **2014**, (38/39), 37-56.

Mozell, M.R., Thach, L. The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions. *Wine Econ. Policy* **2014**, 3, 81–89.

Nardi, T., Panero, L., Petrozziello, M., Guaita, M., Tsolakis, C., Cassino, C., Bosso, A. Managing wine quality using *Torulaspora delbrueckii* and *Oenococcus oeni* starters in mixed fermentations of a red Barbera wine. *Eur. Food Res. Technol.* **2019**, 245(2), 293-307.

Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., Deloire, A. Influence of pre-and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53(4), 261-267.

Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P. Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front. Microbiol.* **2016**, 7, 411.

Passioura, J. B. The yield of crops in relation to drought. Physiology and determination of crop yield **1994**, 343-359.

Rossouw, D., Bauer, F.F. Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiol.* **2016**, 55, 32–46.

Scholander, P.F., Bradstreet, E.D., Hemmingsen, E.A. y Hammel, H.T. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* **1965**, 148(3668), 339-346.

Sena-Esteves, M. M., Mota, M., Malfeito-Ferreira, M. Patterns of sweetness preference in red wine according to consumer characterisation. *Food Res. Int.* **2018**, 106, 38-44.

Sheffield, J., Wood, E.F. Global trends and variability in soil moisture and drought characteristics, 1950–2000, from observation-driven simulations of the terrestrial hydrologic cycle. *J. Climate* **2008**, 21, 432–458.

Shekhawat, K., Bauer, F. F., and Setati, M. E. Impact of oxygenation on the performance of three non-*Saccharomyces* yeasts in co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 101, 2479–2491.

Rodríguez Alonso, P., Pozo de la Calle, S. D., Valero Gaspar, T., Ruiz Moreno, E., Ávila Torres, J. M., Varela Moreiras, G. Fifty years of beverages consumption trends in Spanish households. *Nutr. Hosp.* **2016**, 33, 46-51.

Triolo, R., Roby, J. P., Pisciotta, A., Di Lorenzo, R., van Leeuwen, C. Impact of vine water status on berry mass and berry tissue development of Cabernet franc (*Vitis vinifera* L.), assessed at berry level. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, 99(13), 5711-5719.

Valdés, M. E., Talaverano, M. I., Moreno, D., Prieto, M. H., Mancha, L. A., Uriarte, D., Vilanova, M. Effect of the timing of water deficit on the must amino acid profile of Tempranillo grapes grown under the semiarid conditions of SW Spain. *Food Chem.* **2019**, 292, 24-31.

van Leeuwen, C., Destrac-Irvine, A., Dubernet, M., Duchêne, E., Gowdy, M., Marguerit, E. *et al.* An update on the impact of climate change in viticulture and potential adaptations. *Agron.* **2019**, 9(9), 514.

Varela, C., Dry, P.R., Kutyna, D.R., Francis, I.L., Henschke, P.A., Curtin, C.D., Chambers, P.J. Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, 21, 670–679.

Vilela, A. Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity. *Ferment.* **2019**, 5(1), 27.

Volmer, D. A., Curbani, L., Parker, T. A., Garcia, J., Schultz, L. D., Borges, E. M. Determination of titratable acidity in wine using potentiometric, conductometric, and photometric methods. *J. Chem. Educ.* **2017**, 94(9), 1296-1302.

Webb, L. B., Whetton, P. H., Barlow, E. W. R. Climate change and winegrape quality in Australia. *Clim. Res.* **2008**, 36(2), 99-111.

Otras fuentes consultadas:

2019 Statistical Report on World Vitiviniculture, OIV.

Estadísticas IGPs, Ministerio de Agricultura y Medio Rural y Marino.

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2019/934 DE LA COMISIÓN de 12 de marzo de 2019 por el que se completa el Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo.