

**FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Efecto de la inoculación de micorrizas arbusculares comerciales, sobre la composición fenólica de vinos de los cv. Carménère y Pinot Noir.

JOSÉ LUIS ARANDA RAMÍREZ

QUILLOTA, CHILE

2018

Índice.

1. Resumen	1
2. Definición del problema u oportunidad	2
3. Hipótesis	5
4. Objetivos	6
4.1. Objetivo general.....	6
4.2. Objetivos específicos.....	6
5. Revisión bibliográfica	7
5.1. Características generales de la especie	7
5.1.1. Cultivar <i>Carménère</i>	7
5.1.2. Cultivar <i>Pinot Noir</i>	7
5.2. Metabolismo secundario de las plantas.	8
5.3. Compuestos fenólicos en la vid.	8
5.4. Micorrizas arbusculares	9
5.5. Uso de micorrizas arbusculares en la agricultura.	10
5.6. Micorrizas arbusculares en vid.	11
6. Metodología.....	13
6.1. Localización del muestreo.	13
6.2. Diseño experimental, tratamientos y muestreo.....	13
6.3. Determinación de parámetros productivos y químicos en bayas.	14
6.4. Preparación de muestras para análisis químicos en bayas.	14
6.5. Caracterización espectrofotométrica de compuestos fenólicos en bayas.	15
6.6. Vinificación de vinos tintos.	15
6.7. Análisis de vinos.	16
6.8. Medición de la colonización micorrícica.	16
7. Referencias.....	16
8. Plan de trabajo.....	20
9. Resultados esperados	21
10. Organización de cargos y funciones	22
10.1. Director del proyecto	22
10.2. Profesionales de apoyo y asesoramiento	22
11. Presupuesto	23
12. Anexos	25
12.1. Anexo 1	25
12.2. Anexo 2	27

1. Resumen

En la dieta humana, los compuestos fenólicos contribuyen a las propiedades sensoriales de los alimentos, exhibiendo una amplia gama de funciones biológicas y fisiológicas, tales como actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, y antioxidantes (Aguilar, 2017). Estos han causado interés debido a los beneficios para la salud humana, ya que a partir de su consumo moderado y en conjunto con una dieta equilibrada, ayudarían en la prevención de diversas enfermedades cardiovasculares, y algunos tipos de cáncer (Cáceres, 2013).

Entre la gran cantidad de componentes que posee la vid, se distinguen los compuestos fenólicos. Estos repercutirán en importantes características del vino, como lo son el color, astringencia y el amargor, las cuales se relacionarán de forma directa con la calidad final del producto (Cáceres, 2013). Debido a su importancia, en el cultivo se utilizan diferentes estrategias para aumentar el contenido de compuestos fenólicos. Las más comunes son prácticas culturales, tales como: podas, aclareo de racimos y déficit hídrico controlado (Ruiz *et al.*, 2013). A pesar de ello, se han ido desarrollado investigaciones que han buscado métodos alternativos para el aumento de los compuestos fenólicos de bayas y vinos.

La micorriza corresponde a un proceso ecológico caracterizado por una interacción simbiótica entre las hifas de al menos una especie de hongo sobre las raíces secundarias de una o más plantas, formando una estructura capaz de realizar un intercambio de agua, nutrientes, y reguladores de crecimiento entre ambas partes (Trouvelot *et al.*, 2015).

Un estudio italiano realizado por Gabriele *et al.* (2015), consistió en la inoculación de micorrizas arbusculares sobre un cultivo de *Vitis vinifera* cv. Sangiovese, con el objetivo de observar la variación en los compuestos fenólicos presentes en el vino. El tratamiento con inoculación logró obtener un vino con una mayor concentración de flavonoides. Sin embargo, este estudio no es representativo para Chile, ya que las características edafoclimáticas son distintas, y dicha variedad representa un mínimo porcentaje de la superficie total nacional destinada al cultivo de *Vitis vinifera* (SAG, 2015).

Tanto a nivel mundial como nacional, no existen más estudios publicados que hagan referencia a dicha correlación. Por lo tanto, sería de gran utilidad realizar una investigación chilena que relacione los efectos de la inoculación de dichos hongos sobre

atributos de calidad en el vino, específicamente en los niveles de compuestos fenólicos totales.

2. Definición del problema u oportunidad

La importancia de optimizar los niveles de compuestos fenólicos que poseen las bayas de vid, radica en que algunos de ellos poseen una directa influencia sobre importantes características del vino, como lo son el color, la astringencia, y el amargor; el balance de estos se relacionará directamente con la calidad final del producto (Cáceres, 2013).

La micorriza arbuscular podría influir en el metabolismo primario y secundario de las plantas hospederas (Toussaint *et al.*, 2007). En la actualidad, existen diversos productos agrícolas que al poseer un inoculo específico de hongos formadores de micorrizas arbusculares, se aplicarán con el principal objetivo de provocar una mejoría en el desarrollo de la planta hospedera (Aguilar, 2017), conllevando así a una mayor exposición a la luz solar directa por parte del follaje, lo cual según Price *et al.* (1995) podría provocar un aumento de los polifenoles totales, antocianinas y flavonoles, en las bayas y en el vino a elaborar.

A causa de que en la vitivinicultura con sistema de producción convencional existe una aplicación reiterada de herbicidas, plaguicidas y fertilizantes de síntesis, se generará un empobrecimiento paulatino del suelo al provocar una disminución del porcentaje de materia orgánica, lo cual conllevará a una disminución en su densidad microbiana (Campbell, 1982; Roldan *et al.*, 2003; Spedding *et al.*, 2004). Por este motivo, todo proceso de inoculación comercial de micorrizas arbusculares sobre un huerto frutal, deberá ser ejecutado en uno que posea un sistema de producción netamente orgánico o biodinámico, ya que estos al no aplicar insumos con efectos adversos para el medio ambiente, planta y el ser humano, mantendrán y mejorarán la salud de los suelos, ecosistemas y las personas. Adicionalmente, se deberá complementar con manejos que provoquen un incremento en los niveles de materia orgánica presente en el suelo, ya que de esta forma se provocará una mejora en su biodiversidad y fertilidad, al generar una mayor cantidad de sustratos para la microfauna de los suelos. Algunos métodos para provocar mejoras en la fertilidad del suelo son: la aplicación de compost, cultivos de cobertura, permanencia de cubiertas vegetales, e incorporación de restos de biomasa hacia el suelo (Pino, 2013).

A nivel mundial y nacional, ha habido un alza en el establecimiento de viñas orgánicas y biodinámicas, por ello, el establecimiento de una vitivinicultura sustentable se ha convertido en una elección lógica en la actualidad, con el objetivo de ajustar la oferta de vinos que exige el mercado demandante (Aguilar, 2017). Las micorrizas arbusculares promueven un favorable desarrollo y crecimiento del cultivo, por lo tanto, la inoculación con micorrizas arbusculares, forma parte de las aplicaciones para el desarrollo de una agricultura sustentable que mantenga adecuados niveles productivos y de calidad, mientras se minimiza el impacto en el medio ambiente (Nasim, 2012).

El efecto de las micorrizas arbusculares sobre el nivel de metabolitos secundarios, en gran medida dependerá según la especie de la planta hospedera y del hongo. Es decir, algunas especies de hongos provocarán un aumento en el contenido de polifenoles de ciertas plantas específicas, por ello, no todas reaccionarán igual frente a la misma especie de hongo (Araim *et al.*, 2009). Aún no está claro por qué, o a través de qué rutas bioquímicas podrían aumentar la cantidad de metabolitos secundarios en las plantas que fueron inoculadas con micorrizas arbusculares, se cree que una de las razones es que al generarse una mayor absorción de fósforo se provocará un aumento en el nivel de Acetyl-CoA, ATP y NADPH al ser un elemento precursor, quienes participan en la biosíntesis de isoprenoides; por otro lado, al generarse una mayor absorción de nitrógeno, se aumentará la producción de diferentes aminoácidos al ser un elemento precursor, lo cual originaría alcaloides específicos (Zeng *et al.*, 2013).

En el caso de la viticultura, se ha identificado que las vides que fueron inoculadas con micorrizas arbusculares, tendrán una mayor cantidad de estilbenos en la raíz, polifenoles en las hojas (Sbrana *et al.*, 2014), y presentarán un aumento en su nivel productivo (Krishna *et al.*, 2005). Una investigación realizada por Gabriele *et al.* (2016) analizó el efecto producido a partir de la inoculación de micorrizas arbusculares en un cultivo de *Vitis vinífera* L. var. Sangiovese sobre la composición química, y los comparó con aquellos elaborados a partir de una vitivinicultura convencional, siendo cuantificados mediante métodos espectrofotométricos y HPLC-DAD. De esta investigación, se pudo concluir que aquellos vinos elaborados a partir de un cultivo de vid con simbiosis comercial de micorrizas, presentaron un nivel significativamente mayor de flavonoides, en comparación a vinos elaborados a partir de uvas obtenidas de vitivinicultura convencional.

Sin embargo, el estudio italiano de Gabriele et al. (2016) no es representativo para Chile, ya que las características edafoclimáticas son distintas entre ambos países. Además, la variedad que fue estudiada representa un mínimo porcentaje (0,14%) de la superficie total nacional destinada al cultivo de *Vitis vinífera* para la producción de vinos (SAG, 2015). A nivel mundial no existen más estudios publicados que hagan una referencia directa sobre la variación en la concentración de compuestos fenólicos en las bayas y vino, a partir de una inoculación de micorrizas arbusculares sobre un cultivo de vid. Por este motivo, sería de gran utilidad realizar una investigación chilena que relacione dicha influencia, cuyos resultados serían de gran utilidad para la vitivinicultura nacional.

3. Hipótesis

La inoculación de micorrizas arbusculares comerciales sobre un cultivo de *Vitis vinífera* L. provocará un aumento en la concentración de compuestos fenólicos en las bayas y en el vino a elaborar.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Determinar el efecto generado a partir de una inoculación de micorrizas arbusculares en un cultivo de *Vitis vinífera* L., sobre la composición fenólica de bayas y vinos provenientes de los cv. Pinot Noir y Carménère.

4.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la concentración de compuestos fenólicos de bayas y vino obtenido a partir de un cultivo de *Vitis vinífera* L. tratado con una inoculación previa de micorrizas arbusculares.
- Evaluar sensorialmente muestras de vinos provenientes de plantas sometidas a una inoculación de micorrizas arbusculares.

5. Revisión bibliográfica

5.1. Características generales de la especie

La vid (*Vitis vinifera* L.) es un cultivo de gran importancia económica y alimentaria, tanto a nivel nacional e internacional. Corresponde a una planta leñosa de hoja caduca, cuya única unidad productiva de interés comercial es su fruto, el cual se compone de múltiples frutos de tipo baya situados sobre un raquis (Gil y Pszczólkowski, 2015).

A causa del clima mediterráneo templado, en conjunto de las características geográficas presentes en Chile, desde el siglo XVI se ha ido desarrollado progresivamente el cultivo de vid con numerosas variedades comerciales que generarán distintos estilos de vino, registrando en la actualidad una expansión del cultivo desde el Valle del Elqui (30° latitud sur) hasta el Valle del Malleco (39° latitud sur) (Aguilar, 2017). Tradicionalmente, los principales destinos comerciales a nivel nacional según la superficie establecida de vid, es el de elaboración de vinos, consumo fresco, y elaboración de pisco (Buzzetti y Banfi, 2017).

5.1.1. Cultivar *Carménère*.

Durante el año 2015, se registró una superficie total nacional de 10.860 ha destinadas al cultivo de la variedad *Carménère*, en donde un 54,34% del total se focalizó en la Región de O'Higgins (SAG, 2015). El potencial de producción de *Carménère* es sobresaliente a nivel nacional, debido a que Chile es el único país que lo produce a gran escala (Aguilar, 207).

Para obtener una eficaz producción y madurez de este cultivar, se requiere de altos niveles de sumatoria térmica y luminosidad. Las bayas presentarán una alta potencialidad de acumulación de azúcares, muy baja acidez, y pH muy alto. Su vino posee una alta intensidad de colorante, taninos suaves y alto cuerpo (Gil y Pszczólkowski, 2015).

5.1.2. Cultivar *Pinot Noir*.

Durante el año 2015, se registró una superficie total nacional de 4.148 ha destinadas al cultivo de la variedad *Pinot Noir*, en donde un 43,99% del total se focalizó en la Región de Valparaíso (SAG, 2015).

Las bayas presentarán una alta potencialidad de acumulación de azúcares, sin embargo, normalmente su acidez será media o insuficiente. Su vino se caracterizará por presentar una escasa coloración, además de bajos contenidos de taninos, cuerpo, y estructura. Además, se utiliza para la elaboración de vino espumoso (Gil y Pszczólkowski, 2015).

5.2. Metabolismo secundario de las plantas.

El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas realizadas por las células de los seres vivos, con el objetivo de sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o bien, para degradar las complejas y obtener las simples. El metabolismo primario se encontrará presente en todos los seres vivos, sin embargo, de forma paralela ocurrirá un metabolismo secundario únicamente en las plantas, el cual tendrá el objetivo de producir compuestos denominados metabolitos secundarios, estos se relacionarán directamente con la defensa y dispersión de las plantas, otorgándole una protección frente a estrés biótico y abiótico. Dentro de los principales metabolitos secundarios, los compuestos fenólicos serán aquellos más abundantes en la planta, también se diferenciarán terpenos y alcaloides (Avalos y Pérez, 2009).

5.3. Compuestos fenólicos en la vid.

Los compuestos fenólicos poseen un anillo de benceno aromático con uno o varios grupos hidroxilo, estos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los compuestos no flavonoides (C_6-C_1 o C_6-C_3) y los compuestos flavonoides ($C_6-C_3-C_6$). Generalmente en la vid, los compuestos no flavonoides se localizan en todas partes del racimo, mientras que los compuestos flavonoides se encuentran en las semillas, hollejos y/o raquis (Hidalgo, 2003). Dentro de los compuestos no flavonoides, los estilbenos son antioxidantes que cumplen un rol en la defensa en la vid, mientras que los ácidos fenólicos que se subdividen en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, corresponderán a copigmentos responsables del pardeamiento en vinos blancos. Dentro de los compuestos flavonoides, los flavonoles y flavonas generarán el color amarillo en los vinos blancos, los antocianos otorgarán el color rojo en el vino tinto, mientras que los flavanoles que se subdividen en catequinas y taninos condensados, otorgarán astringencia y amargor al vino tinto (Hidalgo, 2003; Zamora, 2003).

La concentración de compuestos fenólicos en vid, dependerán según el cultivar, clima,

condiciones edafológicas, presencia de estrés biótico o abiótico, y según los manejos agrícolas. Se ha reportado que los activadores de plantas, Benzotiadizol (BTH) y el Quitosano (CHT), son capaces de estimular el complejo sistema de resistencia adquirido, lo cual provocará la síntesis de polifenoles en la vid (Ruggiero *et al.*, 2013). La concentración de compuestos fenólicos en las bayas, se focalizará principalmente en hollejos y semillas; las antocianinas generalmente se ubicarán solo en los hollejos de la baya, a excepción de las variedades tintoreras que se ubicarán tanto en los hollejos como en la pulpa, mientras que las proantocianidinas se ubicarán en los hollejos y semillas (Blouin y Guimberteau, 2004). Las bayas presentarán una gran variabilidad en su grado de madurez y concentración de diversos compuestos, por lo tanto, para lograr resultados representativos dentro de un estudio, se hace necesario establecer una determinada cantidad de puntos de muestreos que demuestren un cierto grado de precisión en el compuesto o parámetro a analizar (Blouin y Guimberteau, 2004).

Los compuestos fenólicos se relacionarán de forma directa e indirecta con respecto a la calidad de los vinos, en términos de aspecto, gusto, y sensación en boca del vino. Los azúcares son los precursores iniciales de las biosíntesis de compuestos flavonoides y antocianinas. Es por este motivo, que se puede indicar que existe una relación directamente proporcional entre ambos (Hrazdina *et al.*, 1984).

5.4. Micorrizas arbusculares

De manera general, las hifas del hongo que crecen a partir del desarrollo de la micorriza, actuarán como una extensión de la raíz en la planta hospedera, provocando un aumento en la superficie de exploración en el sustrato. Esto provocará que la planta hospedera posea una mayor oportunidad de absorber agua y minerales esenciales, a medida que la planta le proporcione carbohidratos al hongo que son obtenidos a partir de su actividad fotosintética. Este mecanismo de asociación se remonta a la primera aparición de plantas terrestres, es decir, hace 400 millones de años (Redecker, 2000). En la actualidad se reconocen siete tipos de micorrizas, las cuales son: ectomicorriza, micorriza arbuscular, micorriza de orquídeas, micorriza ericoide, ectendomicorriza, micorriza arbutoide, y micorriza monotropoide (Andrade, 2010).

En la micorriza arbuscular actuará un hongo biótrofo obligado que carece de reproducción sexual, pero serán capaces de formar esporas multinucleadas e hifas no septadas. Estos

hongos pertenecerán al Phylum *Glomeromycota* que contiene 14 familias, las principales son *Glomeraceae*, *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae*, *Pacisporaceae*, y *Diversisporaceae* (Aguilar, 2017). La estrategia de colonización por parte del hongo para formar una micorriza arbuscular difiere según su familia. Las especies pertenecientes a la familia *Glomeraceae* colonizarán el tejido radicular a partir de un fragmento de hifas, mientras que aquellas pertenecientes a la familia *Diversisporaceae* comenzarán su colonización a partir solo de esporas, siendo este un proceso más lento (Hart y Reader, 2002).

La colonización de los hongos para formar la micorriza arbuscular, se produce por el reconocimiento de moléculas señal contenidas en la rizosfera. La raíz de la planta hospedera producirá grupos de estrigolactonas, las cuales promoverán la germinación de esporas y ramificación de las hifas del hongo. Posteriormente, el hongo producirá compuestos denominados factores micorrícicos (Factores Myc) incluyendo los lipo-quitooligosacáridos (LCOs), estos serán posiblemente los reconocidos por la planta para activar las rutas de señales común de la simbiosis, promoviendo la invasión de la raíz y generando oscilaciones de calcio (Smith y Read, 2008).

La invasión de los hongos formadores de micorrizas arbusculares implicarán una formación de apresorios en el tejido radicular, lo cual permitirá el crecimiento de hifas fúngicas en la célula epidérmica de la raíz. Una vez que las hifas intercelulares invaden el cortex radicular, se irán formando dos estructuras particulares en las células parenquimáticas corticales, los arbuscúlos a nivel intracelular, y las vesículas de almacenamiento originadas a nivel intra y/o extracelular. El intercambio de nutrientes entre el micobionte y el fitobionte ocurrirá en los arbuscúlos, mientras que en las vesículas de almacenamiento se acumularán los nutrientes esenciales (Aguilar, 2017). Además, se formará una membrana peri fúngica alrededor de las hifas y de los arbuscúlos (Oldroyd, 2013).

5.5. Uso de micorrizas arbusculares en la agricultura.

Dentro de los microorganismos benéficos de la agricultura, la micorriza arbuscular es probablemente la interacción simbiótica más extendida entre plantas y microorganismos (Smith y Read, 2008; Parniske, 2008), sin embargo, su abundancia estará fuertemente influenciada por las características de la rizosfera, manejos aplicados sobre el cultivo, y en

menor medida según la etapa de desarrollo de la planta hospedera (Schreiner y Mihara, 2009; Balestrini *et al.*, 2010). En la actualidad, cerca de un 80% de las especies de plantas terrestres son capaces de formar micorrizas arbusculares bajo diferentes condiciones (Wang y Qiu, 2006). En contraste con la gran variedad de plantas terrestres que son capaces de formar micorrizas arbusculares, en la actualidad solamente se han descrito 200-250 especies de Glomeromycota, por lo cual, se indica que existe una baja especificidad de los micobiontes en relación con el número de plantas hospederas (Heijden *et al.*, 2004).

Los servicios ecosistémicos producidos por la micorriza arbuscular serán: promover el crecimiento de la planta, mejorar la retención de agua del suelo, incrementar la absorción de agua y nutrientes esenciales (nitrógeno, fósforo y otros), aumentar la resistencia de la planta contra tensiones bióticas, intensificar la resistencia de la planta a estrés abiótico (sequía, salinidad, metales pesados, y suelos con bajos nutrientes minerales), mejorar la estructura y estabilidad del suelo, aumentar la adherencia entre la planta y el suelo, y provocar una bioregulación del desarrollo de la planta con el consiguiente aumento en la calidad funcional del alimento (Aguilar, 2017; Trouvelot *et al.*, 2015; Smith y Smith, 2012).

5.6. Micorrizas arbusculares en vid.

La *Vitis vinifera* será capaz de formar una asociación simbiótica mediante micorrizas arbusculares, sin embargo, las variedades de vid poseerán distinta afinidad según la especie de hongo. Las condiciones ambientales y geográficas, afectan directamente la diversidad de especies de hongos, micorrización, y los beneficios de esta en las plantas (Schreiner y Mihara, 2009).

Algunas prácticas agrícolas tendrán un directo impacto sobre la diversidad de hongos formadores de micorrizas presentes en el suelo del viñedo. Independiente de la intensidad, la labranza de suelo es posiblemente la práctica agrícola que influye más sobre la diversidad de dichos hongos, ya que afectará directamente sobre la integridad de la red micelial (Verbruggen y Kiers, 2010). La sobrefertilización de N y P también repercutirá negativamente la formación de micorrizas arbusculares, por ello se deben buscar nuevas alternativas para mantener la fertilidad del suelo con el objetivo de mejorar la formación de micorrizas, como por ejemplo la aplicación de enmiendas orgánicas para maximizar la recuperación de la fertilidad del suelo (Scotti *et al.*, 2015). La presencia de

cultivos de cobertura y/o de ciertas malezas, influirán en la formación de micorrizas arbusculares en el viñedo, ya que las plantas pueden producir efectos beneficiosos, inhibidores o neutros (Baumgartner *et al.*, 2010). La aplicación de pesticidas y herbicidas en el viñedo, provocarán un declive en la diversidad de los hongos formadores de micorrizas, agravando su efecto en suelos con deficiencias de nutrientes (Cheng y Baumgartner, 2004).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares que predominan en la vid, corresponden a los géneros: *Glomus*, *Rhizophagus*, *Funneliformis*, *Claroideoglomus*, y *Paraglomus* (Oehl *et al.*, 2005), presentando sutiles diferencias entre los tipos de suelo y edades de los viñedos, pero no según algún efecto estacional (Schreiner y Mihara, 2009).

La investigación realizada por Aguilar *et al.* (2017) corresponde al único estudio que establece la diversidad de especies de hongos formadores de micorrizas en los viñedos chilenos. Fue realizado mediante identificaciones morfológicas y moleculares de esporas recolectadas en diez sitios ubicados en cinco valles (Elqui, Casablanca, Cachapoal, Talca, e Itata), diferenciando entre sistema orgánico y sistema convencional para cada valle. Se lograron identificar 12 especies, en donde las más abundantes fueron *Funneliformis verruculosum*, *Septoglomus constrictus*, y *Septoglomus sp.* En la Figura 1 (Anexo 1), se observa la influencia de la latitud y el sistema de manejo, sobre la diversidad de morfotipos de hongos formadores de micorrizas.

La acción de micorrizas arbusculares sobre el viñedo promoverán el crecimiento y la salud de las plantas, lo cual provocará una reducción en la aplicación de fertilizantes y pesticidas. Además de mejorar la nutrición de las plantas, las micorrizas arbusculares inducirán cambios en el metabolismo secundario, ya que se aumentará la biosíntesis de algunos fotoquímicos como: Compuestos Fenólicos, Carotenoides, Fitoestrógenos, y generará una mayor actividad de las enzimas antioxidantes (Sbrana *et al.* 2014). Mediante una inoculación comercial de micorrizas arbusculares sobre un cultivo de vid, se provocó un aumento en los compuestos fenólicos totales de las hojas hasta en un 800% (Krishna *et al.*, 2005). A nivel nacional, solamente hay un estudio publicado que relaciona los efectos generados a partir de la inoculación comercial de micorrizas arbusculares sobre el contenido de compuestos fenólicos en la vid, realizado por Aguilar *et al.* (2017). En este, se aplicó el producto MYCOSYM TRI-TON ® sobre un cultivo de *Vitis vinifera* cv.

Cabernet Sauvignon in vitro, y en campo. Los tratamientos con inoculación generaron hojas con mayor concentración de compuestos fenólicos totales, en comparación al control.

En la actualidad, solamente hay un estudio publicado referente al efecto de la inoculación comercial de micorrizas arbusculares sobre el contenido de compuestos fenólicos de las bayas y el vino, el cual corresponde al realizado por Gabriele *et al.* (2015). Sin embargo, este no es representativo para la vitivinicultura nacional.

6. Metodología

6.1. Localización del muestreo.

El estudio se llevará a cabo en dos temporadas sucesivas en dos huertos destinados al cultivo de *Vitis vinífera* L. para la producción de vino tinto, ambos ubicados en la provincia de Colchagua, Región de O'Higgins, Chile. Las vides serán conducidas en espaldera bilateral con un marco de plantación de 2,0 x 1,5 m. Ambos huertos serán manejados de forma orgánica, y presentarán riego por goteo. El primero se ubicará en Peralillo utilizando var. Carménère, mientras que el segundo estará situado en Chimbarongo utilizando var. Pinot Noir; cada variedad deberá estar establecida sobre la misma especie de portainjerto. Para obtener precisión en los resultados, se recomienda trabajar en huertos que posean al menos 3 temporadas productivas estables pasadas de manejo orgánico, además que presenten similares características de suelo y manejos agronómicos ejercidos. Ambas variedades serán consideradas como ensayos independientes entre sí.

6.2. Diseño experimental, tratamientos y muestreo.

El diseño experimental será de bloques completos al azar utilizando 5 repeticiones en el campo. Cada repetición estará compuesta de 10 plantas de vid. Los tratamientos se dispondrán en una misma hilera. Las plantas dentro de cada repetición deben ser de un vigor similar y no presentar plagas o enfermedades visibles (Figura 2, Anexo 1). La unidad experimental corresponde a una repetición, es decir diez plantas de vid. Entre cada tratamiento, se dejará una zona intermedia de 5 plantas.

En ambos huertos, se realizarán 2 tratamientos y 1 tratamiento testigo, detallados en el Cuadro 1. El producto MYCOSYM TRI-TON® poseerá un contenido mínimo de 650 IMP/g (propágulos infecciosos de micorrizas), cuyo componente activo serán esporas viables,

hifas, y fragmentos de raíces micorrizadas, del hongo *Glomus intraradices*. En aquellas plantas en donde se realizará el tratamiento de inoculación, se aplicará el producto en la etapa fenológica BBCH 09 (apertura de yemas), depositándolo en el suelo mediante el bastón de aplicación MYCOSYM® a una profundidad de 20 cm, usando la dosis recomendada del producto (3 gramos por aplicación). En el caso del T1, se realizarán cuatro aplicaciones a 30 cm de distancia desde la corona de la planta, siguiendo los cuatro puntos cardinales. En cambio, en el T2 se realizarán dos aplicaciones en los puntos equidistantes de riego más cercanos a cada planta.

Cuadro 1: “Descripción de los tratamientos a realizar”.

Dosis/aplicación	0 g. por aplicación	3 g. por aplicación
Sin aplicación de MYCOSYM TRI-TON ®	T0	-
Aplicación de MYCOSYM TRI-TON ® en los cuatro puntos cardinales de cada planta.	-	T1
Aplicación de MYCOSYM TRI-TON ® en dos puntos de riego más cercanos a cada planta.	-	T2

Fuente: Elaboración propia, 2017.

Desde el envero hasta la cosecha, se realizarán muestreos cada 20 días. Los muestreos consistirán en extraer 100 bayas a partir de cada repetición, en forma aleatorizada desde diferentes partes del racimo, evitando su extracción en plantas ubicadas en los extremos. Cada muestra será transportada en un cooler hasta el laboratorio, almacenándolas a -20°C hasta su análisis. El criterio de cosecha para cada variedad se llevará a cabo según la medición de parámetros químicos como sólidos solubles totales y acidez titulable, y también según las características sensoriales de la baya, mediante degustación.

6.3. Determinación de parámetros productivos y químicos en bayas.

A partir de las muestras correspondientes a 100 bayas obtenidas por cada repetición, se determinarán diversos parámetros, los cuáles serán: peso total de las bayas (g), peso de hollejos (g), peso de semillas (g), número de semillas, sólidos solubles (°Brix), pH y acidez titulable (g ácido tartárico/L). También se medirán parámetros productivos como el peso de racimos promedio, número de racimos promedio y diámetro de brotes, por cada repetición.

6.4. Preparación de muestras para análisis químicos en bayas.

Para analizar el nivel de compuestos fenólicos en las muestras, inicialmente se deberán tratar mediante la metodología descrita por Izquierdo *et al.* (2015). En esta, se recolectarán aleatoriamente 50 bayas a partir de cada repetición, estas se someterán a

una separación de los hollejos y semillas, cuantificando su peso final mediante una balanza analítica, para después realizar una molienda manual mediante un mortero, dividiendo cada molienda en dos extracciones. La primera extracción usará una solución de metanol-agua (80:20 v/v), mientras que la segunda utilizará una solución de acetona-agua (80:20 v/v), ambas con un volumen total de 100 ml sobre un matraz de erlenmeyer. Después de 60 min de maceración a 20°C con una agitación mecánica, se separará la fracción líquida de la sólida mediante un tamiz. Una vez concluida la filtración, se combinarán las fracciones líquidas de ambas extracciones, para después centrifugarlas a 2500 g por 5 minutos y posteriormente mediante un evaporador rotatorio a 30°C, se eliminará el metanol y la acetona, dejando solo la solución acuosa. Esta solución se ajustará a un volumen final de 100 ml con agua destilada, y se filtrará con una membrana que posea un tamaño de poro de 0,45 µm.

6.5. Caracterización espectrofotométrica de compuestos fenólicos en bayas.

El contenido fenólico total se determinará mediante espectrometría UV a 280 nm usando ácido gálico como patrón (Glories, 1984). El contenido total de proantocianidinas se determinará usando metilcelulosa como agente precipitante (Sarneckis et al., 2006). El contenido total de antocianinas se cuantificará utilizando el método descrito por Ribereau-Gayon y Stonestreet (1965). Se realizará una cuantificación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante HPLC-DAD, mediante la metodología descrita en Cáceres *et al.*, (2012). Los análisis se realizarán en el Laboratorio de Enología de la PUCV.

6.6. Vinificación de vinos tintos.

En la cosecha, cada repetición se someterá a un proceso de vinificación. Se introducirán los racimos por una despalilladora-moledora, trasladándolos a depósitos de plástico de uso alimentario de 25 L. De ser necesario, el mosto se ajustará el pH a 3,5 mediante la adición de ácido tartárico, y se regulará el nivel de nitrógeno asimilable por la levadura (YAN) hasta 300 mg/L. A continuación, se inoculará con una levadura comercial (20 g/hL) y se mantendrá la T° del mosto a 25-28 °C hasta que posea 2 g/L de azúcar. Posteriormente, se inoculará con bacterias lácticas según dosis del fabricante. Después de la fermentación maloláctica, se estabilizará en frío por 10 días a 5°C, se ajustarán los

niveles de SO₂ libre a 30 mg/l, y se embotellarán en botellas de vidrio c de 750 mL (Cáceres *et al.*, 2012).

6.7. Análisis de vinos.

Después de 1 mes de almacenamiento del vino obtenido por cada repetición, se extraerá una botella para realizarle un análisis químico y un análisis sensorial, ambos en el Laboratorio de Enología de la Escuela de Agronomía de la PUCV. Los análisis químicos serán los mismos utilizados en la metodología enunciada en el ítem 6.5, adicionalmente la intensidad de colorante se determinará mediante el método descrito por Glories (1984).

6.8. Medición de la colonización micorrícica.

Cada 2 meses desde la aplicación de MYCOSYM TRI-TON ® hasta el fin del proyecto, en cada repetición se cuantificará el % de micorrización mediante la técnica de Trouvelot *et al.* (1986), a partir de 30 segmentos de 1 cm de raíces superficiales teñidas con azul tripán.

7. Referencias

- Aguilar, A. 2017. Polifenoles como respuesta a hongos micorrícicos arbusculares en vid (*Vitis vinifera* L.). 111 p. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Andrade, A. 2010. Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. *Revista ciencia*. 61(4):84-90.
- Avalos, A. y Perez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* (España) 2(3):119-145.
- Araim, G., Saleem, A., Amason, J., Charest, C. 2009. Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *J. Agric. Food Chem* 57:2255-2258.
- Balestrini, R. *et al.* 2010. Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera* L., a typical mediterranean fruit crop. *Environ Microbiol Rep* 2:594:604.
- Baumgartner, K., Fujiyoshi, P., Smith, R., Bettiga, L. 2010. Weed flora and dormant-season cover crops have no effects on arbuscular mycorrhizae of grapevine. *Weed Res* 50:456–466.
- Blouin, J. Y Guimberteau, G. 2004. Maduración y madurez de la uva. 157 p. Editorial Mundiprensa, Madrid. España.

- Buzzetti, C. y Banfi, S. 2017. Boletín del vinos y pisco: producción, precios y comercio exterior, avance a diciembre de 2016. 26 p. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile.
- Cáceres, A., Peña, A., Galvez, A., Obreque, E., Remigio, L and Canals, J. 2012. Phenolic compositions of grapes and wines from cultivar cabernet sauvignon produced in Chile and their relationship to commercial value. *J. Agric. Food Chem.* 60:8694-8702.
- Cáceres, A. 2013. Flavanoles de bayas y vinos y la influencia de factores enológicos sobre sus características químicas y sensoriales. 232 p. Tesis doctoral. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, España.
- Campbell, C, Souster, W. 1982. Loss of organic matter and potentially mineralizable nitrogen from Saskatchewan soils due to cropping. *Can J soil, sci*, 62(4), 651-656.
- Cheng, X. and Baumgartner, K. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi-mediated nitrogen transfer from vineyard cover crops to grapevines. *Biol Fertil Soils* 40:406–412.
- Gabriele, M., Gerardi, C., Longo, V., Lucejko, J., Degano, I., Pucci, L. and Domenici, V. 2016. The impact of mycorrhizal fungi on *Sanvigesse* red wine production: Phenolic compounds and antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology* 72:310-316.
- Gil, G. y Pszczółkowski, P. 2015. Viticultura, fundamentos para optimizar producción y calidad. 669 p. 2da ed. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago. Chile.
- Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2e partie. Measure, origine et interpretation. *Connaiss. Vigne Vin.* 18:253-271.
- Hart, M. and Reader, R. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytologist.* 153: 335-344.
- Heijden, M., Scheublin, T., Brader, A. 2004. Taxonomic and functional diversity in arbuscular mycorrhizal fungi - is there any relationship?. *New Phytologist.* 164:201-204.
- Hidalgo, T. 2003. Tratado de Enología. 1432 p. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España.
- Hrazdina, G., Parsons, G., y Mattick, L. 1984. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 35:220-227.
- Izquierdo, A., Peña, A., Lopez, R. and Obreque, E. 2015. Low molecular weight phenols, and flavanol fractions in *Vitis vinifera* L. Cv Carmenere skins and seeds by differential solvent extraction and high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.* 49:1127-1142.
- Krishna, H., Singh, S., Sharma, R., Khawale, R. 2005. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization. *Sci Hortic-Amsterdam* 106:554–567.
- Nasim, G. 2012. Arbuscular mycorrhizae for sustainable agricultura. Crop production for agricultural improvement. Springer science. Chapter 23.

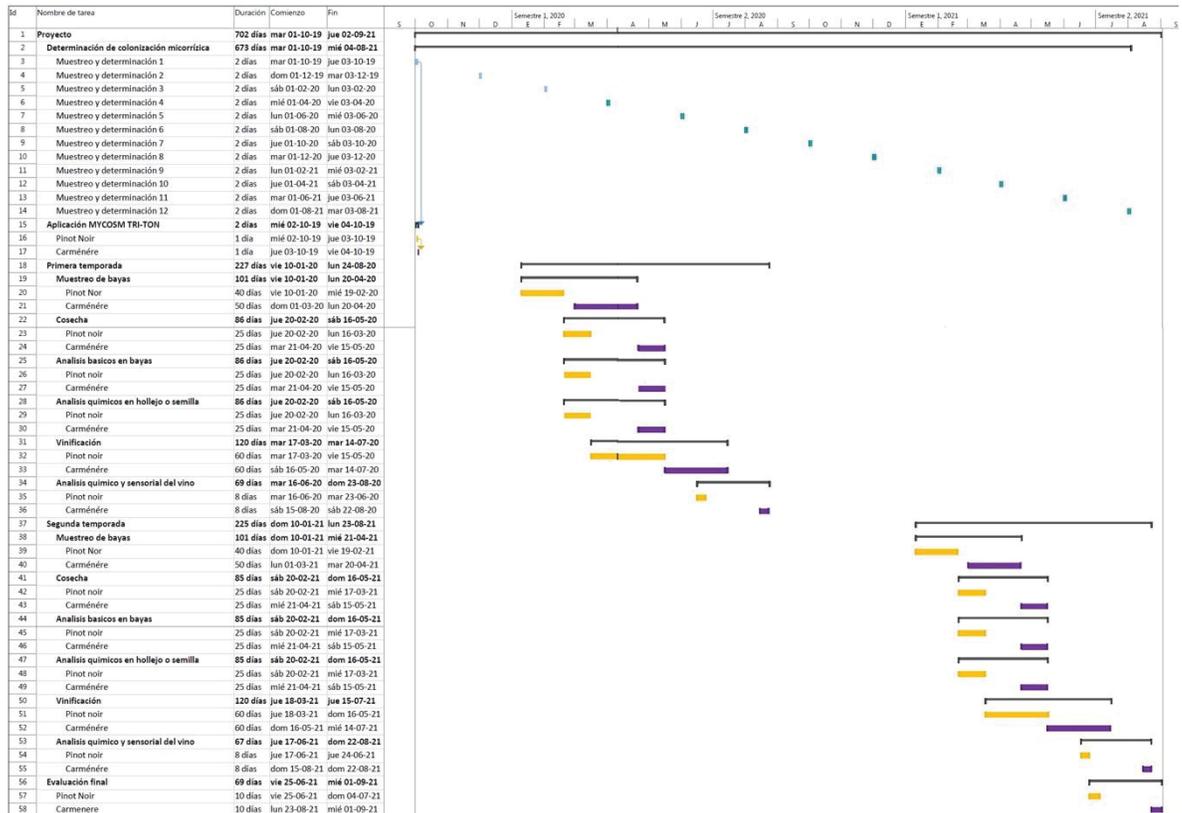
- Oldroyd, G. 2013. Spear, fiend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* 11(4):252-63.
- Parniske, M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol* 6:763-775.
- Pino, C. 2013. Manual de vitivinicultura orgánica. 126 p. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Católica del Maule, Curicó, Chile.
- Price, S., Breen, P., Valladao, M. y Watson, B. 1995. Cluster sun exposure and quercetin in pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 46:187-194.
- Redecker, D. 2000. Glomalean fungi from the ordovician. *Science* 289: 1920–1921 .
- Ribereau, J. and Stonestreet, E., 1965. Le dosage des anthocyanies dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* 9, 2649-2652.
- Roldán, A., Caravaca, F., Hernández, M. T., García-Izquierdo, C., Sánchez-Brito, C., Velásquez, M. y Tiscareño, M. 2003. No-tillage, crop residue additions, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in Patzcuaro watershed (Mexico). *Soil Till. Res.* 72: 65-E.
- Ruggiero, A., Vitalini, S., Burlini, N., Bernasconi, S. & Iriti, M. 2013. Phytosterols in grapes and wine, and effects of agrochemicals on their levels, *Food Chemistry* 141(4):3473-9.
- Ruiz, Y., Gomez, E., Fernandez, J., Gil, R., Martinez, A. y Lopez, J. 2013. Mejora del contenido fenólico y de las características cromáticas en uvas y vinos utilizando elicitors. 9 p. In 28º reunión anual del grupo de trabajo de experimentación en vitivinicultura y enología, Murcia. 16-17 de abril de 2013. Murcia, España.
- SAG, 2015. Catastro vitícola nacional 2015. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl/content/catastro-viticola-nacional-2015>. Leído el 11 de septiembre de 2017.
- Sarneckis, C., Damberg, R., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. and Smith, P., 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methylcellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Aust. J. Grape Wine Res.* 12, 39-49.
- Sbrana, C., Avio, L. y Giovannetti, M. 2014. Beneficial mycorrhizal symbionts affecting the production of health-promoting phytochemicals. *Electrophoresis.* 35(11):1535-46.
- Schreiner, R. and Mihara, K. 2009. The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (*Vitis vinifera L.*) in an arid climate. *Mycorrhiza* 17:551-562.
- Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A. y Rao, M. 2015. Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(2):333-352.

- Spedding, T. A., Hamel, C., Mehuys, G. R. y Madramootoo, C. A. 2004. Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biol Biochem*, 36(3), 499-512.
- Smith, S and Smith, F. 2012. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth *mycologia* 104(1):1-13.
- Smith, S. and Read, D. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 800p. 3rd ed. Academic press.
- Toussaint, J., Smith, F. y Smith, S. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza* 17:291-297.
- Trouvelot, S., Bonneau, L., Redecker, D. and Van Tuinen, D. 2015. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 35:1449-1467.
- Verbruggen, E. y Kiers, T. 2010. Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evol Appl* 3:547–560.
- Wang, B., Qiu, Y. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16:299–363.
- Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y practicos*. 223p. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España.
- Zeng, Y.; Guo, L. P.; Chen, B. D.; Hao, Z. P.; Wang, J. Y.; Huang, L. Q.; Yang, G.; Cui, X. M.; Yang, L.; Wu, Z. X.; Chen, M. L.; Zhang, Y. 2013 Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and prospectives. *Mycorrhiza* 23:253-265.

8. Plan de trabajo

Se hace necesario señalar de que los manejos culturales y agronómicos ejecutados sobre el cultivo de vid, serán los mismos para ambas variedades. En la Figura 3 se observa el plan de trabajo a seguir para la ejecución de este proyecto.

Figura 3: Plan de trabajo del proyecto.



Fuente: Elaboración propia a partir de Microsoft Project, 2017.

9. Resultados esperados

En la actualidad aún no existen publicaciones que correlacionen de forma directa la inoculación de micorrizas arbusculares sobre la composición fenólica o atributos sensoriales de los vinos a elaborar. La única investigación que abordó esta temática fue realizada por Gabriele *et al.* (2016), pero como un objetivo secundario. En esta, se pudo concluir que los vinos elaborados a partir de un cultivo de vid con simbiosis comercial de micorrizas, presentaron un nivel significativamente mayor del compuesto Flavonoles, en comparación a vinos elaborados a partir de uvas obtenidas de vitivinicultura convencional.

Dicho lo anterior, se puede esperar que al inocular micorrizas arbusculares a partir de la aplicación de un producto comercial sobre un cultivo de vid, aumentará el contenido de compuestos fenolicos, lo cual repercutirá en atributos de amargor y astringencia al momento de la percepción del vino. Sin embargo, para poder concluir fehacientemente se deberá realizar un experimento bajo territorio chileno, y con variedades que sean representativas para la vitivinicultura nacional.

A causa de los diversos efectos generados a partir de la inoculación de micorrizas arbusculares sobre un cultivo de vid, se puede intuir que también generará efectos productivos y/o sobre la calidad frutal en términos de concentración de compuestos fenólicos.

Se puede avalar que las bayas y los vinos elaborados a partir de las repeticiones del tratamiento testigo, no poseerán grandes diferencias con respecto a la concentración de compuestos fenólicos o atributos sensoriales, ya que las vides se comportarán de forma similar al estar situados bajo un mismo grado de elevación, y al estar manejados de la misma manera, con respecto a poda, fertilización, riego, etc.

Se intuye que habrá una respuesta más directa en la correlación en el T₂ en comparación al T₁, ya que habrá una mayor probabilidad de colonización por parte de las micorrizas arbusculares al estar situadas en una condición que posee una mayor masa radicular y nivel de humedad.

Por otro lado, los tratamientos con inoculación de micorrizas arbusculares podrían madurar más rápido en comparación al testigo, lo cual repercutirá significativamente en la concentración de compuestos fenólicos que posee la baya en comparación al tratamiento testigo, solo si ambas fueron cosechadas en la misma fecha.

10. Organización de cargos y funciones

10.1. Director del proyecto

- Formación o grado académico: Ingeniero Agrónomo

El profesional a cargo tendrá las funciones de pagar remuneraciones a los otros operarios, además de ser el responsable de destinar y autorizar recursos en la compra y arriendo de los distintos equipos e insumos de operación que requiere el proyecto.

Realizará a cabalidad la totalidad de las metodologías técnicas especificadas, realizando para ello las labores de establecimiento del ensayo, aplicaciones, manejo de unidades muestrales, realización de metodologías analíticas de laboratorio. Además, debe recolectar y tabular los datos obtenidos en las mediciones del ensayo, para poder realizar su análisis una vez finalizado éste.

10.2. Profesionales de apoyo y asesoramiento

- Formación o grado académico: Ayudante de enólogo.

Dicho profesional tendrá la función principal de realizar una vinificación a partir de uvas obtenidas de cada repetición del ensayo, produciendo de este modo 30 distintos vinos tintos del cv. Carménère y cv. Pinot Noir, los cuáles serán utilizados para realizar diversas cuantificaciones en la concentración de los compuestos fenólicos que presenten y someterlos a un análisis sensorial. Realizando estas labores en conjunto y cooperación del Ingeniero agrónomo.

11. Presupuesto

Los recursos necesarios para ejecutar el proyecto alcanzan la suma total de \$40.608.974 CLP, cuyo detalle se compone de costos de recursos humanos, subcontratos, gastos de inversión, gastos de operación, y materiales e insumos, incluido un 5% de imprevistos. Destallados en cuadro 2 y 3 (anexo 2), y resumidos en cuadro 4 y 5.

Cuadro 4: Presupuesto total por cuenta y aportes sobre ellas.

CUENTA	FONDO CONCURSABLE	APORTE EMPRESA		TOTAL (\$MM)	% SOBRE EL TOTAL
		PECUNIARIO	NO PECUNIARIO		
Total recursos Humanos	\$ 15.300.000	-	-	\$ 15,30	37,68%
Total subcontratos	-	\$ 2.835.000	\$ 2.625.000	\$ 5,46	13,45%
Total gastos de inversión	\$ 13.126.282	-	\$ 385.486	\$ 13,51	33,28%
Total gastos de operación	-	\$ 822.797	\$ 3.023.081	\$ 3,84	9,46%
Total materiales e insumos	-	\$ 2.491.329	-	\$ 2,49	6,13%
Total	\$ 28.426.282	\$ 12.182.692		\$ 40,60	100%
Porcentaje de aporte (%)	70%	30%		100%	100%
Total (\$MM)	\$ 28,42	\$ 12,18		\$ 40,60	

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 5: Presupuesto total por año, según tipo de aporte.

CUENTA	TOTAL AÑO 1 (CLP)	TOTAL AÑO 2 (CLP)	Total (\$MM)
Total Recursos Humanos			
<i>Pecuniario</i>	\$ 7.650.000	\$ 7.650.000	\$ 15,30
<i>No Pecuniario</i>			
Total Subcontratos			
<i>Pecuniario</i>	\$ 1.417.500	\$ 1.417.500	\$ 2,84
<i>No Pecuniario</i>	\$ 1.312.500	\$ 1.312.500	\$ 2,62
Total Gastos de Inversión			
<i>Pecuniario</i>			
<i>No Pecuniario</i>	\$ 6.755.884	\$ 6.755.884	\$ 13,51
Total Gastos de Operación			
<i>Pecuniario</i>	\$ 411.398	\$ 411.398	\$ 0,82
<i>No Pecuniario</i>	\$ 1.511.540	\$ 1.511.540	\$ 3,02
Materiales e insumos			
<i>Pecuniario</i>	\$ 1.455.817	\$ 1.035.512	\$ 2,49
<i>No Pecuniario</i>			
Total(MM\$)			
<i>Pecuniario</i>	\$ 10.934.715	\$ 10.514.410	\$ 24,45
<i>No Pecuniario</i>	\$ 9.579.924	\$ 9.579.924	\$ 16,14
Porcentaje del total			
<i>Pecuniario</i>	53,30%	52,33%	60,24%
<i>No Pecuniario</i>	46,70%	47,67%	39,76%

Fuente: Elaboración propia.

Cabe recalcar que al realizar el presupuesto se definió una rentabilidad promedio de 8.000 Kg/Ha, sobre un marco de plantación de 1,5 m x 2 m. Además, una vez calculada la rentabilidad por árbol, se procedió a estimar los litros de vino a producir por repetición según la equivalencia de que 1 Kg de fruta producirá 0,75 L de vino, concluyendo así de que se producirán aproximadamente 20 L por cada repetición, 150 L por cada variedad, y en total 300 L en todo el experimento.

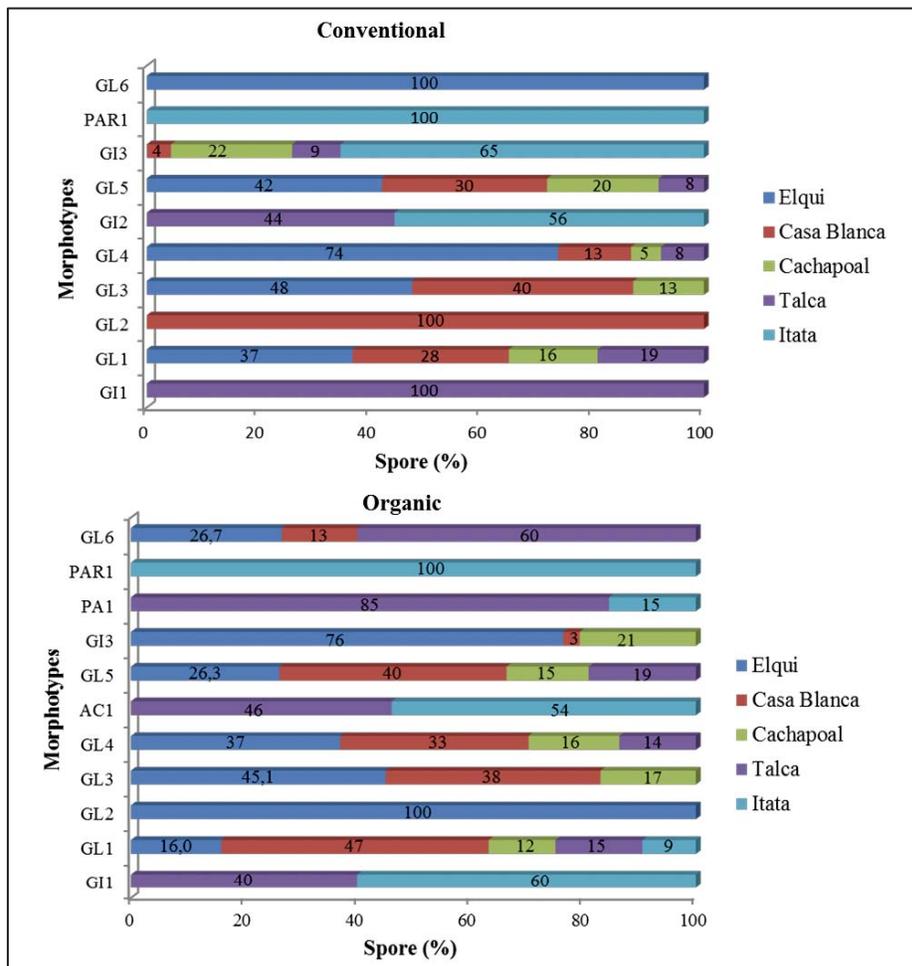
El proyecto será postulado en FONDEF de CONICYT, a través del programa IDeA, el cual respalda económicamente proyectos de investigación con un plazo máximo de ejecución de 24 meses, otorgando hasta el 70% del costo del proyecto, con un límite máximo de \$150.000.000 aportados por el fondo.

El 30% restante del presupuesto puede, inminentemente, ser financiado por una entidad privada interesada en la investigación o bien por los aportes de una persona Natural, con un mínimo de aporte pecuniario de 10% del total.

12. Anexos

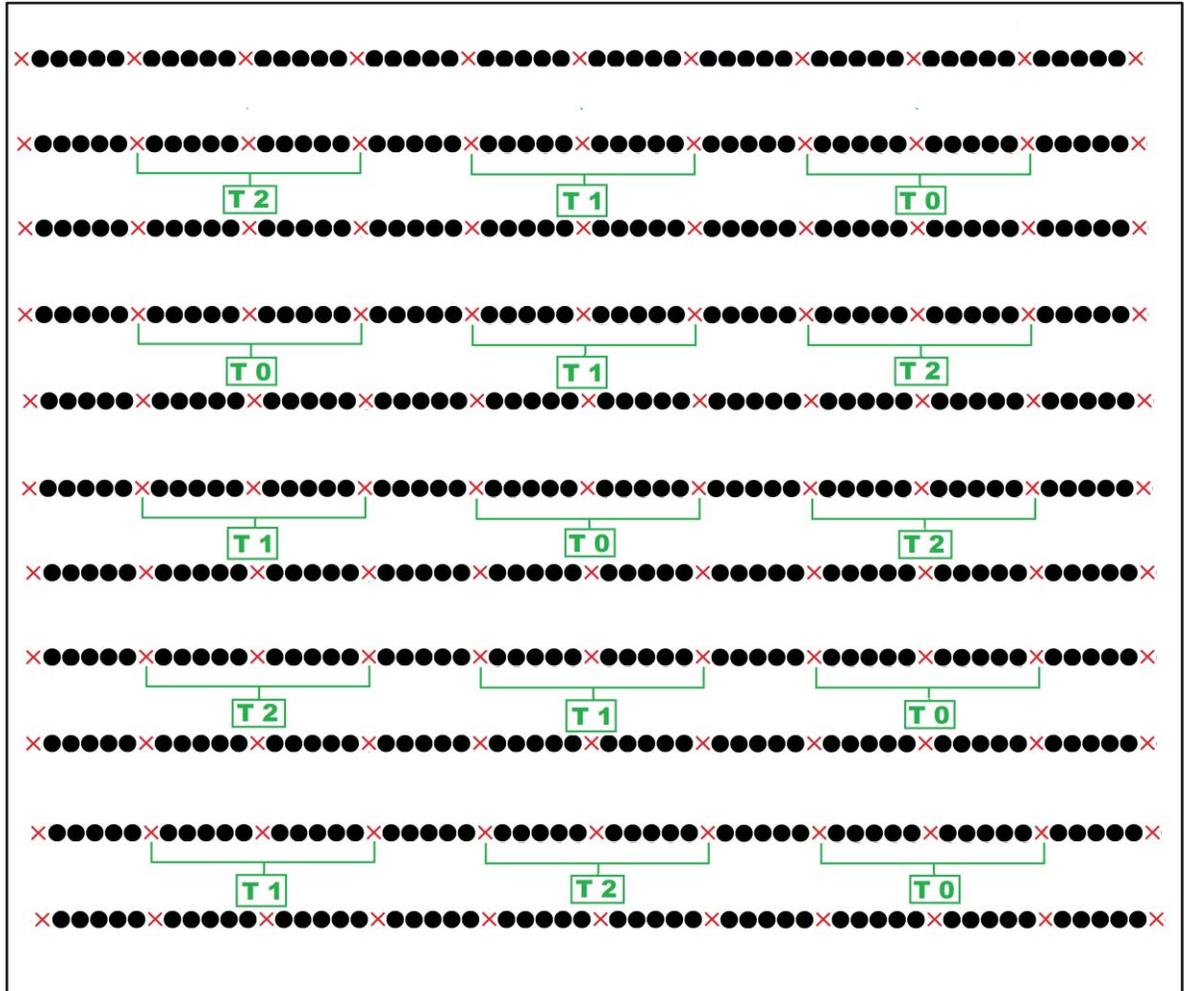
12.1. Anexo 1

Figura 1: Distribución de diferentes morfotipos de hongos formadores de micorrizas arbusculares, en cinco valles de vid chilenos, según sistema de producción convencional y orgánico. 1. G11: *Scutellospora* sp. 2. GL1: *Funneliformis verruculosum*. 3. GL2: *Septogloimus* no cultivado. 4. GL3: *Septogloimus* no cultivado. 5. GL4: *Septogloimus* no cultivado. 6. GI2: *Claroideogloimus etunicatum*. 7. AC1: *Acaulospora* sp. 8. GL5: *Septogloimus constrictus*. 9. GI3: *Cetospora gilmorei*. 10. PA1: *Pacispora scintillans*. 11. PAR1: *Paragloimus* sp. 12. GL6: *Sclerocystis* sp.



Fuente: Extraído a partir de Aguilar (2017).

Figura 2: Diseño de un bloque experimental que contiene todos los tratamientos. Cada punto corresponde a una planta dentro de la hilera. Cruces corresponden a postes intermedios del sistema de conducción de espaldera.



Fuente: Elaboración propia, 2017.

12.2. Anexo 2

Cuadro 2: Presupuesto expandido de costos, RR. Humanos, gastos y subcontratos.

RECURSOS HUMANOS				
Item	Cantidad	Unidad	Valor unitario (CLP)	Total (CLP)
Ingeniero Agronomo (1)	18	meses	\$ 600.000,00	\$ 10.800.000,00
Ayudante de Enologo (1)	6	meses	\$ 550.000,00	\$ 3.300.000,00
Apoyo tecnico (1)	120	dias	\$ 10.000,00	\$ 1.200.000,00
TOTAL				\$ 15.300.000

SUBCONTRATOS				
Item	Cantidad	Unidad	Valor unitario (CLP)	Total (CLP)
Arriendo de vehiculo	100	dias	\$ 25.000	\$ 2.500.000
Arriendo de laboratorio	90	dias	\$ 30.000	\$ 2.700.000
Sub-total				\$ 5.200.000
5% de imprevistos				\$ 260.000
TOTAL				\$ 5.460.000

GASTOS DE INVERSIÓN				
Item	Cantidad	Unidad	Valor unitario (CLP)	Total (CLP)
Baston de aplicación MYCOSYM	1	C/U	\$ 199.990	\$ 199.990
Maquina despalladora-moledora ENO3, ENOITALIA	1	C/U	\$ 464.100	\$ 464.100
Bomba centrifuga coaxial Euro 40	1	C/U	\$ 737.800	\$ 737.800
Monoblock semi-automatico (filtro de placas + llenadora + tapadora + etiquetadora)	1	C/U	\$ 8.211.000	\$ 8.211.000
Estanque acero inoxidable 304, capacidad de 25 L	15	C/U	\$ 178.500	\$ 2.677.500
Notebook HP	1	C/U	\$ 199.990	\$ 199.990
Impresora Brother	1	C/U	\$ 49.990	\$ 49.990
Congelador horizontal	2	C/U	\$ 134.000	\$ 268.000
Cooleer	2	C/U	\$ 29.990	\$ 59.980
Sub-total				\$ 12.868.350
5% de imprevistos				\$ 643.418
TOTAL				\$ 13.511.768

GASTOS DE OPERACIÓN						
Item	Cantidad	Unidad	Valor unitario (UF)	Valor UF (01/10/17)	Valor unitario (CLP)	Total (CLP)
Almuerzos	120	dias			\$ 2.990	\$ 358.800
Plan telefonico basico empresa (3)	6	meses			\$ 9.990	\$ 59.940
Gasolina 93 H	400	litros			\$ 745	\$ 298.000
Lapices pasta BIC negro	12	C/U			\$ 250	\$ 3.000
Corrector, paper matte	2	C/U			\$ 990	\$ 1.980
Cuadernos Torre	2	C/U			\$ 1.990	\$ 3.980
Archivador Torre	2	C/U			\$ 2.990	\$ 5.980
Corchetera	2	C/U			\$ 1.990	\$ 3.980
Resma de 500 hojas	2	C/U			\$ 2.990	\$ 5.980
Pizarra blanca 70x100 cm	2	C/U			\$ 19.690	\$ 39.380
Plumón azul para pizarra acrílica, Artel	2	C/U			\$ 649	\$ 1.298
Plumón rojo para pizarra acrílica, Artel	2	C/U			\$ 649	\$ 1.298
Cuantificación de polifenoles totales en bayas	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927
Cuantificación de antocianinas totales en bayas	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927
Cuantificación de proantocianidinas totales en bayas	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927
Determinación de polifenoles de bajo peso molecular en bayas	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927
Cuantificación de polifenoles totales en vino	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927,04
Cuantificación de antocianinas totales en vino	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927,04
Cuantificación de proantocianidinas totales en vino	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927,04
Determinación de polifenoles de bajo peso molecular en vino	30	C/U	0,3	26.658,56	\$ 7.998	\$ 239.927,04
Intensidad de colorante	30	C/U	0,2	26.658,56	\$ 5.332	\$ 159.951
Análisis sensorial de cada muestra de vino	30	C/U	1	26.658,56	\$ 26.659	\$ 799.757
Sub-total						\$ 3.662.740
5% de imprevistos						\$ 183.137
TOTAL						\$ 3.845.878

Fuente: Elaboración Propia.

Cuadro 3: Presupuesto expandido de costos, materiales e insumos.

MATERIALES E INSUMOS				
Item	Cantidad	Unidad	Valor unitario (CLP)	Total (CLP)
Materiales e insumos de campo				
Identificavitos plastificados	300	C/U	\$ 500	\$ 150.000
Engrapadora Redline	1	C/U	\$ 9.990	\$ 9.990
Grapas Redline 14 mm (1000 pcs)	1	C/U	\$ 2.490	\$ 2.490
Balanza digital 50 Kg	1	C/U	\$ 63.990	\$ 63.990
Balanza digital (1000g - 0,1g)	1	C/U	\$ 6.990	\$ 6.990
Cuchillo cartonero	2	C/U	\$ 990	\$ 1.980
Gamelas para cosecha	15	C/U	\$ 10.990	\$ 164.850
Materiales e insumos de vinificación				
Levaduras secas activas (500 g)	1	C/U	\$ 45.696	\$ 45.696
Acido tartarico (500 g)	1	C/U	\$ 38.080	\$ 38.080
Nutrientes (1000 g)	1	C/U	\$ 61.880	\$ 61.880
Metabisulfito de potasio (500 g)	1	C/U	\$ 21.420	\$ 21.420
Termometros pegables	30	C/U	\$ 990	\$ 29.700
Densímetro	3	C/U	\$ 4.990	\$ 14.970
Botellas	700	C/U	\$ 250	\$ 175.000
Corcho tecnico	700	C/U	\$ 150	\$ 105.000
Material analítico				
Matraz de erlenmeyer 250 ml	12	C/U	\$ 1.890	\$ 22.680
Tapones plasticos para matraz	12	C/U	\$ 1.090	\$ 13.080
Tapones plasticos para Matraz	12	C/U	\$ 1.259	\$ 15.108
Agua destilada 5 L	2	C/U	\$ 1.703	\$ 3.406
Hidroxido de sodio 1L	4	C/U	\$ 8.200	\$ 32.800
Etano neutralizadol 1 L	6	C/U	\$ 4.344	\$ 26.064
Probeta de 50 ml	10	C/U	\$ 3.954	\$ 39.540
Vaso precipitado de vidrio de 100 ml	10	C/U	\$ 1.246	\$ 12.460
Bureta recta de 50 ml	2	C/U	\$ 15.600	\$ 31.200
Agitador magnetico	2	C/U	\$ 80.990	\$ 161.980
Ph-metro	2	C/U	\$ 69.990	\$ 139.980
Soporte de bureta	2	C/U	\$ 15.990	\$ 31.980
Mortero	3	C/U	\$ 14.990	\$ 44.970
Agitador varilla de vidrio	5	C/U	\$ 859	\$ 4.295
Tamiz de laboratorio	5	C/U	\$ 4.990	\$ 24.950
Probeta de 500 ml	5	C/U	\$ 12.490	\$ 62.450
Rotavapor	5	C/U	\$ 149.990	\$ 749.950
Matraz de aforo 100 ml	5	C/U	\$ 3.470	\$ 17.350
Filtros membrana 25 mm de poro 0,45. (200 unidades)	2	C/U	\$ 7.560	\$ 15.120
Embudo de vidrio analítico mediano	5	C/U	\$ 6.259	\$ 31.295
Sub-total				\$ 2.372.694
5% de imprevistos				\$ 118.635
TOTAL				\$ 2.491.329

Fuente: Elaboración Propia.