



**universidad
de león**

TESIS DOCTORAL

**NIVELES DE ALMIDÓN EN INJERTOS DE VID Y SU
INFLUENCIA EN LA TASA DE MORTALIDAD EN VIVERO**

Mario Sánchez García

INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS

Dirigida por:

Dr. Juan José Rubio Coque

Dr. José Enrique Garzón Jimeno

LEÓN, 2019

Esta tesis ha sido realizada en las instalaciones del Instituto de Investigación de la Viña y el Vino de la Universidad de León y en la empresa RGA Bio-investigación S.L. spin-off de la Universidad de León, gracias a la concesión de una ayuda de Doctorado Industrial (DI-15-07721) otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad en la convocatoria de 2015, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y técnica y de Innovación 2013-2016. Además, parte de la investigación se ha realizado dentro del proyecto de I+D: “Mortalidad de injertos de vid en vivero: relación de niveles de almidón en portainjertos con mortalidad”, aprobado por CDTI y concedido a Viveros Villanueva Vides, S.L.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. José Enrique Garzón Jimeno y al Dr. Juan José Rubio Coque, directores de esta tesis doctoral, por darme la oportunidad de realizar esta investigación, por prestarme su tiempo y por todo el apoyo que me han dado durante el proceso.

En segundo lugar, agradezco enormemente a la gran familia que es Viveros Villanueva Vides por hacerme sentir uno más y por facilitarme las tareas de investigación.

Además, he de agradecer a mis compañeros y compañeras por ayudarme con su experiencia y consejos durante todos estos largos años de estudio. Especialmente al Dr. Miguel Ángel Olego Morán, al Dr. Miguel Javier Quiroga Martínez y a Jesús Esteban Medina Turienzo por sus críticas, siempre constructivas, pero sobre todo porque han sido un gran apoyo.

No puedo olvidar la ayuda recibida por parte del Instituto de Investigación de la Viña y el Vino de la Universidad de León al permitirme utilizar sus instalaciones, y al buen trato que he recibido por parte de sus integrantes.

Por último, agradecer a toda mi familia el ánimo que me dan cada día y sin el que no podría haber terminado esta tesis.

DEDICATORIA

Por todo el cariño que me dan.

Por ser parte de quién soy.

A mis padres.

A Gioni.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	11
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ABREVIATURAS	19
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	23
I.1. BREVE INTRODUCCIÓN A LA PRODUCCIÓN DE PLANTA DE VID INJERTADA	25
I.1.1. VARIEDADES DE PORTAINJERTO	26
I.1.2. VIVERO DE VID: PROCESO PRODUCTIVO DE PLANTA INJERTADA	29
I.1.2.1. FASES DEL PROCESO PRODUCTIVO	29
I.1.2.2. TASA DE MORTALIDAD	33
I.2. BREVE INTRODUCCIÓN A LA FISIOLOGÍA VEGETAL	34
I.2.1. HISTOLOGÍA DEL SARMIENTO DE VID	34
I.2.2. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN MINERAL	36
I.2.3. BIOSÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DEL ALMIDÓN	40
I.2.3.1. MONOSACÁRIDOS: FRUCTOSA Y GLUCOSA	41
I.2.3.2. DISACÁRIDOS: SACAROSA	42
I.2.3.3. POLISACÁRIDOS: ALMIDÓN	43
I.3. DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN	45
I.3.1. COLORIMETRÍA	46
I.3.2. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA	47
I.3.2.1. ESPECTROSCOPIO INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER	48
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	53
II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	53
II.2. OBJETIVOS	53
II.2.1. OBJETIVO GENERAL	53
II.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS	59
III.1. MATERIAL VEGETAL	59
III.2. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAR ALMIDÓN EN TEJIDOS LEÑOSOS	60
III.3. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE ALMIDÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA	65
III.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
III.5. ENSAYOS PARA AUMENTAR EL CONTENIDO DE ALMIDÓN EN SARMIETOS DE PLANTAS MADRE	77
III.5.1. LOCALIZACIÓN	77
III.5.2. APLICACIÓN DE MAGNESIO FOLIAR SOBRE SARMIENTOS DE PLANTAS MADRE	77
III.5.3. APLICACIÓN DE FERTILIZACIÓN EDÁFICA EN CULTIVO DE PLANTAS MADRE	81
III.6. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ALMIDÓN Y LA MORTALIDAD	82

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS	85
IV.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ENZIMÁTICO	85
IV.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE TRITURADO	85
IV.1.2. DIGESTIÓN Y EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN CON KOH	85
IV.1.3. MODIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON ENZIMAS DEGRADATIVAS	88
IV.1.4. DESARROLLO DEL PROTOCOLO	89
IV.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO PREDICTIVO DEL CONTENIDO DE ALMIDÓN MEDIANTE FTIR Y PLS	91
IV.2.1. ELABORACIÓN DE LAS BASES DE DATOS	91
IV.2.2. CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO	92
IV.2.3. DESARROLLO DEL PROTOCOLO	102
IV.3. COMPARATIVA ENTRE AMBOS MÉTODOS ANALÍTICOS	103
IV.4. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MAGNESIO FOLIAR SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN	105
IV.4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE MUESTREO DE SARMIENTOS DE PLANTA MADRE	105
IV.4.2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MAGNESIO FOLIAR SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN	110
IV.4.3. COMPARATIVA ENTRE VALORES DE ALMIDÓN Y PORCENTAJE DE PLANTA VIABLE	113
IV.5. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE FERTILIZANTES EN EL SUELO SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN	115
IV.6. RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ALMIDÓN EN PORTAINJERTOS Y LA MORTALIDAD EN PLANTA INJERTADA	119
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	125
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES	133
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cronograma del proceso productivo de planta de vid injertada en España.	33
Tabla 2. Regiones en las que se divide el espectro infrarrojo y región más utilizada de forma general tanto en análisis cualitativos como cuantitativos. Adaptada de Skoog y Leary (1993, p. 297).	47
Tabla 3. Relación de la cantidad de portainjertos analizados de cada una de las variedades, durante cada año de estudio.	59
Tabla 4. Valoración del almidón de cada extracción. Se realizan dos repeticiones (R1, R2) y una valoración de referencia (B) para validar cada analítica.	65
Tabla 5. Relación de las 18 calibraciones y las variables que las definen. A: tamaño de la base de datos, B: tipo de procesado de la región del espectro, C: tipo de ajuste de la línea base.	71
Tabla 6. Relación de las diferentes herramientas y análisis estadísticos empleados.	72
Tabla 7. Relación de tratamientos con base de magnesio y dosis aplicadas.	78
Tabla 8. Relación de tratamientos y dosis de fertilizantes aplicadas al suelo.	81
Tabla 9. Cantidades relativas (% del total) de almidón obtenido en cada extracción y número de casos comprendidos en cada intervalo. E1: primera extracción; E2: segunda extracción; E3: tercera extracción, y E4: cuarta extracción.	86
Tabla 10. Porcentaje de almidón extraído por cada extracción: porcentaje medio por extracción y acumulado, desviación estándar (DE), diferencia entre extracciones.	88
Tabla 11. Resultados obtenidos para las diferentes calibraciones (CAL): Índice de rendimiento (PI), valores de RMSEC, RMSECV y RMSEP con sus correspondientes coeficientes de correlación, factores utilizados (F) y valor de PRESS.	92
Tabla 12. Relación de valores medios de almidón (en porcentaje) para cada sarmiento: reales (VMR), según el criterio 1 (VMCR1) y según el criterio 2 (VMCR2).	107
Tabla 13. Estadísticos descriptivos de los valores medios: reales (VMR), según el criterio 1 (VMCR1) y según el criterio 2 (VMCR2).	108
Tabla 14. Valores p (bilateral) resultantes de las pruebas de normalidad para los valores medios reales (VMR) y los valores medios obtenidos tras aplicar los diferentes criterios de muestreo (VMCR1 y VMCR2). En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).	109
Tabla 15. Resultados de las pruebas de Wilcoxon para la comparación de medias, realizadas para una significancia de alfa = 0,05.	110
Tabla 16. Valores medios del contenido de almidón en cada planta (P) muestreadas de cada tratamiento (C, M50, M150) y repetición (R), durante la duración del ensayo.	111
Tabla 17. Estadísticos descriptivos los valores medios de los tratamientos C, M50 y M150 durante los dos años de estudio: 2015 y 2017.	111

Tabla 18. Valores p (bilateral) resultantes de las pruebas de normalidad para los valores medios de los tratamientos C, M50 y M150 durante los dos años de estudio: 2015 y 2017. En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).....	112
Tabla 19. Resultados de la prueba de t de Student para determinar si la diferencia interanual de los valores medios de almidón de cada tratamiento es significativa. En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).	112
Tabla 20. Contenido medio de almidón de cada una de las plantas muestreadas (P2, P3, P4) de los diferentes tratamientos: difosfato amónico (DAP), cloruro potásico (KCl), y control (C); sus repeticiones (R1, R2, R3) y las diferentes dosis (D1, D2) planteadas.	115
Tabla 21. Estadísticos descriptivos los valores medios de los tratamientos C, DAP1, DAP2, KCl1 y KCl2 durante los dos años de estudio: 2016 y 2017.	116
Tabla 22. Diferencia entre los valores máximos, medios y mínimos de almidón registrados para cada uno de los tratamientos, durante los años 2016 y 2017.	117
Tabla 23. Valores p resultantes del análisis de la normalidad de los valores medios de cada tratamiento en cada año de estudio.	117
Tabla 24. Resultados de la prueba de t de Student para determinar si la diferencia interanual de los valores medios de almidón de cada tratamiento es significativa. En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).	118
Tabla 25. Datos de partida de las diferentes variedades de portainjertos, agrupados por zona de cultivo y año. Se muestra el valor medio del contenido de almidón (ALM) y porcentaje de mortalidad (MORT) al final del ciclo productivo.	119
Tabla 26. Estadísticos descriptivos de los datos de partida: contenido de almidón y porcentaje de mortalidad.	120
Tabla 27. Resultados de las pruebas de normalidad (valor p) para las variables contenido de almidón (ALM) y porcentaje de mortalidad (MORT). En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).	122
Tabla 28. Correlación entre ambas variables para cada variedad de portainjerto.	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Difusión de la filoxera en España entre los años 1878-1920. Adaptado de Piqueras (2005, p. 126).	25
Figura 2. Esquema simplificado de la filogenia de los principales patrones de vid actualmente disponibles en el mercado. Los cultivares se representan dentro de recuadros punteados. Los portainjertos FERCAL y 196-17 CL provienen del cruzamiento entre un cultivar y otro portainjerto. Adaptado de Chomé Fuster <i>et al.</i> (2006, p. 302).....	26
Figura 3. Detalle de yema antes y después de realizarse su injerto mediante una unión de tipo “omega”. Elaboración propia.....	30
Figura 4. Esquema de formación de nuevos tejidos a partir del callo de cicatrización: 1) unión de la variedad (V) con el portainjerto (P); 2) emisión del callo por ambas partes; 3) diferenciación de un cámbium de nueva formación; 4) diferenciación de vasos conductores y finalización de la unión. Adaptado de Reyner (2005, p. 112), elaboración propia. 5) Detalle del callo formado tras 3 semanas. Elaboración propia.	31
Figura 5. Plantación manual de planta injertada de vid en caballón cubierto y fertirrigado.	32
Figura 6. Ejemplo de planta seleccionada al final del proceso de producción: se le retirará la parte aérea y se recortará parte del sistema radicular para un mejor manejo durante la implantación.....	33
Figura 7. Esquema general de los principales tejidos vegetales en un sarmiento de vid de un año, procedente de una plantación de plantas madre. Adaptado de University of Wisconsin (2018). Elaboración propia.....	36
Figura 8. Ciclo de Calvin. Fijación de CO ₂ atmosférico en forma de azúcares. Fuente: Khan Academy (2019), adaptado de OpenStax (2019).	41
Figura 9. Configuración, de las moléculas de: A) fructosa-6-P y B) glucosa-6-P , en su forma de cadena abierta. Fuente: PubChem (National Center for Biotechnology Information, 2019a, 2019e).	42
Figura 10. Diagrama estructural de la molécula de sacarosa. Fuente: PubChem (National Center for Biotechnology Information, 2019b).	43
Figura 11. Diagrama estructural de (A) amilosa y (B) amilopectina. Fuente: PubChem (National Center for Biotechnology Information, 2019c, 2019d). (C) Ubicación de ambas moléculas dentro de la estructura ramificada del almidón. Adaptada de Schoch (1961, p. 83).....	44
Figura 12. Esquema simplificado de la síntesis de almidón. Fuente: Tetlow <i>et al.</i> (2004) y Zeeman <i>et al.</i> (Zeeman <i>et al.</i> , 2010). Elaboración propia.	45
Figura 13. Tipos de vibraciones moleculares. El símbolo (+) indica un movimiento del plano de la página hacia el lector, mientras que el símbolo (-) indica un movimiento del plano de la página alejándose del lector. Adaptada de Skoog y Leary (1993, p. 299). ...	48

Figura 14. Esquema simplificado del funcionamiento interno de un FTIR. Adaptado de ThermoFisher Scientific (2017).	49
Figura 15. Aplicación de la transformada de Fourier en la conversión de una señal compleja en las distintas frecuencias que la componen. Adaptada de (Elster, 2018).	50
Figura 16. Esquema simplificado del desarrollo de los diferentes objetivos específicos para la consecución del objetivo general. Elaboración propia.	55
Figura 17. Portainjertos analizados entre 2013 y 2017. Los porcentajes indican la proporción de cada portainjerto analizado, respecto del total de muestras.	60
Figura 18. Proceso de descortezado. A) Detalle de la sección de un portainjerto antes de su descortezado. B) Retirada de la parte exterior más lignificada.	61
Figura 19. Detalle de muestras en distintos momentos de la fase de extracción de azúcares solubles. A) Material vegetal suspendido en etanol al 80%. B) Material vegetal una vez terminadas las tres extracciones y finalizado el posterior secado.	62
Figura 20. Ejemplo de tres extracciones sucesivas de almidón (E1, E2, E3), resultantes de la digestión con KOH de una misma muestra. Se observa una coloración de menor intensidad a medida que se suceden las extracciones.	63
Figura 21. Ejemplo de patrones preparados a partir de glucosa comercial para elaborar la recta "Patrón". Se observa un gradiente de color, siendo más oscuro a medida que aumenta la concentración de glucosa.	65
Figura 22. Resultado del proceso de triturado. A) Material vegetal molido. B) Material vegetal molido y homogeneizado con un tamiz de 0,25 mm de luz.	66
Figura 23. Proceso de obtención de espectros mediante FTIR-ATR. A) Colocación del material vegetal sobre el cristal de diamante. B) Aplicación de presión para asegurar el contacto entre la muestra y el cristal. C) Ejemplo de espectro obtenido a partir de sarmiento triturado.	67
Figura 24. Detalle de las regiones en las que se analizará la información espectral, mostrados sobre espectros de la BD1: A) Estiramiento del enlace OH. B) Estiramiento del enlace CH. D) Huella digital. C y E) zonas que presentan diferencias entre los espectros de almidón (rojo) y celulosa (azul).	68
Figura 25. Diagnóstico de la prueba de Chauvenet para la BD0. Los espectros que no superan el test se consideran valores atípicos (VA).	69
Figura 26. Ejemplo de espectros cuya diferencia (en porcentaje), entre el valor calculado y el valor medido es excesivamente elevada (recuadro rojo punteado), alterando el modelo.	70
Figura 27. Ejemplo esquemático de una validación cruzada de 5 pasos. Adaptado de Institute for Genomics and Bioinformatics - Graz University of Technology (2006).	74
Figura 28. Detalle del resultado de un diagnóstico PRESS de 15 factores, en el que el valor mínimo del RMSECV se alcanza con 12 factores.	74

Figura 29. Significado del valor de la correlación. Fuente: Hernández Sampieri <i>et al.</i> (2010). Elaboración propia.	76
Figura 30. Localización de las zonas de ensayo dentro del vivero de plantas madre de la variedad 110 R.	77
Figura 31. Esquema del diseño experimental del ensayo. El marco de plantación es de 3 X 3 m, manteniéndose una línea de plantas sin tratar entre cada bloque.	78
Figura 32. Detalle de aplicación de tratamiento foliar en el campo de ensayo mediante sistema de pulverización manual.	78
Figura 33. Detalle de sarmientos de vid de plantas madre completos procedentes del campo de ensayo y el resultado de su procesamiento en estacas de 40 cm.	79
Figura 34. Esquema de los criterios planteados para optimizar el muestreo de sarmientos para la determinación del nivel de almidón.	80
Figura 35. Porcentaje de segmentos analizados en función del criterio utilizado.	80
Figura 36. Esquema de diseño experimental del ensayo. Cada repetición constó de un tratamiento control (C), dos tratamientos de difosfato amónico (DAP1 y DAP2) y dos tratamientos con cloruro potásico (KCl1 y KCl2).	81
Figura 37. Detalle de los fertilizantes ensayados: A) Cloruro potásico, B) Difosfato amónico. (C) Ejemplo de un bloque (5 plantas) tras aplicar la dosis correspondiente. ...	82
Figura 38. Porcentajes de almidón extraídos en cada una de las extracciones consecutivas.	86
Figura 39. Número de muestras y porcentaje de almidón obtenido en cada extracción con KOH. La línea roja punteada indica el porcentaje medio extraído.	87
Figura 40. Esquema representativo del método enzimático optimizado para la determinación de almidón en sarmientos de vid. Fase 1: preparación. Fase 2: extracción de azúcares solubles. Fase 3: digestión de almidón. Fase 4: Degradación enzimática y valoración. Tiempos para 30 muestras.	90
Figura 41. Histogramas de las bases de datos BD0, BD1, BD2 y BD3. Los porcentajes indican el intervalo de contenido de almidón (método enzimático).	91
Figura 42. Resultado del diagnóstico PRESS para las calibraciones 01 a 06: evolución del RMSECV al añadir cada uno de los 15 factores calculados, siendo su valor mínimo el marcado en rojo.	93
Figura 43. Resultado del diagnóstico PRESS para las calibraciones 07 a 12: evolución del RMSECV al añadir cada uno de los 15 factores calculados, siendo su valor mínimo el marcado en rojo.	94
Figura 44. Resultado del diagnóstico PRESS para las calibraciones 13 a 18: evolución del RMSECV al añadir cada uno de los 15 factores calculados, siendo su valor mínimo el marcado en rojo.	95

Figura 45. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (espectro original, sin ajuste de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL01 , BD2: CAL07 y BD3: CAL13).....	96
Figura 46. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (espectro original, extracción lineal de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL02 , BD2: CAL08 y BD3: CAL14).	97
Figura 47. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (primera derivada, sin ajuste de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL03 , BD2: CAL09 y BD3: CAL15).....	98
Figura 48. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (primera derivada, extracción lineal de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL04 , BD2: CAL10 y BD3: CAL16).	99
Figura 49. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (segunda derivada, sin ajuste de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL05 , BD2: CAL11 y BD3: CAL17).....	100
Figura 50. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (segunda derivada, extracción lineal de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL06 , BD2: CAL12 y BD3: CAL18).	101
Figura 51. Esquema del método utilizado para la determinación de almidón en sarmientos de vid mediante FTIR-ATR. Fase 1: preparación. Fase 2: elaboración base de datos (BD). Fase 3: calibración. Fase 4: cuantificación. Tiempos para 30 muestras.....	102
Figura 52. Valores medios de almidón obtenidos tras analizar los mismos portainjertos mediante el método enzimático y el método de espectroscopía infrarroja (FTIR), y diferencia porcentual registrada entre el método FTIR y el método enzimático. n = número de muestras analizadas.	103
Figura 53. Comparativa de los valores obtenidos por ambos métodos durante el periodo 2013-2017, tanto a nivel global como a nivel varietal.	104

Figura 54. Valores del contenido de almidón de los 319 segmentos en los que se han dividido los sarmientos muestreados, expresados como porcentaje.	105
Figura 55. Distribución longitudinal del nivel porcentual de almidón en cada sarmiento analizados respecto de la cantidad total de almidón contenida en el mismo, indicada en gramos en la columna de la derecha. Valores bajos: tonos rojos, valores altos: tonos azules.	106
Figura 56. Histogramas. Pruebas de normalidad para los valores medios reales (VMR) y los valores medios obtenidos tras aplicar los diferentes criterios de muestreo (VMCR1 y VMCR2).	108
Figura 57. Gráficos P-P y gráficos Q-Q. Pruebas de normalidad para los valores medios reales (VMR) y los valores medios obtenidos tras aplicar los diferentes criterios de muestreo (VMCR1 y VMCR2).	109
Figura 58. Relación del número de plantas viables (V) y no viables (NV) obtenidas y su porcentaje con respecto al total de plantas cultivadas por tratamiento.....	113
Figura 59. Comparativa entre los valores medios del porcentaje de almidón y el número de plantas viables al final del ciclo productivo, de cada tratamiento.	114
Figura 60. Regresión lineal entre el porcentaje de almidón y el número de plantas viables.	114
Figura 61. Histogramas de los datos de partida de ambas variables agrupados en bloques.	120
Figura 62. Gráficos P-P resultantes de la prueba de normalidad.	121
Figura 63. Gráficos Q-Q resultantes de la prueba de normalidad.....	121
Figura 64. Modelo de regresión lineal entre las variables “contenido de almidón” y “porcentaje de mortalidad”.	122

ABREVIATURAS

110 R	Richter 110
1103 P	Paulsen 1103
1203 C	1203 Couderc
140 Ru	Ruggeri 140
161-49 C	161-49 Couderc
196-17 CL	196-17 Castel
31 R	Richter 31
3309 C	3309 Couderc
41B M	41 B Millardet y de Grasset
420A M	420 A Millardet y de Grasset
99 R	Richter 99
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
ATR	Reflectancia Total Atenuada
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
FTIR	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
G1P	Glucosa-1-fosfato
G3P	Glicerol-3-fosfato
G6P	Glucosa-6-fosfato
m.s.	Materia seca
m.v.	Material vegetal
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
PFP	PPi-fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa
PGO	Preparación enzimática PGO
PLS	Partial Least Squares (Mínimos Cuadrados Parciales)
RUBISCO	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
SO4	Selección Oppenheim del Teleki nº 4
UDP	Uridina difosfato
UTP	Uridina trifosfato
RMSEC	Error Cuadrático Medio de la Calibración
RMSEP	Error Cuadrático Medio de la Predicción
RMSECV	Error Cuadrático Medio de la Validación Cruzada
PRESS	Error Residual Predicho de la Suma de Cuadrados

Nota: en la redacción de esta tesis doctoral se utilizó el estilo bibliográfico Harvard ULE.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El sector vitivinícola mundial demanda anualmente millones de plantas de vid injertadas que son necesarias, tanto para implantar nuevos viñedos, como para llevar a cabo la ampliación y la reposición de marras de los viñedos existentes. A nivel nacional, la Ley 24/2003 de la Viña y el Vino (España, 2003), indica claramente que en aquellas zonas en las que exista presencia de filoxera se utilizará material vegetal de vid americana como portainjerto, por lo que la importancia de los viveros de vid dentro del sector vitivinícola queda patente.

La tarea de producir tal cantidad de plantas cada año recae en viveros altamente especializados en el cultivo de vid injertada. Estos viveros producen plantas de vid a nivel industrial, sin dejar de lado el control de parámetros de calidad, como la sanidad vegetal o la viabilidad del injerto.

La planta injertada de vid se consigue mediante la unión física de dos partes complementarias: el *portainjerto*, proveniente del sarmiento de una variedad de vid americana resistente a la filoxera; y la *yema*, fragmento de sarmiento de una variedad de *Vitis vinifera*. Una vez realizado el injerto de ambas partes, éste se acondiciona y se implanta en el terreno. El portainjerto desarrolla el sistema radicular de la futura planta adulta, mientras que la yema de la variedad injertada desarrolla el aparato vegetativo responsable de la producción de uvas.

Aun con todas las medidas de control existentes, al finalizar el ciclo productivo el porcentaje de plantas que no cumplen con los criterios que determinan la viabilidad para su implantación final en viñedo, se sitúa entre el 30% y el 60%. Incluso el porcentaje inferior de esta horquilla supone unas pérdidas económicas muy preocupantes para el vivero, ya que es quien asume el coste de producción y, por lo tanto, la totalidad de las pérdidas.

Sorprendentemente, y a pesar del enorme impacto económico que esta problemática ocasiona en el sector, no existen datos contrastados acerca de las causas de esta enorme mortalidad. Se ha planteado que parte de la mortalidad podría estar causada por algunas problemáticas asociadas a tareas concretas del proceso de producción de la planta injertada: lesiones en el desyemado de los portainjertos, incorrecta unión del injerto o condiciones inadecuadas de almacenamiento y/o transporte del material. Además, la existencia de condiciones climáticas adversas durante alguna fase del cultivo, podrían afectar negativamente y aumentar el porcentaje final de planta no viable (Gramaje y Armengol, 2011).

Algunos autores han señalado que la infección de los injertos por hongos causantes de enfermedades de madera podría ser una causa adicional que explicase esta gran mortalidad. En este sentido, existen estudios en los que se han examinado plantas procedentes de vivero, ya listas para su plantación, en las que se han encontrado

evidencias de una frecuencia de infección muy baja producida, tanto por *Cylindrocarpon* spp. como por fitopatógenos asociados a la enfermedad de Petri y fitopatógenos de la familia *Botryosphaeriaceae*, en plantas con fallos en la unión del injerto, concluyendo que estos patógenos no eran la causa principal de la mortalidad observada (Rumbou y Rumbos, 2001).

Recientemente se ha observado que la disminución en el número de patógenos detectados en plantas de vid de un año, en las que previamente se había realizado una inoculación de actinobacterias seleccionadas, podrían ser fundamentales en el descenso de la mortalidad observada, lo que sugiere una posible relación entre ambos hechos (Álvarez-Pérez *et al.*, 2017).

Además de las patologías, o los daños que pueda sufrir la planta a lo largo de todo el proceso productivo, existe otra variable que podría afectar a la viabilidad de la planta en sus primeras fases de crecimiento: el nivel de sustancias de reserva. Tras realizarse el injerto, ambas partes han de utilizar las reservas energéticas disponibles, mayoritariamente en forma de almidón, para la multiplicación celular que formará el callo de unión. Posteriormente, estas reservas serán las que aportarán la energía necesaria para la formación del sistema radicular y el aparato vegetativo. Por lo tanto, en caso de que el material vegetal de partida no cuente con las reservas mínimas necesarias para el correcto desarrollo de la planta en sus fases iniciales, es posible que el crecimiento de la planta se vea comprometido.

Dado que cuantitativamente la mayor parte de la planta injertada se corresponde con el portainjerto, sería muy interesante conocer si el contenido de almidón almacenado por las plantas madre en los sarmientos utilizados para la producción de portainjertos, podría tener alguna influencia en el normal desarrollo del injerto. La determinación de almidón mediante técnicas enzimáticas se encuentra descrita para diferentes plantas de carácter alimentario, así como para plantas leñosas (Chow y Landhäusser, 2004). Estas técnicas han sido ampliamente contrastadas, por lo que su gran fortaleza es la fiabilidad de los resultados, pero cuentan con varias desventajas: resultan muy laboriosas, lentas y costosas.

Apoyándose en los métodos enzimáticos, las técnicas de espectroscopía infrarroja suponen una alternativa que aporta tanto fiabilidad como rapidez en la obtención de resultados, por lo que disponer de una metodología adaptada a las necesidades de los viveros podría aportar información muy valiosa a la hora de decidir qué portainjertos tendrían mayores posibilidades de desarrollar plantas viables y, por tanto, de poder disminuir así la mortalidad.

I. 1. BREVE INTRODUCCIÓN A LA PRODUCCIÓN DE PLANTA DE VID INJERTADA

A la hora de implantar o mantener un viñedo es vital conocer qué características han de cumplir las plantas injertadas que se van a plantar. Debido a la plaga de filoxera (*Dactylosphaera vitifoliae*) que asoló los viñedos de la península ibérica entre los años 1878 y 1920 (Figura 1), el sector se adaptó injertando variedades viníferas sobre portainjertos de variedades resistentes a la plaga, denominadas comúnmente “variedades americanas” por su procedencia.

La adopción de esta solución fue plasmada por Antonio Larrea en el prólogo de su libro “Vides americanas portainjertos”:

“El injerto se ha convertido en una práctica obligada de cultivo y, [...] se ha hecho preciso recurrir a la utilización de variados patrones o portainjertos, con las consiguientes complicaciones e incertidumbre del cultivador al elegir el más conveniente.”

(Larrea, 1950, p. 7).

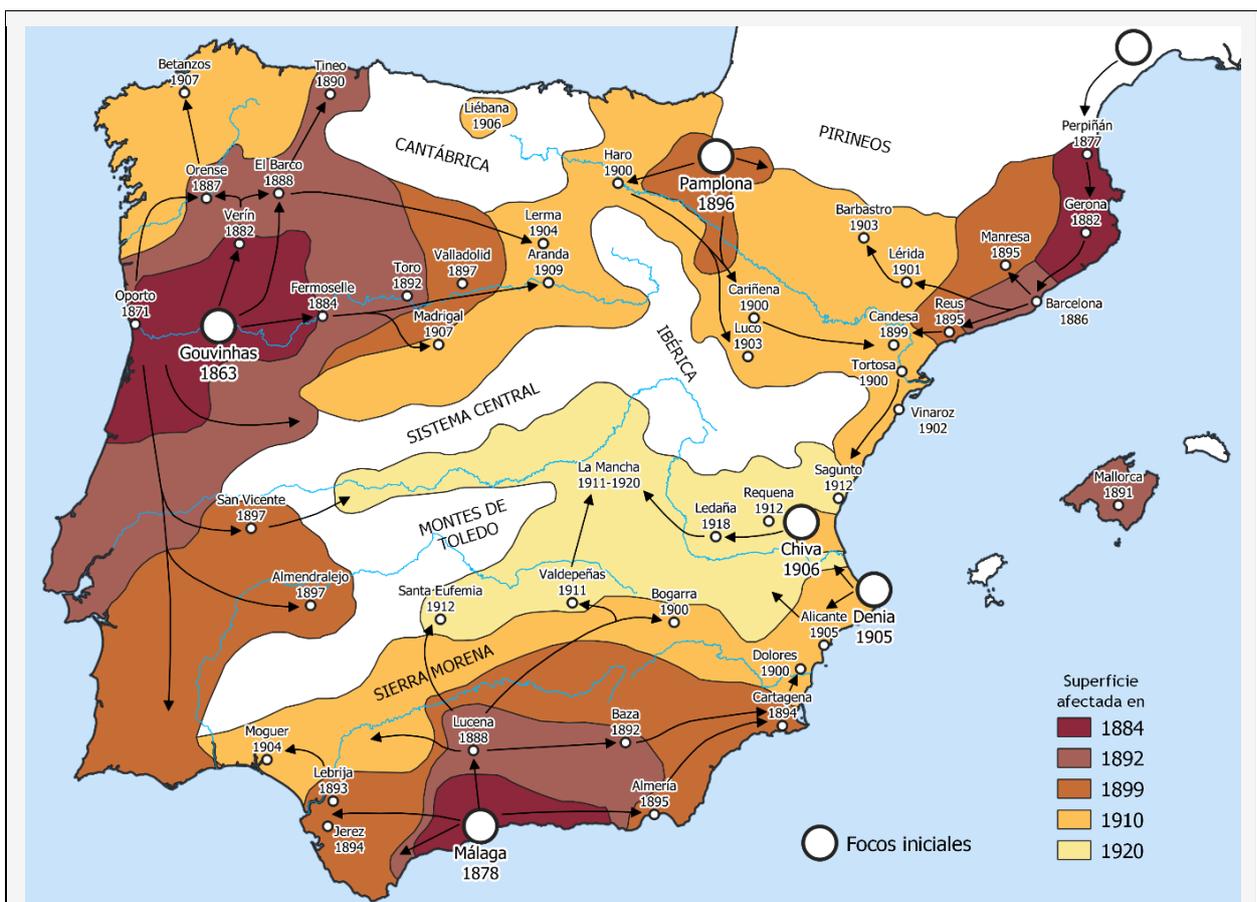
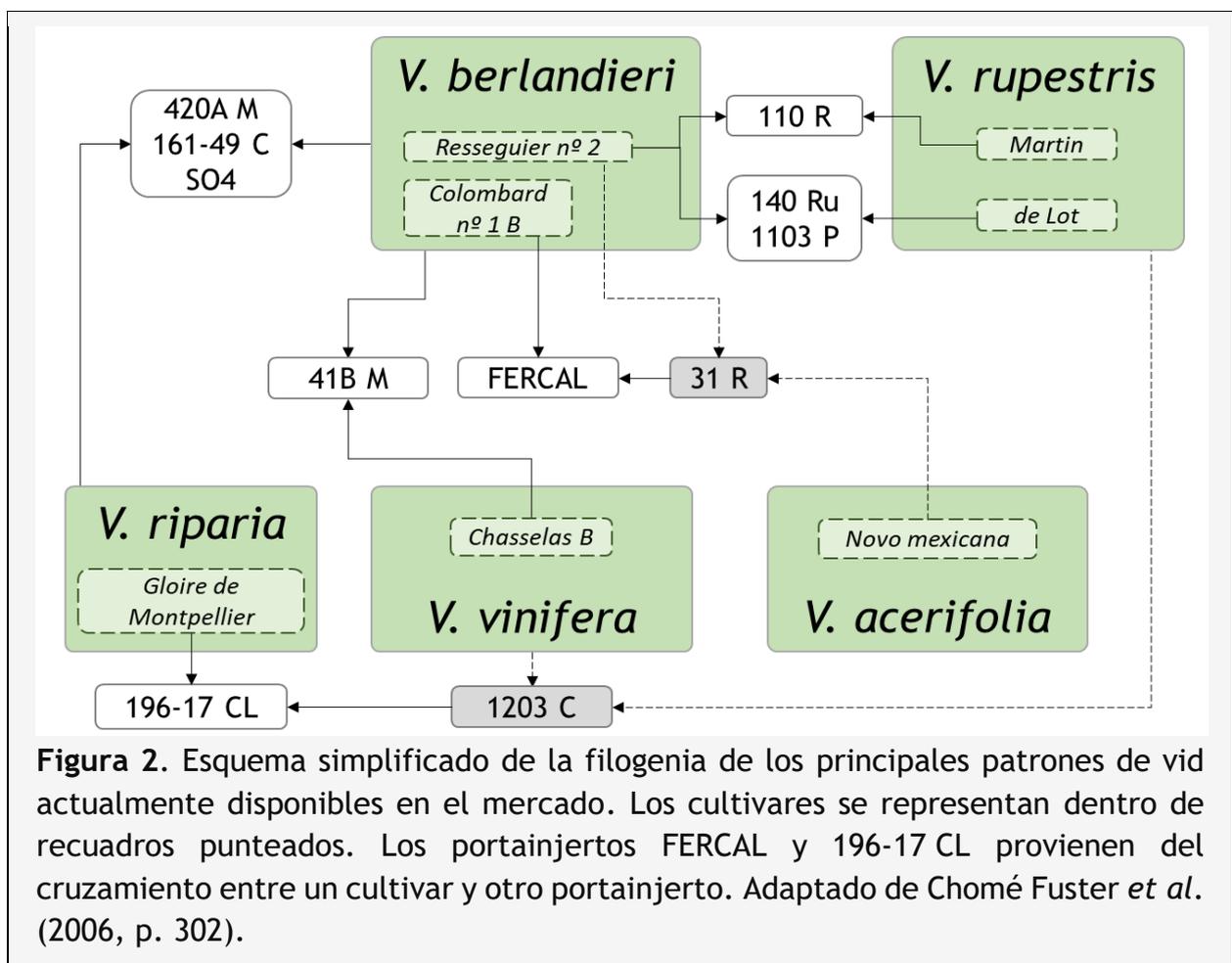


Figura 1. Difusión de la filoxera en España entre los años 1878-1920. Adaptado de Piqueras (2005, p. 126).

Esta práctica ha continuado hasta la actualidad, y no solo con el fin de evitar los problemas asociados a la filoxera, sino que los viveros dotan a los viñedos de plantas que se adapten, tanto a las características particulares de los diferentes terrenos, como a las necesidades productivas que demanda el sector vitivinícola.

I. 1. 1. VARIEDADES DE PORTAINJERTO

Los portainjertos disponibles actualmente en el mercado se han obtenido mediante diferentes cruzamientos entre las distintas variedades de vid, utilizando como base principalmente variedades americanas: *Vitis berlandieri*¹, *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* y *Vitis acerifolia*² (Figura 2). El objetivo de dichos cruzamientos es la obtención de patrones que se adapten, tanto a las condiciones del terreno, como a las necesidades de las diferentes variedades productivas.



¹ Sinónimos: *Vitis cinerea* (Engelm.) Millardet var. *helleri* (L. H. Bailey) M. O. Moore (USDA Agricultural Research Service National Plant Germplasm System, 2019).

² Sinónimos: *Vitis cordifolia* var. *solonis* Planch.; *Vitis longii* W. R. Prince; *Vitis longii* var. *microsperma* (Munson) L. H. Bailey; *Vitis solonis* (Planch.) Engelm. ex Millardet; *Vitis solonis* var. *microsperma* Munson (USDA. Agricultural Research Service. National Plant Germplasm System, 2019).

El Real Decreto 1338/2018, de 29 de octubre, por el que se regula el potencial de producción vitícola (España, 2018), en su anexo XXI, recoge las variedades de portainjerto recomendadas, indicando su origen y abreviatura correspondiente. A continuación, se exponen las características de las principales variedades comerciales de vid americana (Chomé Fuster *et al.*, 2006; UMT Géno-Vigne, 2011) demandadas por el sector vitícola, entre las que se encuentran las estudiadas en este trabajo:

- 110 Richter (110 R).

Obtenido por Franz Richter en 1902, realizando el siguiente cruzamiento:

V. berlandieri cv. Resseguier n° 2 × *V. rupestris cv. Martin*

Es el portainjerto de mayor difusión en España por su gran versatilidad. Favorece el desarrollo y la productividad. Su sistema radicular no penetra en exceso por lo que se adapta a suelos poco profundos. Resiste terrenos con hasta un 17% de caliza activa. Soporta situaciones no excesivas de sequía y de humedad en el subsuelo. En cambio, no tolera la salinidad y su resistencia a los nemátodos³ es media.

- 140 Ruggeri (140 Ru).

Obtenido por Antonino Ruggeri en 1894, mediante el siguiente cruzamiento:

V. berlandieri cv. Resseguier n° 2 × *V. rupestris cv. de Lot.*

Portainjerto de alto vigor vegetativo que tiende a retrasar la maduración. No es muy recomendable su uso en terrenos fértiles. Soporta condiciones de caliza activa de hasta el 20% y se adapta a suelos secos y poco profundos. Es resistente a nemátodos.

- 1103 Paulsen (1103 P).

Obtenido por Federico Paulsen en 1896, derivado del siguiente cruzamiento:

V. berlandieri cv. Resseguier n° 2 × *V. rupestris cv. de Lot.*

Variedad bien adaptada a entornos cálidos y secos, admite situaciones de subsuelo húmedo sin encharcamientos. Tolerancia niveles de caliza activa de hasta un 17% y condiciones de salinidad elevada.

- 41B Millardet y de Grasset (41B M).

Obtenido por Alexis Millardet y Charles de Grasset en 1882, cruzando las variedades:

V. vinifera cv. Chasselas × *V. berlandieri.*

³ Los nemátodos que pueden causar daños al sistema radicular de los diferentes portainjertos son del género *Meloidogyne* spp.

Soporta hasta un 40 % de caliza activa. Su sistema radicular es de crecimiento lento, pero proporciona un buen nivel productivo. No es muy resistente a la sequía, y tiene problemas en condiciones de humedad, de salinidad y en presencia de nemátodos.

- 420 A Millardet y de Grasset (420A M).

Obtenido por Alexis Millardet y Charles de Grasset en 1887, mediante el cruzamiento de las variedades:

V. berlandieri × *V. riparia*.

La fertilidad del suelo ha de ser bastante elevada ya que no resiste situaciones de sequía ni los entornos húmedos o salinos. En cambio, es capaz de desarrollarse en suelos con hasta un 20 % de caliza activa y aportar un gran nivel de producción.

- Selección Oppenheim del Teleki nº 4 (SO4).

Obtenido por Sigmund Teleki y Heinrich Fuhr 1896, tras cruzar las variedades:

V. berlandieri × *V. riparia* (derivada de *Euryale Ressayier*).

Se adapta mejor a terrenos con subsuelo húmedo y tolera en torno a un 17 % de caliza activa. Proporciona gran vigor a la planta: rápida entrada en producción y adelanto de la maduración. Es resistente a nemátodos, pero sensible a la carencia de magnesio.

- 161-49 Couderc (161-49 C).

Obtenido por Georges Couderc en 1888, a través del siguiente cruzamiento:

V. berlandieri × *V. riparia*.

Portainjerto de fácil adaptación a suelos calizos con hasta un 25 % de caliza activa. Su vigor no es excesivo, por lo que el desarrollo inicial de la plantación puede resultar lento. No resiste condiciones de sequía ni de salinidad y es sensible a los nemátodos.

- 196-17 Castel (196-17 CL).

Obtenido por Pierre Castel en 1906, realizando el siguiente cruzamiento:

1203 Couderc × *V. riparia* cv. *Gloire de Montpellier*

Favorece un rápido desarrollo y ofrece gran resistencia a la salinidad, siendo indicado para terrenos ácidos. Su tolerancia a la caliza activa es muy baja: hasta un 6 %. Además, es sensible a nemátodos y a la elevada presencia de filoxera.

- Fercal.

Obtenido por el Instituto Nacional de la Investigación Agronómica de Francia (INRA) en 1959, mediante el siguiente cruzamiento:

V. berlandieri cv. *Colombard nº 1 B* × *31 Richter*.

Variedad con una gran capacidad de adaptación a suelos secos y calizos, llegando a tolerar valores de hasta el 40 % de caliza activa. Resistente a condiciones de clorosis y a la presencia de nemátodos. Disminuye el nivel productivo, pero aporta vigor y facilita el enraizamiento. A nivel enológico proporciona un aumento del grado alcohólico y de la acidez de los mostos.

I.1.2. VIVERO DE VID: PROCESO PRODUCTIVO DE PLANTA INJERTADA

El cultivo de plantas de vid injertadas a gran escala es tremendamente exigente, no solo a nivel agronómico, ya que se ha de aunar la producción en masa y la realización “artesanal” del injerto, por lo que su cultivo es realizado en viveros especializados. Las diferentes tareas del proceso productivo se extienden, aproximadamente, a lo largo de un año: desde la recogida de material vegetal (enero-marzo), hasta la recogida de la planta injertada tras su implantación en el vivero (noviembre-diciembre).

I.1.2.1. FASES DEL PROCESO PRODUCTIVO

A continuación, se describe de forma genérica el proceso de producción de planta injertada, en base al trabajo realizado por Viveros Villanueva Vides (Larraga, Navarra).

1. Recogida y preparación de yemas de variedades productivas

Es una de las tareas más importantes, ya que de su correcta ejecución dependerá la calidad final de la planta injertada. Esta tarea conlleva previsión a largo plazo, ya que transcurrirá un año desde que se recogen las yemas, hasta que la planta injertada esté lista para ser plantada. El viñedo de partida ha de estar sano y contar con la catalogación de vivero de calidad certificada o de vivero de calidad estándar.

- Preselección: en el momento de la poda del viñedo se realiza una selección inicial de los sarmientos, cuyos calibres han de estar entre 6-12 mm para asegurar la correcta unión con el portainjerto (Viveros Villanueva Vides, 2013).
- Selección final: los sarmientos preseleccionados se trasladan a las instalaciones del vivero donde las yemas, seleccionadas manualmente, se preparan para su injerto. Es vital que las yemas no estén dañadas para que su desarrollo sea el adecuado (Viveros Villanueva Vides, 2011e).

2. Recogida y preparación de sarmientos de vid americana

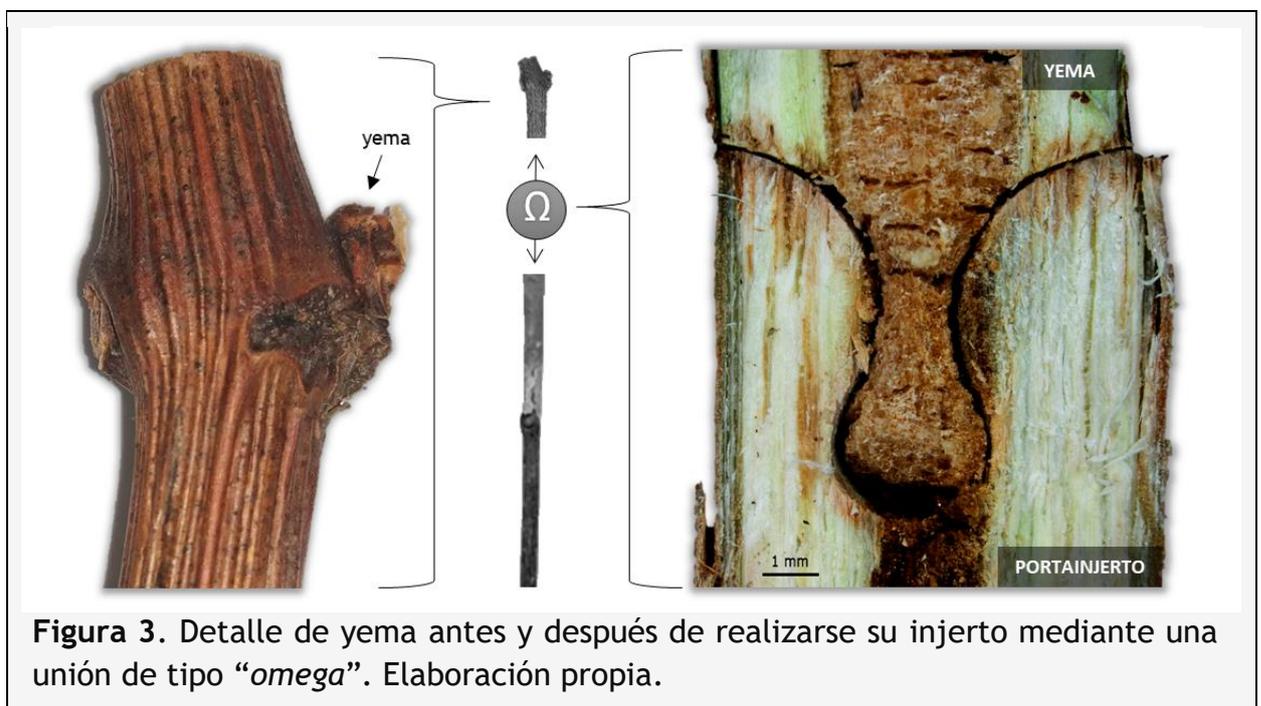
Las cepas de vid americana se cultivan prácticamente a ras de suelo y, al no disponer de ningún tipo de conducción, sus sarmientos se extienden libremente por el terreno. Éstos pueden alcanzar longitudes de hasta más de 6 m, en función de la variedad.

- Recolección: Esta tarea consiste básicamente en cortar los sarmientos en la base de la cepa y formar gavillas, o haces, para su posterior traslado a las instalaciones del vivero en las que se acondicionarán (Viveros Villanueva Vides, 2010a).

- **Obtención de estacas:** de los sarmientos recogidos en campo se aprovecha la zona comprendida entre los 12 y los 6 mm de diámetro, evitando aquellas partes que puedan tener heridas o que no sean lo suficientemente rectas. Se limpian y cortan manualmente, a ras de la yema inferior y con una longitud final de unos 40 cm, y se almacenan en cámara de frío para evitar su desecación (Viveros Villanueva Vides, 2014b).
- **Desyemado:** es necesario retirar las yemas de las estacas para que no compitan con las yemas del injerto cuando comience el desarrollo de la nueva planta. Para esta tarea se emplea maquinaria específica que cuenta con rodillos abrasivos con los que se eliminan las yemas rápidamente (Viveros Villanueva Vides, 2011b).

3. Injertado

Es la tarea fundamental del proceso productivo. Consiste en unir la yema de la variedad productiva con la estaca, mediante un injerto de tipo púa, denominado injerto “omega”. Esta unión se realiza de forma manual con la ayuda de una máquina específica para injertar: el operario realiza una selección de yema y estaca de tal forma que sus diámetros se ajusten todo lo posible, de esta forma se propicia una unión homogénea y duradera. Acciona la injertadora para hacer la hendidura en una de las partes y a continuación, realiza un corte, con la forma inversa a la anterior, en la segunda parte; al finalizar, ambas partes quedan ensambladas (**Figura 3**).



A continuación, la zona injertada se introduce brevemente en una solución de parafina para asegurar la correcta fijación del injerto (Viveros Villanueva Vides, 2011c). Físicamente, la parafina realiza una doble función: por un lado, protege la unión impidiendo la entrada de patógenos a través de la herida generada por el injerto, y al mismo tiempo mantiene ambas partes en perfecto contacto. Además, la

parafina contiene un fungicida, para asegurar la sanidad de la planta injertada, y hormonas para favorecer la multiplicación celular en la zona de unión.

4. Callogénesis

Para un desarrollo correcto de la unión, la planta injertada se mantiene en condiciones controladas de humedad (85-90%) y temperatura (22-23 °C) (Waite *et al.*, 2015) durante 20-23 días en condiciones de oscuridad (Viveros Villanueva Vides, 2014a). Como se puede observar en la **Figura 4**, en la zona de unión se forman nuevas células no diferenciadas que formarán un callo de cicatrización, a partir del cual se generarán los diferentes tejidos que permitirán el flujo de nutrientes.

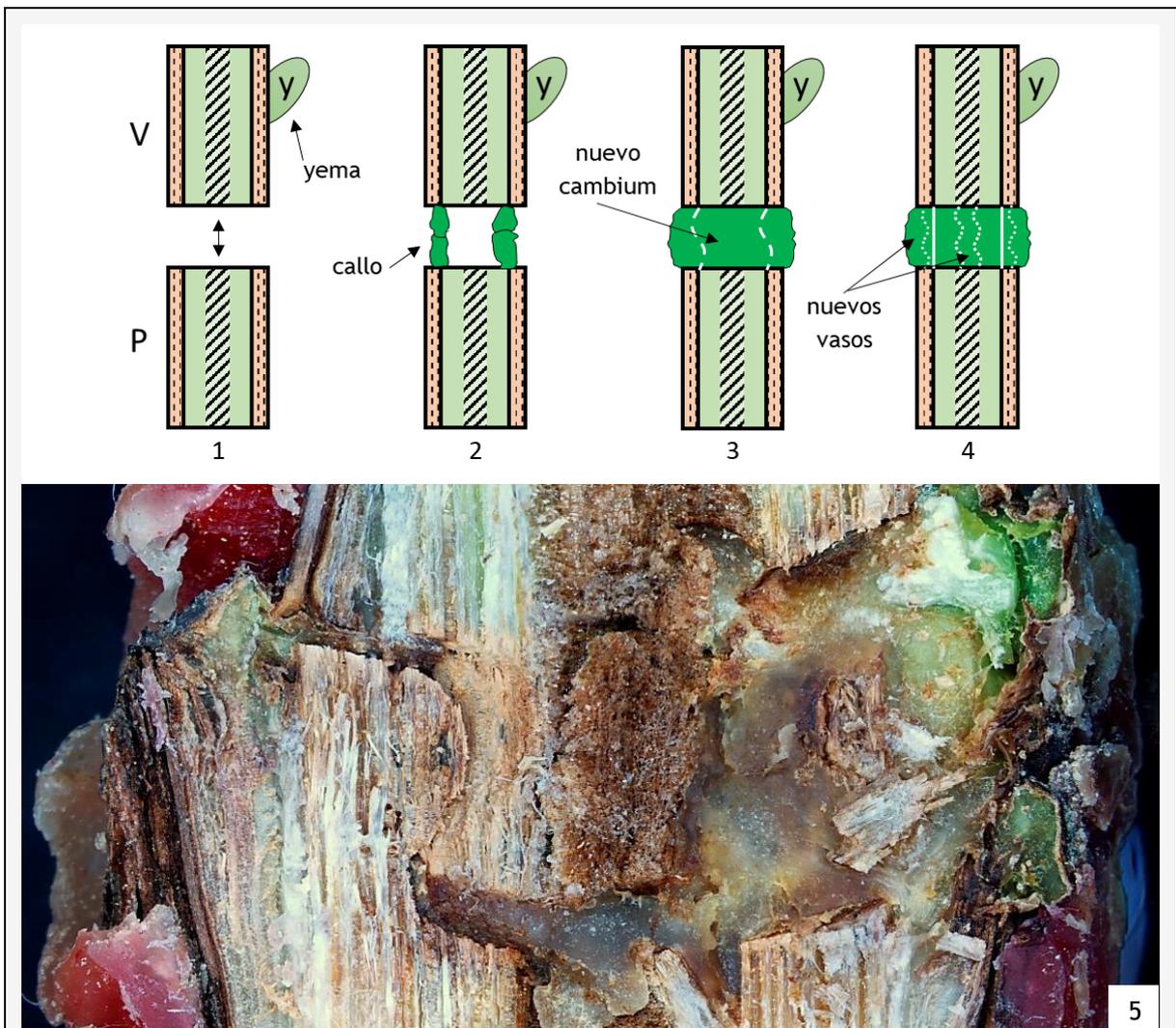


Figura 4. Esquema de formación de nuevos tejidos a partir del callo de cicatrización: 1) unión de la variedad (V) con el portainjerto (P); 2) emisión del callo por ambas partes; 3) diferenciación de un cámbium de nueva formación; 4) diferenciación de vasos conductores y finalización de la unión. Adaptado de Reyner (2005, p. 112), elaboración propia. 5) Detalle del callo formado tras 3 semanas. Elaboración propia.

5. Plantación de injertos

Antes de ser trasladadas para su plantación, las plantas, con el callo ya formado, se vuelven a parafinar y se tratan con hormonas para favorecer el desarrollo radicular. La plantación se realiza en caballones cubiertos por un plástico (**Figura 5**) para mantener tanto la temperatura como la humedad lo más homogéneas posibles, y evitar así la aparición de malas hierbas que compitan por los nutrientes. Este plástico dispone de una serie de perforaciones por las que se introducen, de forma manual, las plantas, evitando así daños en la zona de unión.

La planta injertada utiliza las reservas energéticas, acumuladas en mayor medida en el portainjerto, para desarrollar el sistema radicular, fortalecer el callo y promover la brotación de la yema. Este es un momento clave que determinará la viabilidad de la planta al final del ciclo productivo. En caso de que se observe la brotación del portainjerto, se retirarán estos brotes para que no interfieran con el desarrollo de la variedad productiva. Se han de realizar dos o tres despuntes para controlar el exceso de vigor vegetativo y, al menos, el mismo número de tratamientos fitosanitarios para controlar enfermedades como el mildiu o el oídio. (Viveros Villanueva Vides, 2009, 2011a, 2011d, 2015, 2017b).



Figura 5. Plantación manual de planta injertada de vid en caballón cubierto y fertirrigado.

6. Recolección y selección

Una vez finalizado el ciclo vegetativo, se recogen las plantas de forma mecánica y se trasladan a la zona de selección para separar las secas y aquellas con una unión débil del injerto, de las que se han desarrollado correctamente en todas sus facetas: adecuado desarrollo de la parte aérea, unión fuerte del injerto y sistema radicular abundante (**Figura 6**). Las plantas seleccionadas son acondicionadas: reciben una nueva capa de parafina, se recortan las raíces y la parte aérea, se humedecen y se almacenan en cámara de frío para que se conserven en perfectas condiciones hasta

el traslado para su plantación en el viñedo de destino (Viveros Villanueva Vides, 2010b, 2017a).



Figura 6. Ejemplo de planta seleccionada al final del proceso de producción: se le retirará la parte aérea y se recortará parte del sistema radicular para un mejor manejo durante la implantación.

En la **Tabla 1** se muestra un diagrama temporal de las fases del proceso productivo descritas anteriormente.

Tabla 1. Cronograma del proceso productivo de planta de vid injertada en España.

TAREA	N	D	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O
Recogida M.V.	■	■										
Preparación estacas		■	■	■								
Injertado			■	■	■	■	■					
Callogénesis				■	■	■	■	■	■			
Plantación injertos					■	■	■	■	■	■		
Fitosanitarios						■	■	■	■	■	■	
Recolección											■	■

I.1.2.2. TASA DE MORTALIDAD

Durante el proceso productivo de planta de vid injertada existen varios puntos críticos en los que se puede producir su muerte, o en los que su crecimiento no se desarrolla adecuadamente. Uno de los momentos más críticos del ciclo productivo es la formación del callo a partir de las reservas energéticas existentes en el portainjerto; si esta unión no se realiza de forma correcta se pueden dar dos situaciones:

- en caso de que el callo no se forme: las yemas no brotarán en la cámara o lo harán de forma deficiente y la planta se desechará;
- si el callo se forma, pero no se desarrolla correctamente, las yemas brotarán en la cámara y la planta se preparará para su implantación en el vivero. Su desarrollo en campo puede no ser el adecuado y provocar problemas que causen la muerte de la planta o que ésta sea desechada en la mesa de selección.

Una vez que las plantas han formado un callo y se han implantado en campo, comienza el desarrollo del sistema radicular, la brotación de la yema y el crecimiento de las hojas. Durante esta fase, la planta injertada depende en exclusiva de las reservas que existan tanto en el portainjerto como en la variedad, teniendo en cuenta que parte de ellas se han consumido durante la callogénesis. En caso de que la planta no consiga nutrirse adecuadamente por sí misma antes de que las reservas se agoten, puede producirse un desarrollo vegetativo inadecuado, llegando incluso a morir.

Finalmente, en la mesa de selección se separan las plantas viables de aquellas que, aun estando vivas, no cumplen con los criterios mínimos para que su desarrollo en el viñedo de destino sea el correcto. Por lo tanto, la tasa de mortalidad se define como el porcentaje de planta cultivada que es desechada.

I.2. BREVE INTRODUCCIÓN A LA FISIOLOGÍA VEGETAL

Es importante hacer hincapié en aspectos básicos de fisiología vegetal como pueden ser las funciones de los principales tejidos, así como las implicaciones que tienen los distintos nutrientes en el desarrollo vegetativo y en el metabolismo de moléculas tan necesarias como la celulosa o el almidón.

El aspecto diferenciador del tejido vegetal es la existencia de una pared celular que rodea cada célula actuando, al mismo tiempo, como barrera protectora y como estructura de transporte bidireccional entre la célula y el líquido intercelular (Barceló Coll *et al.*, 2001). Los principales polisacáridos que forman la pared celular son la celulosa, la hemicelulosa y las pectinas. Además, encontramos proteínas, lípidos y minerales que pueden formar parte de la estructura de la pared celular o aparecer en ella aportando alguna funcionalidad. En las plantas leñosas, la presencia de lignina en las paredes celulares es muy elevada, otorgando a los tejidos una gran resistencia mecánica y una protección frente a la pérdida de agua debido a su carácter hidrófobo.

La pared celular se compone mayoritariamente de cadenas de celulosa, que se unen mediante puentes de hidrógeno, y forman microfibrillas que constituyen la base estructural del tejido vegetal. Su importancia es tal, que en plantas leñosas puede suponer entre un 30 % y un 40 % del peso de las paredes celulares (Revilla y Zarra, 2000). Sobre esa base de celulosa se asientan el resto de los componentes estructurales y funcionales de la pared celular.

I.2.1. HISTOLOGÍA DEL SARMIENTO DE VID

En cuanto a los diferentes tejidos vegetales, en un sarmiento de vid de un año podemos distinguir, principalmente, los siguientes tipos: peridermis, parénquima, colénquima, esclerénquima, cambium, xilema y floema; organizados en los siguientes sistemas.

➤ **Sistema de protección**

• Peridermis.

Reemplaza a la epidermis en tallos y raíces con crecimiento secundario. Está formada por el felógeno, meristemo secundario también llamado cámbium suberógeno que da lugar al súber o corcho, en la parte externa, y a la felodermis en la parte interna (Megías *et al.*, 2016).

➤ **Sistema estructural**

• Parénquima de la médula.

Se trata de un tejido de relleno formado por células de pared celular delgada con un bajo grado de diferenciación, por lo que está ligado a procesos de regeneración de lesiones (Megías *et al.*, 2018).

• Colénquima.

Su función principal es la de dar soporte y flexibilidad a la planta. Aunque comparte aspectos con el parénquima, sus células se caracterizan por presentar un alargamiento axial, paredes celulares engrosadas y protoplastos vivos (Leroux, 2012).

• Esclerénquima.

Da soporte y mantiene la morfología propia de la planta de forma permanente. Está compuesto de células con paredes engrosadas y lignificadas, y de fibras alargadas que pueden alojar haces vasculares (Lopez y Barclay, 2017).

➤ **Sistema vascular**

• Cámbium vascular.

Se trata de un meristemo situado en el tallo, constituido por una fina capa de células (fusiformes y radiales) que forman un “anillo” a partir del cual se diferencian las células del xilema y del floema (Megías *et al.*, 2019).

• Xilema.

Transporta agua y nutrientes desde la raíz hacia las hojas. Está constituido por hileras de células sin citoplasma, con paredes altamente lignificadas y perforadas que permiten el ascenso del agua debido a la diferencia de potencial hídrico entre la parte aérea y la subterránea (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 2000).

• Floema.

Lo forman células vivas unidas formando un tubo criboso. Conduce sustancias disueltas en agua, siendo más del 80 % azúcares (principalmente sacarosa), potasio y nitrógeno (en forma de aminoácidos). En el inicio del tubo (célula fuente) se acumulan azúcares que provocan el aumento de la presión; al liberarse los azúcares al final del tubo (célula sumidero) se produce una diferencia de presión que permite la circulación del agua y el arrastre de las sustancias (García Luis y Guardiola, 2000).

En la **Figura 7** se muestra la ubicación de los principales tejidos presentes en los sarmientos de vid.

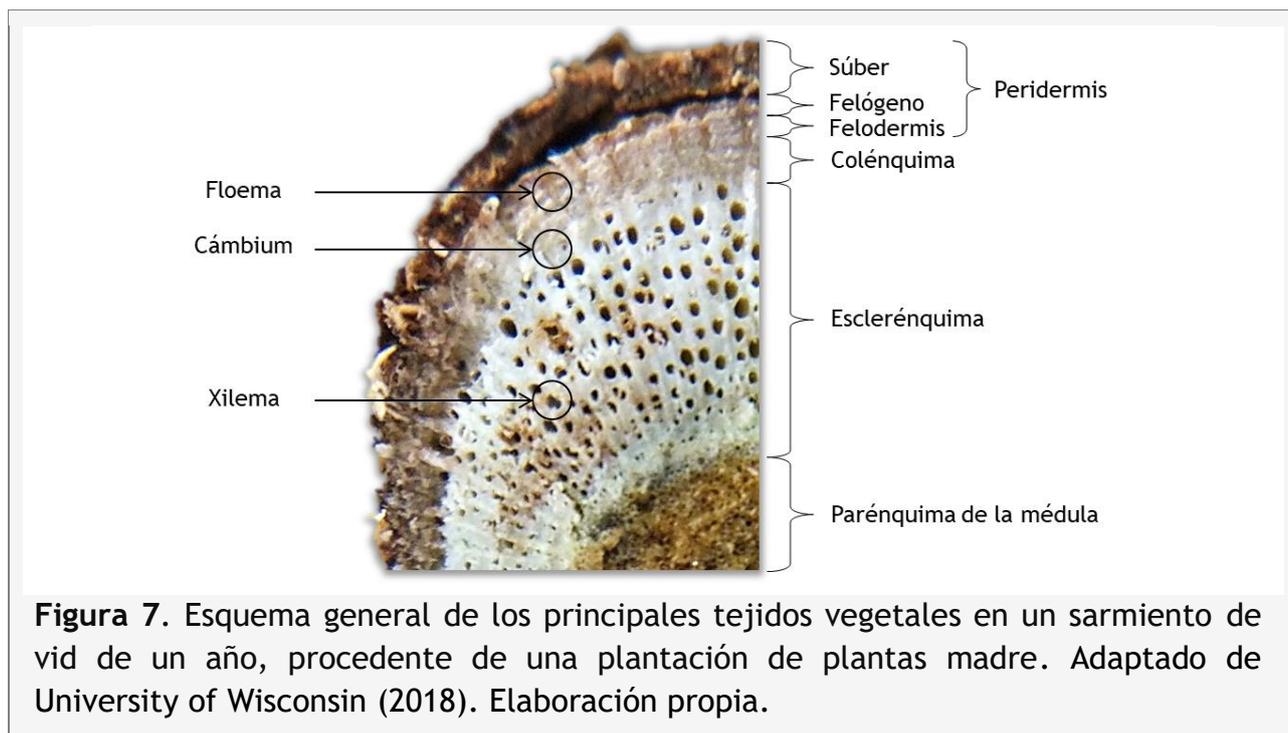


Figura 7. Esquema general de los principales tejidos vegetales en un sarmiento de vid de un año, procedente de una plantación de plantas madre. Adaptado de University of Wisconsin (2018). Elaboración propia.

A la hora de estudiar los fundamentos de la nutrición vegetal, así como para comprender el funcionamiento de los procesos relacionados con la síntesis de almidón, es importante conocer las funciones de los distintos tejidos vegetales y las relaciones entre ellos.

I.2.2. EFECTOS DE LA NUTRICIÓN MINERAL

Las necesidades nutricionales varían en función del tipo de planta, del tejido vegetal, y del estado fenológico y se ven afectadas por el grado de disponibilidad de nutrientes asimilables en el suelo. Por ello, resulta necesaria realizar la determinación analítica de las necesidades de la planta en un momento concreto (análisis foliar) y a su vez, analizar el estado nutricional del suelo (Gárate y Bonilla, 2000).

Elementos esenciales

Los criterios que se han de cumplir para que un elemento mineral se considere esencial fueron propuestos por primera vez por Arnon y Stout de la siguiente forma:

“Un elemento no se considerará esencial a menos que,

- a) una deficiencia del mismo imposibilite que la planta complete su fase vegetativa o reproductiva;*
- b) dicha deficiencia sea específica del elemento en cuestión, y sólo pueda prevenirse o corregirse mediante el suministro de dicho elemento;*
- c) el elemento esté directamente relacionado con la nutrición de la planta, aparte de sus posibles efectos en la corrección de alguna condición microbiológica o química desfavorable del suelo u otro medio de cultivo.”*

(Arnon y Stout, 1939, p. 371)

Conocer las características y deficiencias nutricionales asociadas a los macroelementos y microelementos esenciales, resulta fundamental en el planteamiento de una correcta fertilización, e imprescindible para la optimización y el desarrollo de nuevos planes de abonado que persigan un objetivo concreto además de la correcta nutrición de la planta. Las principales implicaciones a nivel fisiológico de estos elementos esenciales y de los síntomas que indican su posible deficiencia [recogidos por Bonilla (2000) y Barceló *et al.* (2001)], se resumen a continuación:

➤ **Macroelementos**

• **Nitrógeno.**

Puede ser absorbido como ion amonio (NH_4^+) e ion nitrato (NO_3^-). Se encuentra formando parte de las principales biomoléculas: proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, amidas, amins y clorofila; por lo que está implicado en todos los procesos que tienen lugar durante el desarrollo vegetativo (Engels y Marschner, 1995). Su déficit provoca una reducción de la división celular y la actividad fotosintética se reducen (Zhao *et al.*, 2005), además causa clorosis en las hojas adultas que, en caso de agravarse, pueden llegar a caer. El exceso de nitrógeno provoca un exceso de vigor, un adelanto de la floración y un retraso de la maduración, siendo bien conocida la tendencia de la vid hacia unas menores condiciones de productividad como consecuencia de unos niveles excesivos de nitrógeno (Dry y Coombe, 2005). Desafortunadamente apenas existe conocimiento de las posibles causas que estas condiciones nutricionales provocan en los niveles de almacenamiento de almidón, si bien autores como Holzapfel *et al.* (2010), sugieren implicaciones de carácter fisiológico que conllevarían una deficiencia de acumulación de carbohidratos inducida por esta causa.

• **Fósforo.**

Su absorción está ligada al valor de pH del suelo. Situaciones de acidez propician la disponibilidad del ion fosfato (H_2PO_4^-), mientras que en ambientes básicos prevalece la forma divalente (HPO_4^{2-}). En la planta, forma parte de estructuras celulares como los ácidos nucleicos o los fosfolípidos, e interviene en procesos vitales como la fotosíntesis y la respiración. En las rutas metabólicas, actúa aportando energía en las reacciones como, por ejemplo, en forma de ATP o ADP. Su déficit provoca una intensa coloración verde azulada en las hojas, pudiendo aparecer una coloración púrpura en los bordes o en las nerviaciones de las hojas. Además, puede provocar limitaciones en la acumulación de carbohidratos de reserva (Skinner y Matthews, 1990). Su exceso genera un gran desarrollo del sistema radicular, en comparación con la parte aérea.

• **Potasio.**

La planta lo incorpora como catión potasio (K^+). Es movilizadofácilmente desde partes maduras a órganos jóvenes. Participa en la regulación estomática. Además, está presente en numerosos sistemas enzimáticos, como el de las sintetasas; y se encuentra vinculado al transporte de azúcares en los tejidos vasculares (Hermans

et al., 2006). Niveles deficitarios generan manchas cloróticas en las hojas y, a medida que se agrava su deficiencia, se desarrollan zonas necróticas en la punta y los bordes. El porte de la planta se vuelve achaparrado, con un acortamiento de la distancia entre nudos. El exceso de K disponible puede interferir en la correcta absorción de Ca y Mg.

- Calcio.
Se encuentra fácilmente disponible como catión calcio (Ca^{2+}), salvo en suelos ácidos con abundantes precipitaciones, ya que puede producirse su lavado. Principalmente se encuentra en la pared celular, pero también es necesario en el funcionamiento de las membranas y algunas hormonas. La falta de este elemento provoca el cese del desarrollo vegetativo en los meristemos, ocasionando acortamiento del sistema radicular y necrosis y malformaciones en hojas jóvenes.
- Magnesio.
Es absorbido como catión (Mg^{2+}), pudiendo aparecer deficiencias en suelos de carácter muy ácido o arenosos. Además de estar presente en las moléculas de clorofila, participa en la activación de varias enzimas, entre ellas la enzima RUBISCO e interviene en la síntesis de ATP y de proteínas. De forma general, su déficit provoca clorosis en las hojas adultas, apreciándose decoloraciones en las zonas intervenales. En el caso de necrosis de los racimos en envero, la aplicación de una solución de magnesio puede disminuirla parcialmente (Keller, 2015).
- Azufre.
Se asimila como ion sulfato (SO_4^{2-}) por el sistema radicular o como dióxido de azufre (SO_2) por los estomas. En este caso es un problema, ya que se produce un desplazamiento del Mg de la clorofila y por lo tanto un descenso de la actividad fotosintética. El azufre forma parte de aminoácidos (cisteína y metionina), de varias coenzimas, participa en la degradación de ácidos grasos y en la respiración celular. Además, se le vincula con procesos de fijación de metales pesados. La aparición de una clorosis generalizada en las hojas jóvenes y un menor desarrollo vegetativo acompañado de tejidos quebradizos, son indicios de déficit de azufre.

➤ **Microelementos**

- Hierro.
Las plantas lo captan fácilmente como ion ferroso (Fe^{2+}) o bien como ion férrico (Fe^{3+}). Se encuentra ligado a procesos de gran importancia, como los fotosintéticos, al formar parte de proteínas esenciales como, por ejemplo, la ferredoxina; o en los procesos de fijación de nitrógeno y respiración. Además, es esencial en el proceso de síntesis de la molécula precursora de la clorofila. En suelos de carácter básico suelen aparecer síntomas de clorosis férrica: clorosis amarillenta intervenal en hojas jóvenes que puede llegar a afectar a las venas.
- Manganeso.
La forma más común en que es asimilado es como catión manganeso (Mn^{2+}). Actúa como activador de enzimas en cloroplastos y mitocondrias, así como en algunas

fases del ciclo de Krebs. Un desequilibrio de los niveles de Mn puede provocar una clorosis intervenal con la posibilidad de que se generen manchas necróticas que generalmente se observan antes en hojas jóvenes.

- Zinc.

La disponibilidad del ion zinc (Zn^{2+}) aumenta en suelos ácidos, y se absorbe generalmente en forma de quelato. Mantiene una vinculación directa con la síntesis de auxinas. Está presente en numerosos sistemas enzimáticos, algunos de ellos dentro de procesos como la fotosíntesis. En plantas leñosas, su déficit produce clorosis intervenal en hojas viejas, disminuye la tasa de crecimiento foliar, se forman hojas irregulares y se acorta la longitud de los entrenudos.

- Cobre.

En función de la presencia de aire en el suelo, se absorberá en forma de ion cúprico (Cu^{2+}) cuando el suelo sea aireado, y en forma de ion cuproso (Cu^+) cuando en el suelo falte oxígeno o esté encharcado. Está implicado en procesos REDOX relacionados con la fotosíntesis y la respiración mitocondrial, así como en la síntesis de precursores de la lignina. Una deficiencia de cobre puede ocasionar necrosis en los ápices foliares y una reducción de la lignificación.

- Cloro.

Fácilmente disponible, se asimila como ion cloruro (Cl^-). Es necesario en la estabilización del cloroplasto y en el proceso de fotólisis del agua. Además, interviene en el funcionamiento de los estomas y en el mantenimiento del pH dentro de las células. Los síntomas que indican su deficiencia se muestran como un marchitamiento de las hojas, llegando a necrosarse, y se produce una reducción de la longitud de las raíces al mismo tiempo que se engrosan sus ápices.

- Boro.

Se absorbe como ion borato (BO_3^{3-}). Principalmente, se encuentra ligado a la pared celular desempeñando una función estabilizadora. Además, se le vincula en procesos relacionados con el desarrollo vegetativo. Su deficiencia provoca cambios en determinadas rutas metabólicas dando como resultado la formación de compuestos de naturaleza fenólica tóxicos para la planta; frena el desarrollo de raíces, tallos y hojas jóvenes, llegando a ocasionar la necrosis de las zonas meristemáticas. Las hojas toman una coloración cobriza y se endurecen. En los tallos pueden aparecer grietas.

- Molibdeno.

En el suelo se encuentra, mayoritariamente, como sal de molibdato (MoO_4^{2-}), aumentando su disponibilidad a medida que aumenta el valor del pH. Interviene en el proceso de asimilación de nitratos, en la fijación biológica del nitrógeno y en la síntesis del ácido abscísico. La floración puede quedar inhibida ante la falta de Mo, las hojas aparecen cloróticas en su zona intervenal, hasta el punto de que se pueden necrosar y llegar a secarse por completo.

I.2.3. BIOSÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DEL ALMIDÓN

La síntesis de sustancias de reserva se inicia en el proceso de fotosíntesis, en el cual, la energía lumínica se transforma en energía química, fijándose el carbono atmosférico en moléculas orgánicas, entre las cuales se encuentran los sacáridos, el ATP y NADPH. Estas moléculas servirán como fuente de energía de todos los procesos metabólicos.

De los elementos esenciales indicados anteriormente, seis de ellos (Mg, Mn, Fe, P, K, y Cu) están involucrados, de forma directa o indirecta, en el proceso de fotosíntesis, de ahí la importancia de mantener equilibrado el estado nutricional de la planta. Como detallaron Bowyer y Leegood (1997), la fotosíntesis consta de 2 fases bien diferenciadas:

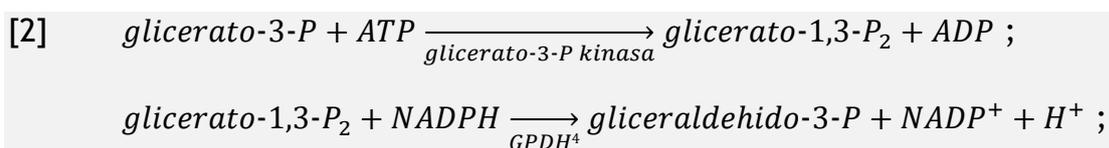
- Fase luminosa o fotoquímica: depende directamente de la luz. En esta fase, la clorofila absorbe la energía lumínica transportada por los fotones, oxidando las moléculas de agua en el fotosistema II y produciendo un gradiente electroquímico de protones, el cual, propicia la síntesis de NADPH en el fotosistema I y de ATP en el estroma a través de la enzima ATP sintetasa.
- Fase oscura o asimilatoria: consta de un conjunto de reacciones que pueden darse tanto de día como de noche, en las que se convierte el CO₂ en glucosa. La ruta metabólica central de la fase oscura es el ciclo de Calvin. Este ciclo consume 3 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADPH por cada molécula de CO₂ fijada.

Este proceso tiene lugar en tres fases (**Figura 8**):

- carboxilación; se genera *glicerato-3-P* a partir de *ribulosa-5-P*, mediante la intervención de la enzima *ribulosa – 1,5 – bisfosfato carboxilasa/oxigenasa* (RUBISCO) [1], quedando fijado el carbono atmosférico:



- reducción; a partir del *glicerato-3-P* se sintetiza *gliceraldehido-3-P* (G3P) consumiendo ATP y NADPH [2], el cual, puede considerarse como el primer producto final de la fotosíntesis; mediante la actuación de la *triosa-P isomerasa* se transforma en *dihidroxicetona-P* (DHAP), actuando en ambos sentidos:



⁴ Gliceraldehido-P deshidrogenasa.

- regeneración; a partir de 5 moléculas de G3P, y tras varias reacciones en cadena, se sintetizan 3 moléculas de *ribosa-5-P*, cada una de éstas genera una molécula de *ribulosa-5-P*, cerrándose el ciclo.

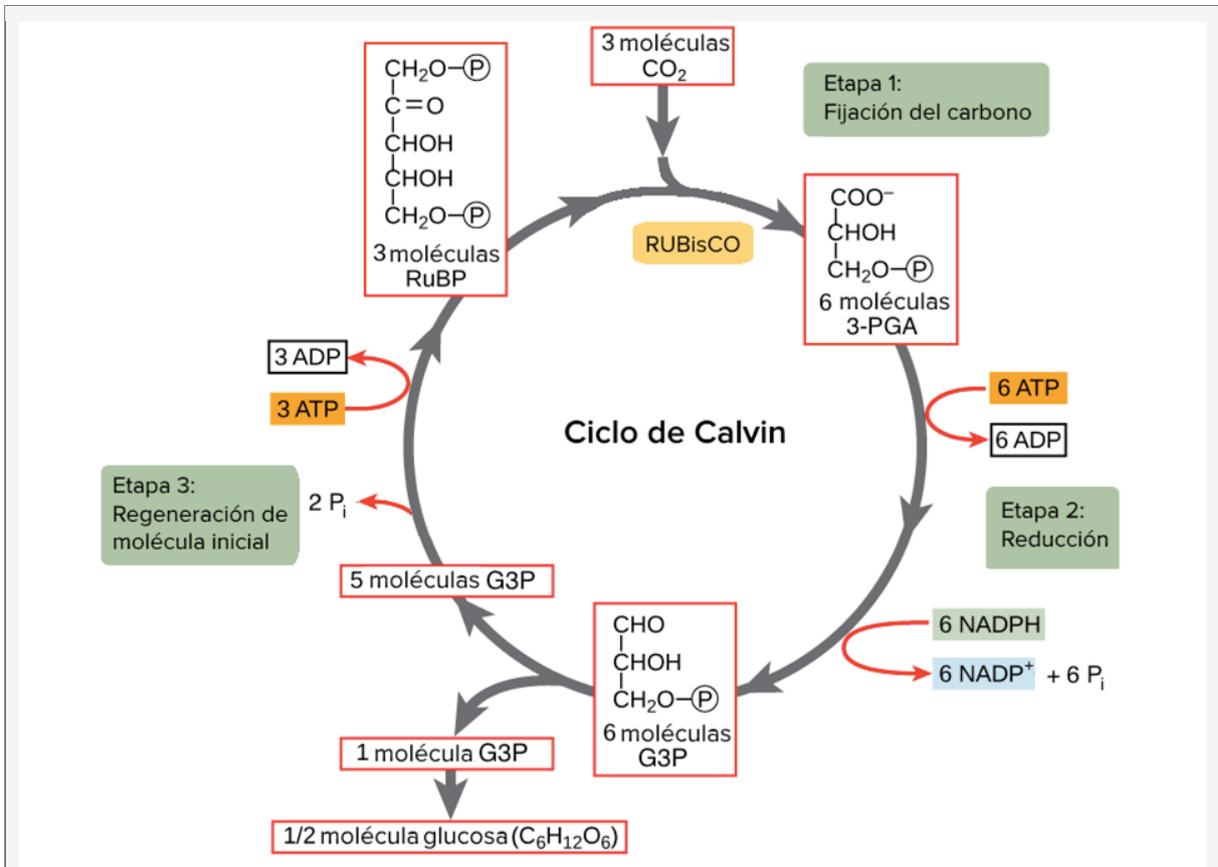


Figura 8. Ciclo de Calvin. Fijación de CO₂ atmosférico en forma de azúcares. Fuente: Khan Academy (2019), adaptado de OpenStax (2019).

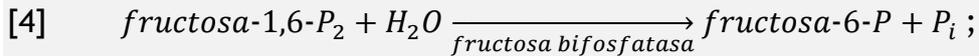
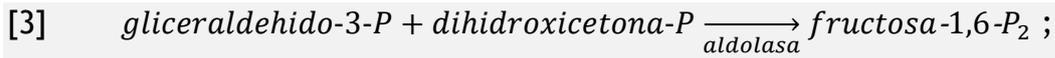
A partir de los productos intermedios y finales resultantes del ciclo de Calvin se sintetizan los distintos sacáridos que participan en el almacenamiento de energía, estos se describen a continuación.

I.2.3.1. MONOSACÁRIDOS: FRUCTOSA Y GLUCOSA

Los monosacáridos más relevantes en el transporte y almacenamiento energético dentro de la célula vegetal son la fructosa y la glucosa. Ambos azúcares tienen características similares: son hexosas, comparten una misma fórmula empírica (C₆H₁₂O₆) y pueden presentar configuración de anillo o de cadena abierta (Macy, 1976).

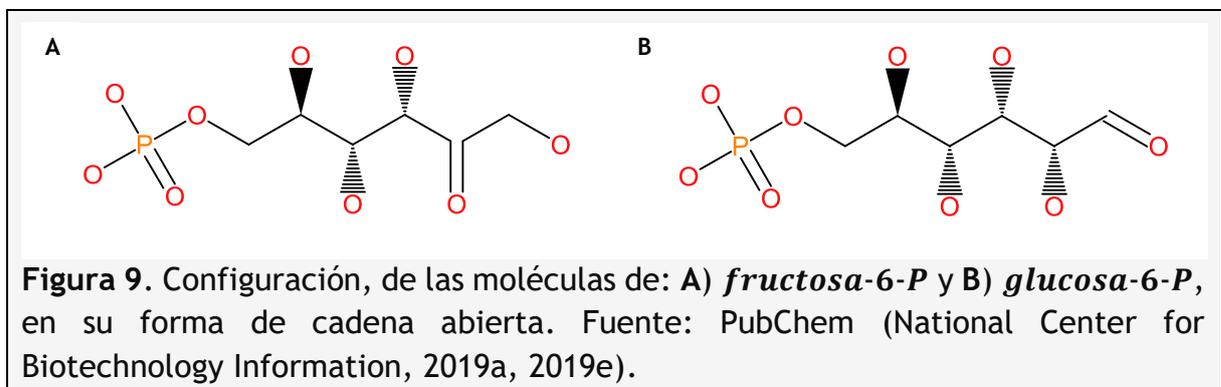
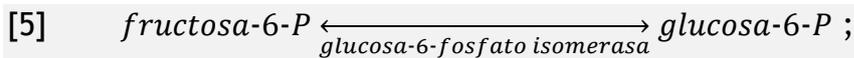
- Fructosa.

Se sintetiza en la fase de regeneración del ciclo de Calvin. Al inicio de dicha fase la enzima aldolasa convierte las moléculas de DHAP y G3P en *fructosa-1,6-P₂* [3], sobre la cual actúa la enzima *fructosa-1,6-bifosfatasa* para producir **fructosa-6-P** (F6P) [4] (Figura 9.A).



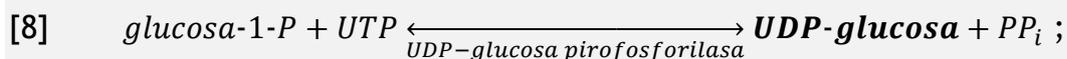
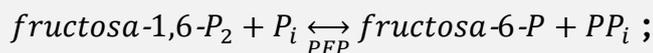
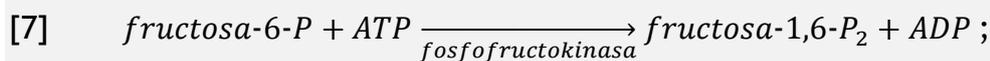
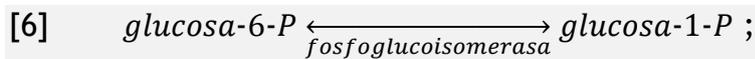
- Glucosa.

Posteriormente, sobre la F6P actúa la enzima *glucosa-6-fosfato isomerasa* transformándola en **glucosa-6-P** (G6P) [5] (Figura 9.B). Esta forma de glucosa fosfatada puede integrarse en otras rutas metabólicas dentro de la célula o transformarse en glucosa libre por la acción de la enzima *glucosa-6-fosfatasa*, y ser transportada a otras partes del organismo.



1.2.3.2. DISACÁRIDOS: SACAROSA

La sacarosa (Figura 10) es el producto más importante de la fotosíntesis, ya que es la molécula encargada de suministrar energía a las células y a partir de la cual se forman glucósidos de almacenamiento. Para su síntesis se parte de moléculas de *fructosa-6-P* y de *glucosa-6-P* presentes en el citoplasma, las cuales, tras una serie de reacciones enzimáticas (Avigad y Dey, 1997) paralelas ([6] y [7]), confluyen dando lugar a la molécula de *UDP-glucosa* [8]:



Existen dos posibles rutas para la obtención de sacarosa. En la primera de ellas se parte de *UDP-glucosa* y de *fructosa-6-P*, produciendo sacarosa [9] de forma eficiente incluso en situaciones de baja concentración de las moléculas de partida. En la segunda ruta interviene *UDP-glucosa* y fructosa para obtener sacarosa libre [10].

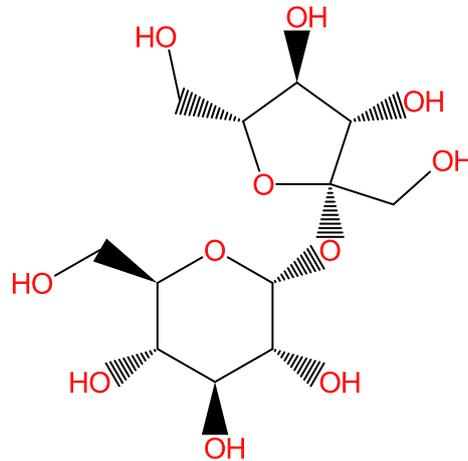
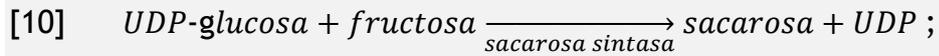
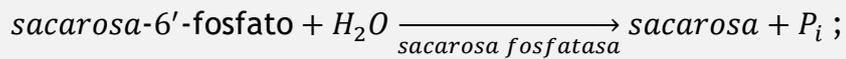


Figura 10. Diagrama estructural de la molécula de sacarosa. Fuente: PubChem (National Center for Biotechnology Information, 2019b).

I.2.3.3. POLISACÁRIDOS: ALMIDÓN

El almidón es un polisacárido de tipo homopolisacárido compuesto por residuos de glucosa unidos mediante enlaces de tipo α -glucosídicos. Existen dos formas (**Figura 11**):

- cadenas de amilosa, helicoidales, sin ramificar, con enlaces α -1,4;
- cadenas de amilopectina, ramificadas, con un enlace α -1,6 cada 30 enlaces α -1,4, aproximadamente (Berg *et al.*, 2008).

Generalmente, la proporción de amilopectina es muy superior, alcanzando porcentajes cercanos al 80% del total, frente al 20% que, aproximadamente, suele suponer la amilosa (Jenkins y Donald, 1995). Estas variaciones a nivel estructural dependen de cada especie vegetal, y afectan al uso que se pueda hacer del almidón (Copeland *et al.*, 2009).

La síntesis de almidón se produce, bien dentro de los cloroplastos [11 y 12], formando pequeñas reservas de almidón que se utilizan de forma muy localizada, o también fuera de las estructuras fotosintéticas, en los amiloplastos [11 y 12] donde a partir de sacarosa, se genera almidón para su almacenamiento a largo plazo. En ambos plastos, a la molécula de *ADP-glucosa* se le adicionan residuos de glucosa mediante la acción de la enzima *almidón sintasa* (Barceló Coll *et al.*, 2001).

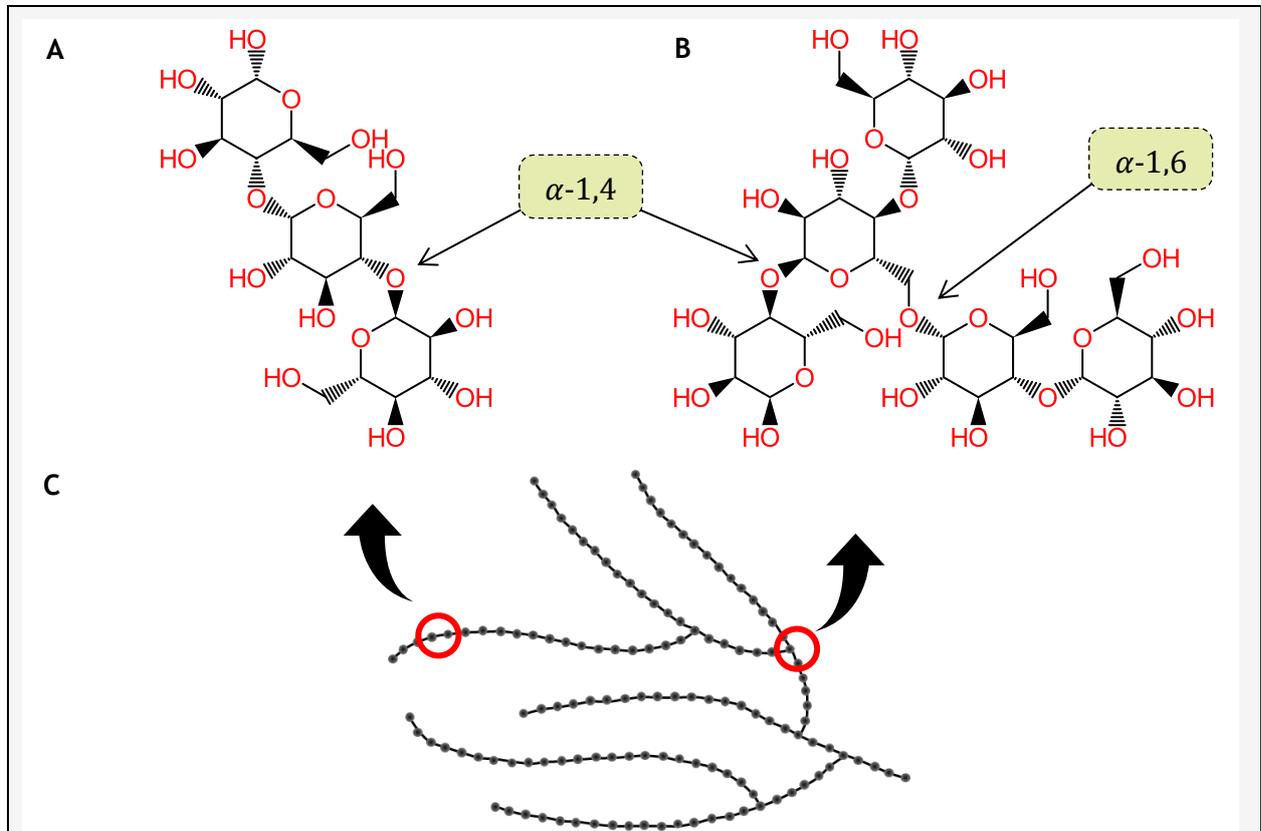
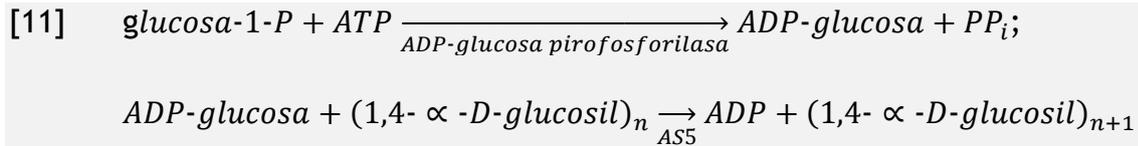


Figura 11. Diagrama estructural de (A) amilosa y (B) amilopectina. Fuente: PubChem (National Center for Biotechnology Information, 2019c, 2019d). (C) Ubicación de ambas moléculas dentro de la estructura ramificada del almidón. Adaptada de Schoch (1961, p. 83).

Este último paso, repetido de forma continua, elonga la molécula de amilosa. La acción de una enzima ramificadora [12] une varias cadenas de amilosa generando el enlace α -1,6 que da lugar a la estructura ramificada de la amilopectina.



Como resultado final, se obtienen cadenas de amilopectina y de amilosa, que forman gránulos insolubles de almidón (Zeeman *et al.*, 2010). Ambas rutas de síntesis de almidón están relacionadas entre sí, como se puede observar en la **Figura 12**. En un primer momento, el gránulo de almidón es almacenado en el propio plasto en el que se ha sintetizado. En el caso de los cloroplastos, una parte de los carbohidratos

⁵ AS: almidón sintasa.

almacenados como almidón es utilizada durante el proceso de respiración; mientras que el almidón restante es degradado durante la noche (Tetlow *et al.*, 2004) y transportado a diferentes órganos de la planta en forma de sacarosa, sirviendo como base para la síntesis de almidón en los amiloplastos, en los que permanecerá como reserva de energía a largo plazo (Zeeman *et al.*, 2010).

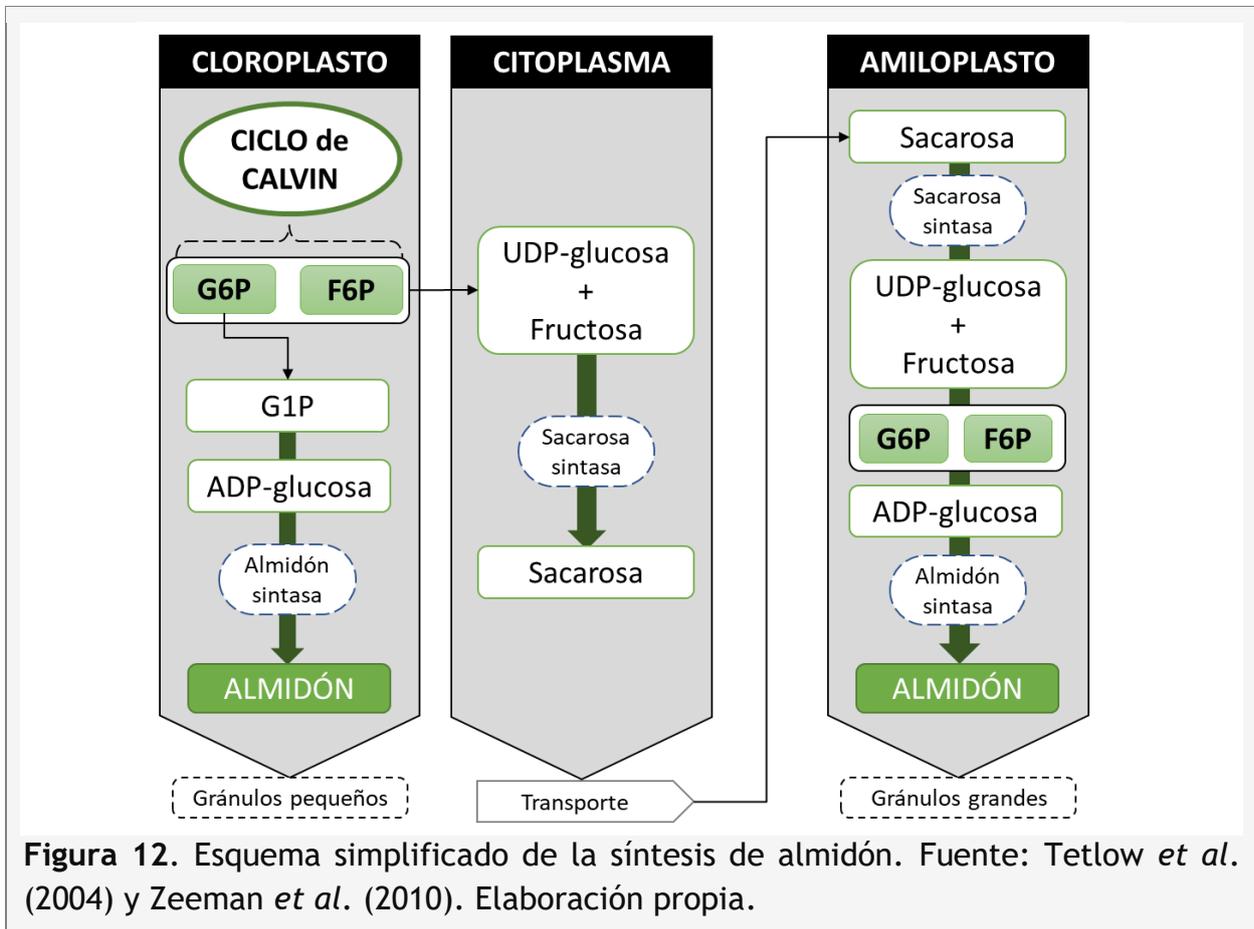


Figura 12. Esquema simplificado de la síntesis de almidón. Fuente: Tetlow *et al.* (2004) y Zeeman *et al.* (2010). Elaboración propia.

Las plantas utilizan la molécula de almidón como almacén energético a largo plazo. El almidón almacenado en las raíces, en el tallo y en los sarmientos se comienza a movilizar al desarrollarse las primeras hojas, esta movilización sigue aumentando hasta el inicio de la floración. En este punto, el nivel de movilización de las reservas de almidón comienza a disminuir, al mismo tiempo que se inicia la síntesis y el almacenamiento de nuevas reservas (Lacointe *et al.*, 1993; Zapata *et al.*, 2004).

I.3. DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN

La determinación del nivel de almidón en órganos especializados para su almacenamiento como, por ejemplo, tubérculos y semillas, se ha realizado mediante procesos enzimático-colorimétricos (Vos-Scheperkeuter *et al.*, 1986; Rasmussen y Henry, 1990), o mediante técnicas de espectroscopía infrarroja con las que detectar (Soest *et al.*, 1995) y/o caracterizar (Kizil *et al.*, 2002; Holder, 2012; Warren *et al.*, 2016) el almidón existente en dichos órganos. En otros estudios se han utilizado técnicas

de HPLC⁶ (Basha, 1992; Gomez *et al.*, 2002) y de cromatografía de gases (Dickson, 1979; Van-Den *et al.*, 1986) para determinar tanto la composición de los azúcares solubles extraídos, como la cantidad de carbohidratos insolubles.

La concentración de almidón es muy elevada dentro de los órganos destinados a la reserva energética a largo plazo, en comparación con la cantidad de almidón existente en tejidos no especializados (Gott *et al.*, 2006). En función de la técnica elegida, esta circunstancia puede afectar a la precisión de la determinación analítica. A continuación, se describen brevemente las principales técnicas empleadas para la cuantificación de almidón.

I.3.1. COLORIMETRÍA

Este tipo de técnicas pretenden extraer la mayor cantidad de almidón del tejido vegetal evitando su mezcla con el resto de los azúcares, de tal forma que la fase de degradación enzimática tan sólo afecte a los gránulos de almidón, pudiendo así cuantificar su cantidad mediante colorimetría.

Este método requiere un proceso de preparación previo para retirar los sacáridos solubles que puedan interferir en la posterior cuantificación del almidón. El material vegetal se deseca, se tritura y se le aplica una solución de extracción, que puede tratarse de una solución acuosa con una concentración variable de etanol, metanol o cloroformo (Chow y Landhäusser, 2004), o una solución de ácido sulfúrico y fenol (Buysse y Merckx, 1993). De esta forma, se eliminarán los azúcares solubles del material vegetal y se mantendrá el almidón. El almidón presente en el tejido vegetal se disuelve mediante una solución de KOH (Guraya y Toledo, 1993), finalizando así la fase de preparación.

Digestión enzimática del almidón

Tras su extracción, el almidón se degrada con las enzimas α -amilasa y amiloglucosidasa, para obtener moléculas de glucosa. A continuación se resume la función de dichas enzimas, catalogadas por el IUBMB⁷ como EC 3.2.1.1 y EC 3.2.1.33, respectivamente, y recopiladas por McDonald *et al.* (2009):

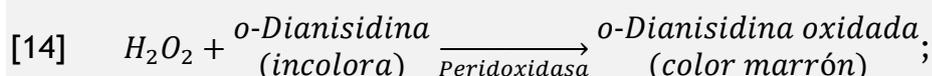
- α -amilasa: tiene la función de catalizar la reacción de hidrólisis de la amilosa y la amilopectina en glucosa, actuando sobre los enlaces α -1,4-glucosídicos en aquellos polisacáridos con 3 o más unidades de *D*-glucosa (McDonald, 2005b);
- amiloglucosidasa: hidroliza el enlace α -1,6-glucosídico, liberando la cadena de glucosas que forman las ramificaciones (Lee y Whelan, 1971; McDonald, 2005a).

⁶ Cromatografía líquida de alta eficacia.

⁷ International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

Determinación colorimétrica

Una vez degradado el almidón en glucosa es necesario cuantificar la cantidad de glucosa presente en la muestra. Para ello se utiliza un método colorimétrico empleando como aparato de medida un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-VIS), para lo que es necesario preparar una recta patrón a partir de diferentes concentraciones de glucosa. Siguiendo la indicaciones de Sigma-Aldrich (2018c). A cada muestra patrón se le añade un catalizador (glucosa oxidasa) [13] y un colorante (o-Dianisidina) [14]; tras la reacción química, se observa una coloración más intensa cuanto mayor es la cantidad de glucosa.



Según Chow y Landhäusser (2004), la longitud de onda a la que se realiza la lectura puede variar entre los 450-525 nm sin que se detecten diferencias en el resultado, pudiendo realizarse también a 420 nm; mientras que Bellasio *et al.* (2014) indican que una longitud de onda de 530 nm es óptima para analizar el contenido de almidón en diversos materiales vegetales, incluyendo tejidos lignificados.

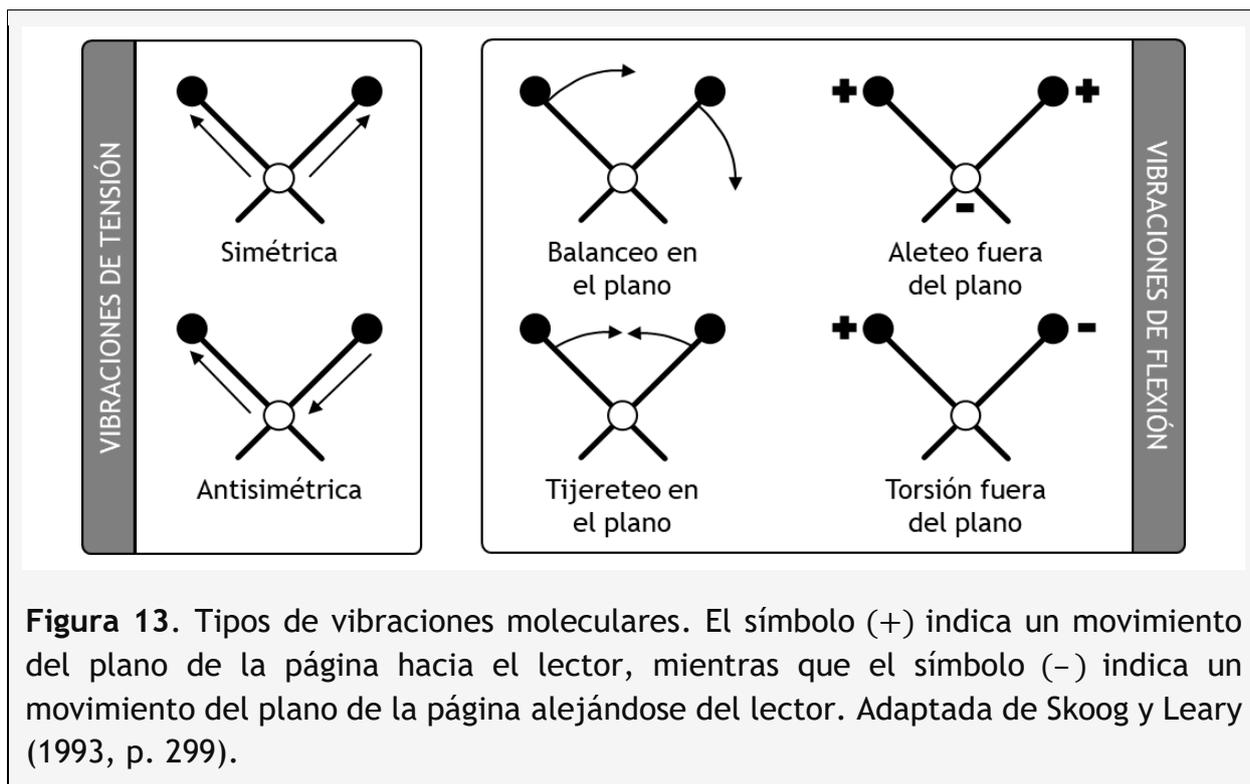
I.3.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Como indican Skoog y Leary (1993), el principal interés de utilizar la espectroscopía de absorción en el espectro del infrarrojo (Tabla 2) para realizar análisis cualitativos y cuantitativos de sustancias orgánicas, es la gran resolución de los espectros obtenidos. Esto permite comparar espectros complejos, especialmente en la región denominada “huella digital” (1200-700 cm^{-1}), e incluso determinar cuantitativamente una sustancia dentro de una mezcla compleja.

Tabla 2. Regiones en las que se divide el espectro infrarrojo y región más utilizada de forma general tanto en análisis cualitativos como cuantitativos. Adaptada de Skoog y Leary (1993, p. 297).

Región del espectro	Longitud de onda (λ), μm	Número de onda ($\bar{\nu}$), cm^{-1}	Frecuencia (ν), Hz
Cercano	0,78 – 2,5	12 800 – 4000	$3,8 \times 10^{14}$ - $1,2 \times 10^{14}$
Medio	2,5 – 50	4000 – 200	$1,2 \times 10^{14}$ - $6,0 \times 10^{12}$
Lejano	50 – 1000	200 – 10	$6,0 \times 10^{12}$ - $3,0 \times 10^{11}$
Más utilizada	2,5 – 670	4000 – 670	$1,2 \times 10^{14}$ - $2,0 \times 10^{13}$

La absorción de la radiación infrarroja se produce en aquellas moléculas que, tras su exposición a la radiación, experimentan transiciones rotacionales y/o vibracionales (Figura 13) que generan un cambio en el momento dipolar de la molécula.



Los movimientos rotacionales se observan mejor en gases y líquidos, mientras que, en los sólidos, estas transiciones están más restringidas y predominan las vibracionales.

I.3.2.1. ESPECTROSCOPIO INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

De los diferentes tipos de instrumentos con los que medir la absorción del infrarrojo⁸, los espectroscopios de infrarrojos que utilizan la transformada de Fourier (FTIR) para la decodificación de la señal en un espectro interpretable, son los que aportan ventajas significativas al proceso de medición de la absorbancia, como son:

- Alto rendimiento y elevada precisión. La radiación emitida apenas se atenúa al traspasar muy pocos elementos ópticos, lo que implica que el detector es alcanzado por una radiación potente, observándose una *ratio señal/ruido* mejorada y muy superior a la obtenida con otros instrumentos de medida.
- Rapidez en la lectura. Toda información de la muestra llega al detector en el mismo momento, es decir, las diferentes medidas que componen un espectro completo se toman a la vez.

Su funcionamiento se resume a continuación:

⁸ Espectrofotómetros dispersivos de red, espectroscopía de transmisión de transformada de Fourier, fotómetros no dispersivos y fotómetros de reflectancia.

Los principales elementos de un equipo FTIR (Figura 14) son los siguientes:

- Emisor o fuente de infrarrojos.
- Interferómetro de Michelson.
- Detector.

Como fuente emisora de radiación infrarroja, los equipos FTIR disponen de una pieza sólida por la que se hace circular una corriente eléctrica que eleva la temperatura de la fuente hasta alcanzar valores de entre 1200 y 1900 °C, aproximadamente.

La radiación emitida por la fuente se dirige, dentro del interferómetro de Michelson, hacia un divisor de haz que genera dos haces perpendiculares y energéticamente idénticos. Uno de los haces es reflejado por un espejo fijo, mientras que el otro se refleja en un espejo móvil, recombinándose en el divisor de haz.

El haz recombinado incide sobre la muestra, la cual absorbe parte de la radiación, y aquella radiación que no es absorbida es recogida por el detector. De esta forma se genera un interferograma, en el que se representa la intensidad de la señal frente al desfase del espejo móvil. Al interferograma obtenido se le aplica el método matemático denominado transformada *de Fourier*.

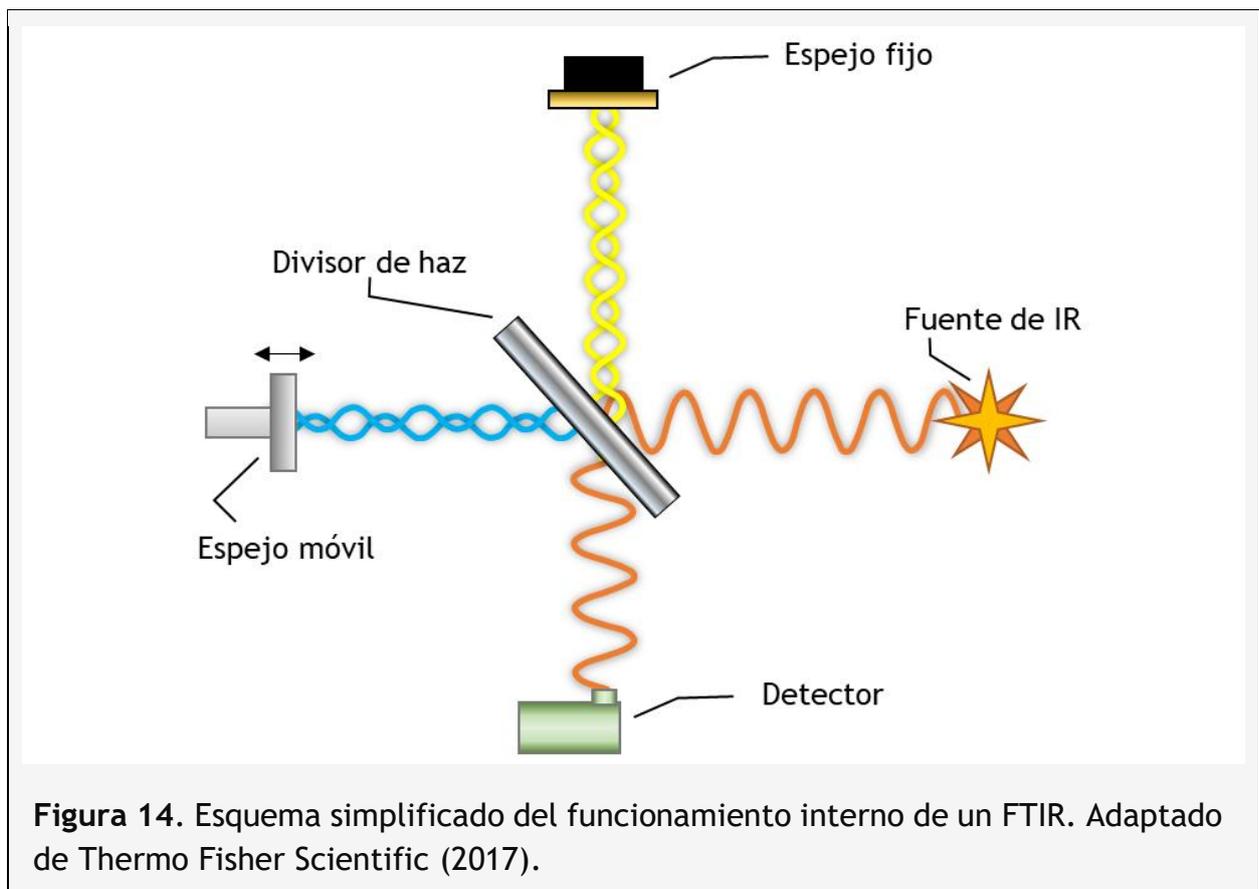


Figura 14. Esquema simplificado del funcionamiento interno de un FTIR. Adaptado de Thermo Fisher Scientific (2017).

La transformada de Fourier, desarrollada por Jean-Baptiste Joseph Fourier (1769-1830), se puede definir como una herramienta matemática con la que poder convertir una señal registrada en función del tiempo, en una señal en función de frecuencia (Elster, 2018) (Figura 15), es decir, una herramienta con la que descomponer una señal (periódica o aperiódica) compleja en las señales simples que la componen (Bobadilla *et al.*, 1999).

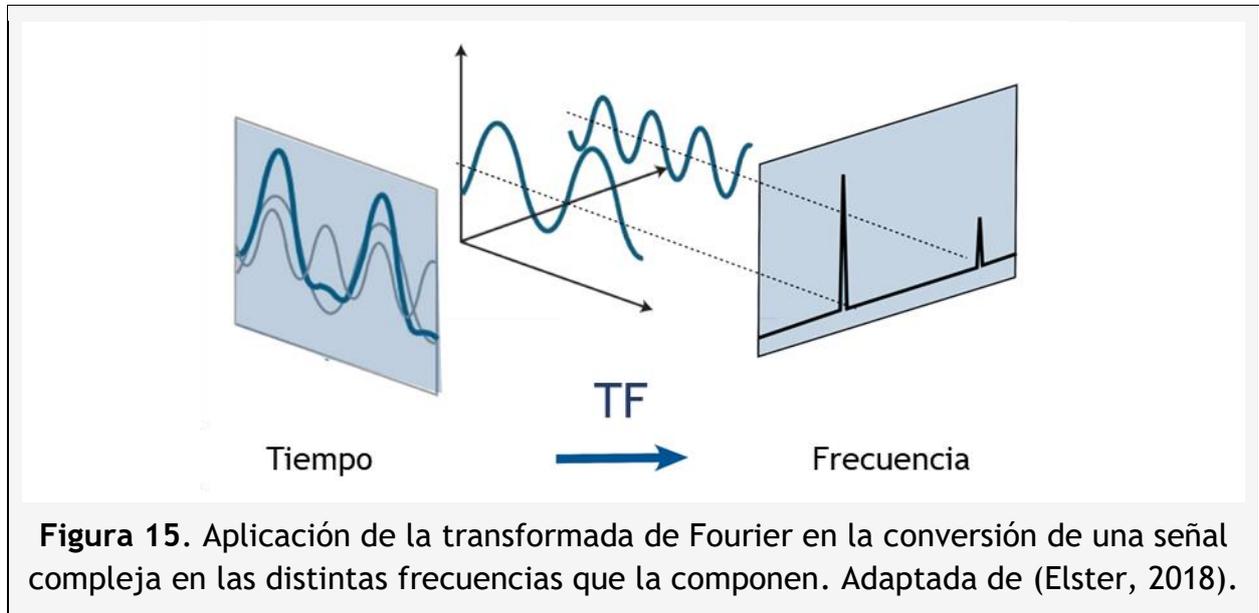


Figura 15. Aplicación de la transformada de Fourier en la conversión de una señal compleja en las distintas frecuencias que la componen. Adaptada de (Elster, 2018).

La aplicación de la transformada de Fourier al interferograma de una muestra (sólida, líquida o gaseosa), genera una representación gráfica de las diferentes frecuencias que componen dicho interferograma, correspondiéndose estas frecuencias con los elementos y/o sustancias presentes en la muestra, pudiéndose realizar su identificación y su cuantificación.

Esta técnica se utiliza en una gran variedad de líneas de investigación como, por ejemplo, en el estudio y análisis de la pared celular (Alonso-Simón *et al.*, 2004, 2011; Largo-Gosens *et al.*, 2014), en la caracterización de componentes de los tejidos vegetales como la lignina (Jääskeläinen *et al.*, 2003) o el almidón (Capron *et al.*, 2007; Henrique *et al.*, 2007).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En el proceso de producción de planta de vid injertada, una vez realizado el injerto de la variedad productiva, generalmente, con 1 o 2 yemas, se introducen los portainjertos en una solución de enraizamiento a base de auxinas derivadas del ácido indolacético, de forma que la parte inferior del portainjerto quede sumergida durante 24 horas.

A continuación, los injertos se trasladan a campo y se plantan. Es en este momento en el que el portainjerto debe desarrollar un sistema radicular adecuado que le permita realizar la captación de nutrientes correctamente y posibilitar el desarrollo vegetativo de la variedad a partir de sus yemas. Por lo tanto, durante un periodo de tiempo considerable que puede oscilar entre los 30-60 días, toda la actividad metabólica del injerto y en especial el desarrollo de un buen sistema radicular va a depender de la cantidad de reservas almacenadas en el portainjerto, es decir, de la cantidad de almidón.

Tras lo expuesto anteriormente, se plantea como hipótesis inicial considerar que un mayor contenido de almidón en los portainjertos será un factor relevante que influirá de forma importante en el descenso de la tasa de mortalidad existente en plantas de vid en vivero.

II.2. OBJETIVOS

A continuación, se describen brevemente los objetivos de la presente tesis doctoral, existiendo un objetivo principal, en torno al cual se desarrollan una serie de objetivos específicos (**Figura 16**).

II.2.1. OBJETIVO GENERAL

A partir de la hipótesis de trabajo inicial, se plantea el siguiente objetivo general:

Determinar en qué medida influye el nivel de almidón presente en los portainjertos sobre la tasa de mortalidad de las plantas de vid injertadas. Una vez realizadas las tareas relativas a los objetivos específicos se realizará una valoración de la relación existente entre los valores de almidón determinados y la tasa de mortalidad registrada.

II.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar el objetivo general se plantean varios objetivos específicos que, entre otras cosas, pretenden desarrollar dos métodos analíticos complementarios que aporten información fiable de los niveles de almidón en portainjertos de vid. Al mismo tiempo, se plantean diferentes ensayos con el fin de obtener información preliminar sobre la influencia que puedan tener diferentes fertilizantes sobre los niveles de almidón en los tejidos vegetales leñosos.

Los objetivos específicos serían los siguientes:

- A) **Optimización de un método analítico colorimétrico basado en la degradación enzimática de almidón que permita cuantificar el almidón presente en portainjertos de vid.** De las diferentes fases del método analítico de partida susceptibles de optimización como triturado, extracción de azúcares solubles, extracción con KOH y degradación enzimática se plantea la realización de un estudio de la fase de extracción mediante KOH a fin de determinar el número de extracciones más adecuado para optimizar el proceso y extraer la mayor cantidad de almidón para su posterior valoración.
- B) **Desarrollo de un método para evaluar el contenido de almidón en portainjertos de vid mediante espectroscopía infrarroja.** El protocolo se calibrará y validará con la información obtenida previamente mediante la realización de numerosos ensayos por el método colorimétrico-enzimático, adaptado a las necesidades del estudio.
- C) ***Ensayar el efecto de la aplicación de fertilizantes sobre el contenido de almidón en sarmientos de planta madre.*** Se desea conocer en qué medida se puede actuar sobre el contenido de almidón generado por la planta y almacenado en los sarmientos, mediante tratamientos con fertilizantes aplicados al suelo con los que se puedan evitar deficiencias nutricionales de fósforo y de potasio.
- D) ***Comprobar el efecto de la aplicación foliar de magnesio sobre el contenido de almidón en sarmientos de planta madre y el porcentaje de planta injertada viable.*** Se comprobará en qué medida se puede actuar sobre el contenido de almidón generado por la planta madre y almacenado en los sarmientos, mediante la aplicación de tratamientos foliares que aporten magnesio. A partir de las plantas madre tratadas se obtendrá planta injertada y se comprobará el nivel de viabilidad al final del ciclo productivo.
- E) ***Estudio de la relación entre el nivel de almidón en portainjertos de vid y la mortalidad en planta injertada.*** A partir de los datos analíticos (obtenidos en el objetivo A) y los datos estadísticos de mortalidad (proporcionados por el vivero), se pretende observar si existe una relación entre ambos grupos de datos.

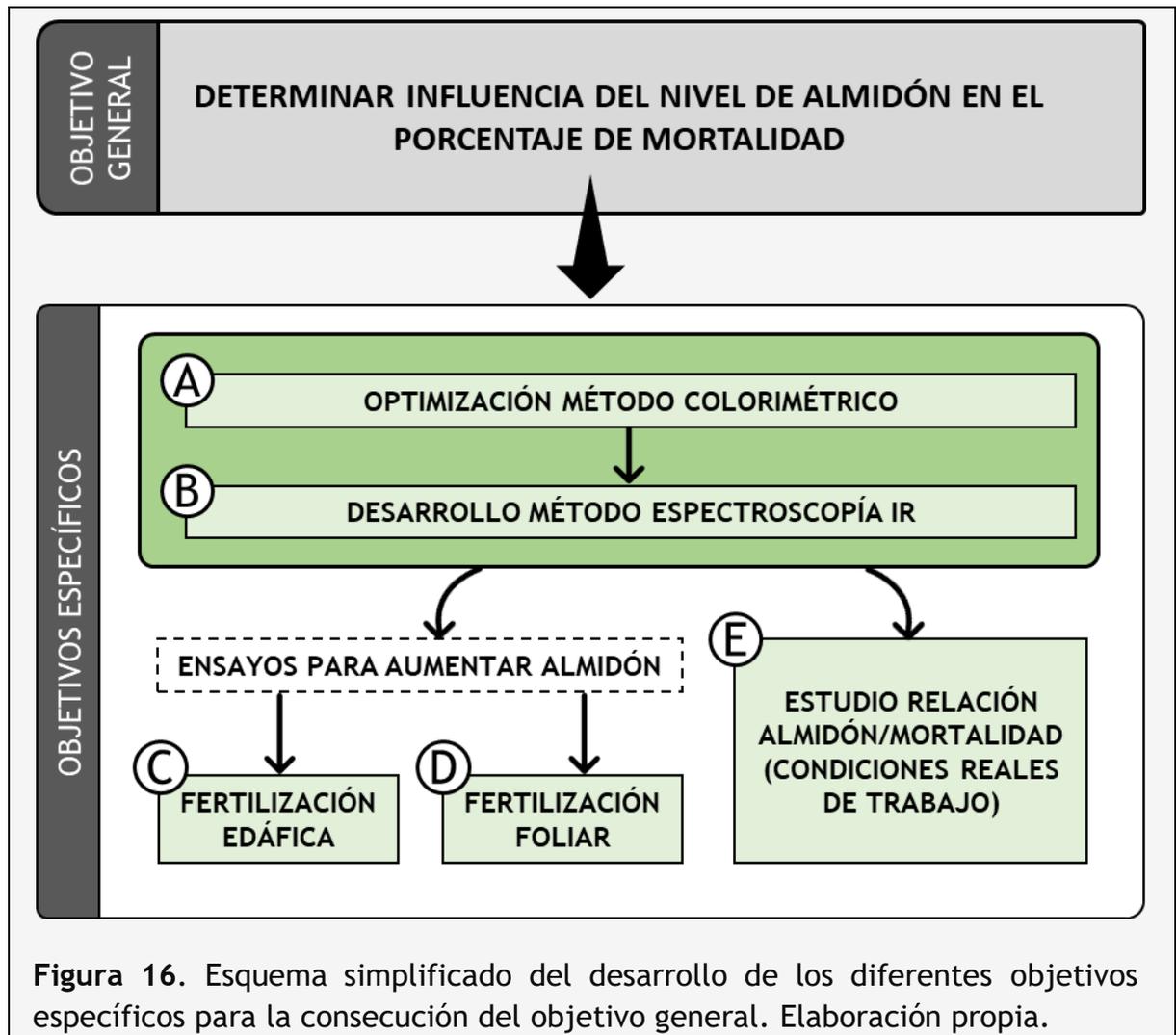


Figura 16. Esquema simplificado del desarrollo de los diferentes objetivos específicos para la consecución del objetivo general. Elaboración propia.

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. 1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal analizado proviene en su totalidad de pámpanos de planta madre americana, recogidos en el periodo comprendido entre el final del invierno y principios de la primavera. Cada muestra analizada tiene una longitud aproximada de 40 cm, y su diámetro está comprendido entre 6 y 12 mm. El material vegetal fuera de este rango no se considera útil para el proceso de injertado. Se pueden diferenciar dos bloques de muestras: las seleccionadas por el vivero y las recogidas del campo de ensayo.

Muestras seleccionadas por el vivero

A lo largo del desarrollo del trabajo el vivero ha realizado un muestreo al azar de portainjertos ya preparados para la etapa de injertado, agrupándolos en lotes de un tamaño medio de 10 portainjertos. Durante los años de estudio se han muestreado un total de 1365 portainjertos de hasta 11 variedades diferentes (Tabla 3). La mayoría de las muestras se corresponden con la variedad 110 R (36,4 %) y 140 Ru (20,4 %), sumando entre ambas el 56,8 % de las muestras analizadas (Figura 17).

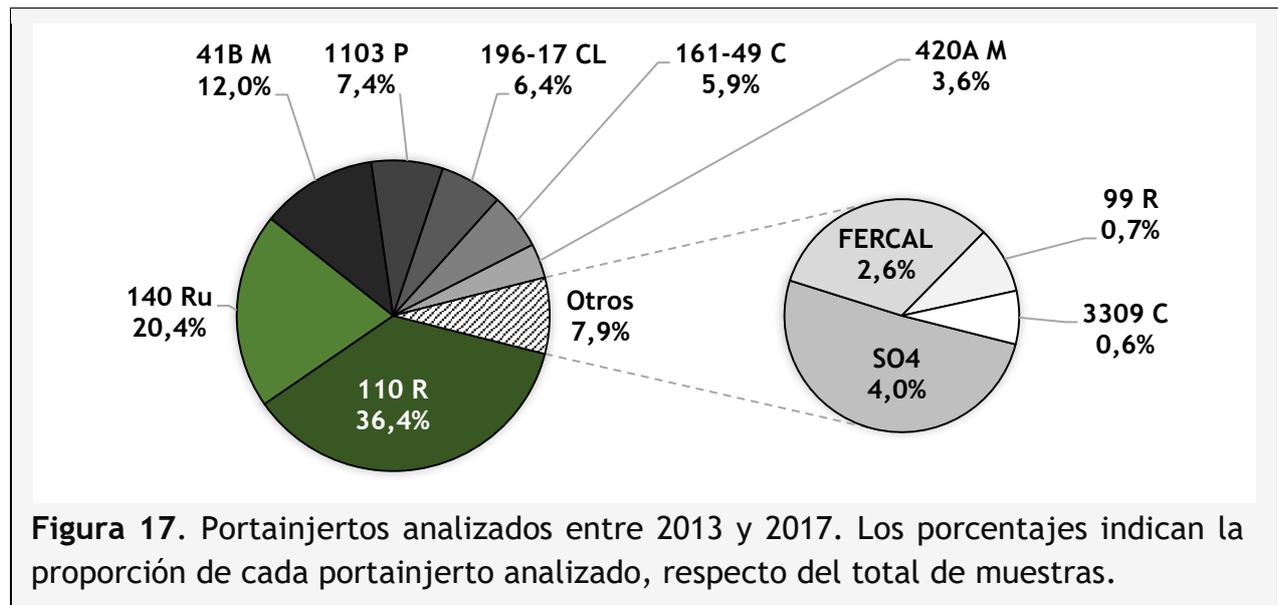
Tabla 3. Relación de la cantidad de portainjertos analizados de cada una de las variedades, durante cada año de estudio.

VARIETADES	PORTAINJERTOS POR AÑO DE ESTUDIO					PORTAINJERTOS
	2013	2014	2015	2016	2017	Subtotal
110 R	103	94	90	130	80	497
140 Ru	92	47	70	30	39	278
41B M	27	37	20	70	10	164
1103 P	11	40	20	20	10	101
196-17 CL	20	28	20	10	10	88
161-49 C		20	30	20	10	80
SO4	7	8	20	10	10	55
420A M	11	8	10	10	10	49
FERCAL	13	12	10			35
99 R		10				10
3309 C		8				8
				TOTAL		1365

Siete de las once variedades se han podido analizar de forma consecutiva durante los 5 años de estudio, lo que supone el 90,3 % del total de portainjertos en los que se ha determinado el nivel de almidón. Los portainjertos de 2013-2015 se utilizaron para optimizar el método enzimático, los de 2014-2015 para desarrollar el método de análisis mediante FTIR. Los portainjertos seleccionados entre 2014 y 2017 analizados de forma

continua, se utilizaron para realizar una comparativa entre los valores obtenidos mediante los dos métodos analíticos, así como para observar la evolución de los niveles de almidón de cada variedad en el tiempo.

Por último, los portainjertos de las variedades mayoritarias: 110 R, 140 R, 41 B y 1103 P, seleccionados entre 2014-2017 y de los que se dispuso de sus datos de mortalidad, se utilizaron para estudiar la relación entre el nivel de almidón y la mortalidad registrada al final del ciclo productivo.



Muestras recogidas del campo de ensayo

En este caso se han muestreado sarmientos completos recogidos directamente del campo de plantas madre en el que se han realizado los ensayos de fertilización edáfica y foliar. Se ha analizado tan sólo aquella parte del sarmiento dentro del rango útil, seccionando esta parte de los pámpanos en fragmentos de 40 cm, replicando así el trabajo de preparación de estacas realizado por el vivero. Durante la duración de los ensayos se han analizado un total de 1499 muestras de la variedad 110 R: 1018 correspondientes al ensayo de fertilización edáfica y 481 provenientes del ensayo de fertilización foliar.

III.2. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO ENZIMÁTICO PARA DETERMINAR ALMIDÓN EN TEJIDOS LEÑOSOS

Para determinar la cantidad de almidón almacenado en los portainjertos se ha tomado como punto de partida las indicaciones descritas por Chow y Landhäusser (2004) para la determinación del contenido de almidón en tejidos vegetales leñosos. Para la optimización se han utilizado los 886 portainjertos seleccionados por el vivero entre 2013 y 2015.

A continuación, se detalla cada una de las fases que componen el protocolo del método analítico enzimático de almidón utilizado en este estudio.

FASE 1. Preparación del material vegetal

Se comprueba que las muestras seleccionadas por el vivero tienen las características adecuadas para el estudio. En el caso de las muestras provenientes del campo de ensayo se procede a su limpieza: retirada de hojas, zarcillos y restos de tierra; y a continuación se seccionan en fragmentos de 40 cm. Una vez comprobado el material vegetal a analizar, se etiqueta para mantener la trazabilidad durante todo el proceso, se anota el peso de cada portainjerto y se procede a su descortezado utilizando una cuchilla, retirando únicamente la parte externa de la peridermis (**Figura 18**).

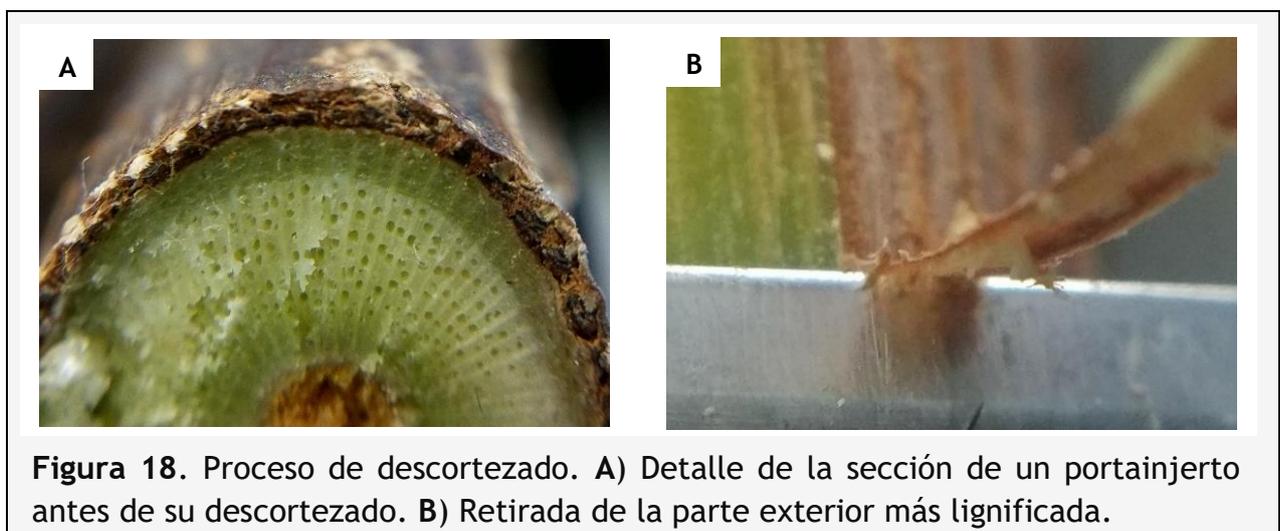


Figura 18. Proceso de descortezado. A) Detalle de la sección de un portainjerto antes de su descortezado. B) Retirada de la parte exterior más lignificada.

Los portainjertos descortezados se vuelven a pesar y se secan en estufa a una temperatura entre 68-70 °C durante 3 días, hasta comprobar que se alcanza un peso constante (peso seco). Seguidamente se lleva a cabo el triturado del material vegetal con un molino equipado con una malla de 0,25 mm de paso de luz y, a continuación, se tamiza con un tamiz de 0,25 mm para retirar aquellos fragmentos fibrosos que, debido a la potencia del molino, hayan podido pasar a través de la malla.

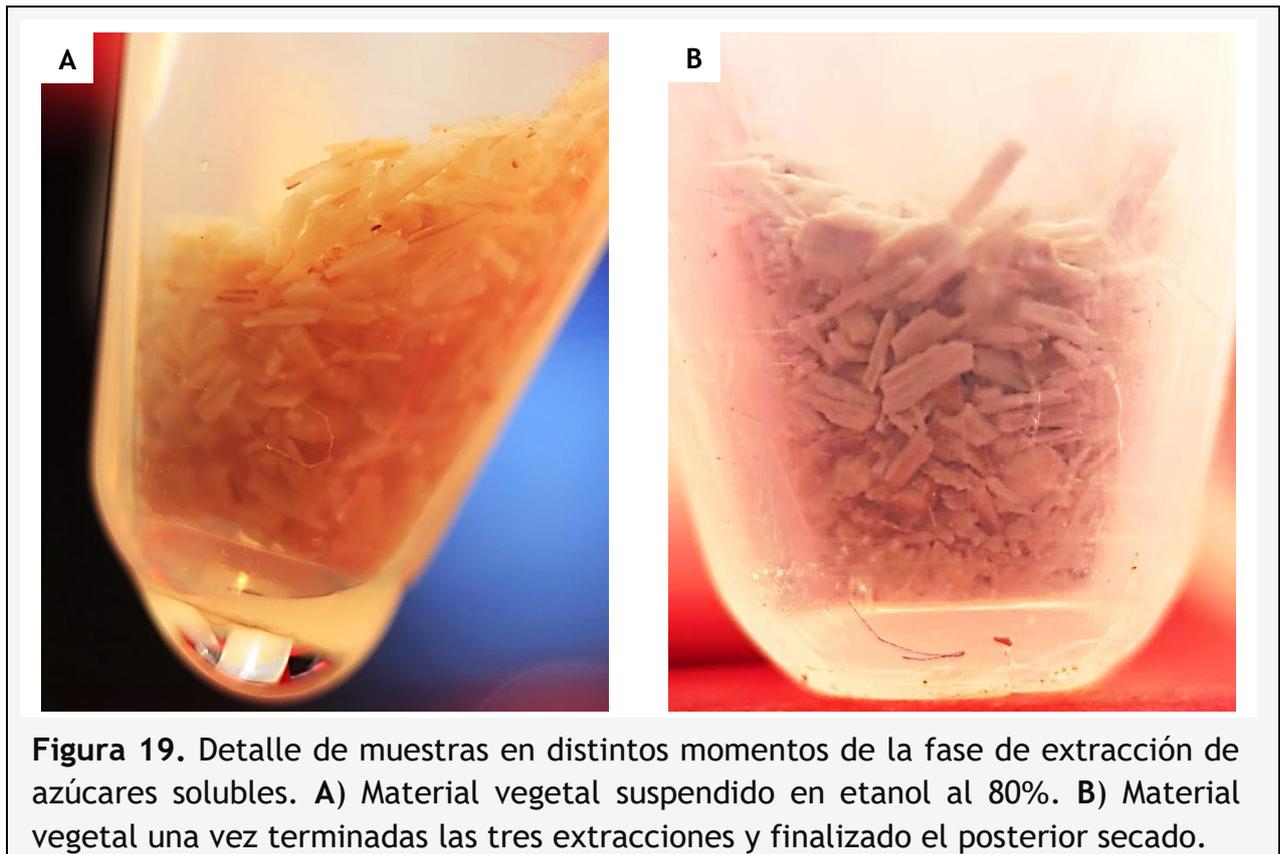
FASE 2. Extracción de azúcares solubles

En este ensayo es imprescindible evitar que los azúcares solubles existentes en el material vegetal estén presentes en el momento de aplicar el tratamiento enzimático, ya que pueden alterar el resultado final, al cuantificarse a la vez que los azúcares provenientes de la degradación del almidón.

Para ello, se parte de 50 mg del material vegetal tamizado, realizando por triplicado el siguiente proceso: el material vegetal se introduce en un tubo de 10 mL y se añaden 5 mL de una solución de etanol al 80% (**Figura 19.A**); se agita en vórtex para homogeneizar la mezcla y la muestra se mantiene en baño de agua a una temperatura de 95 °C, durante 10 minutos. Para recuperar el material vegetal, se centrifugan los

tubos a 2500 r.p.m., durante 5 minutos. A continuación, se desecha el sobrenadante cuidadosamente, evitando la pérdida de material vegetal en el proceso.

Tras cada extracción se puede apreciar un cambio de coloración en el sobrenadante: en la primera extracción se observan tonos dorados o amarillentos, mientras que en la tercera extracción el sobrenadante pasa a ser prácticamente transparente. El material sólido resultante se seca en estufa a una temperatura de 50 °C, durante unas 4 horas, eliminando así el etanol que puedan quedar en el material vegetal (**Figura 19.B**).



Una vez secada, la muestra se mantiene en condiciones de oscuridad a -20 °C para garantizar su conservación hasta la siguiente fase del proceso.

FASE 3. Solubilización de almidón

Dado que el almidón es un polímero muy poco soluble a pH neutro, para su extracción partir de material vegetal es necesario realizar un tratamiento de solubilización a pH alcalino. Tras este proceso de extracción, el almidón, quedando éste solubilizado en el extractante. Para ello, se toman 30 mg del material vegetal seco resultante de la fase anterior, a los que se añaden 2 mL de hidróxido de potasio (KOH) 0,2 N⁹. La mezcla se

⁹ El protocolo de partida utilizaba NaOH para realizar la digestión alcalina, en este caso se adaptó el método utilizando KOH, siendo ambos compatibles (Tang *et al.*, 2017). El volumen y la normalidad se han determinado experimentalmente.

homogeneiza utilizando un vórtex durante unos 20 segundos y un termomezclador a temperatura ambiente a 1200 r.p.m., durante 10 minutos. Las muestras homogeneizadas se mantienen en baño de agua a 95 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se agitan con un vórtex durante aproximadamente 10 segundos, con el fin de separar el material vegetal.

A continuación, se centrifuga la muestra a 13 000 r.p.m., durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recupera el sobrenadante y se almacena en un tubo hermético de 1,5 mL. El proceso de solubilización se realiza por triplicado de forma consecutiva, obteniéndose tres extracciones diferentes (**Figura 20**). Las extracciones se conservan en condiciones de oscuridad a una temperatura de 4 °C hasta la siguiente fase del proceso.

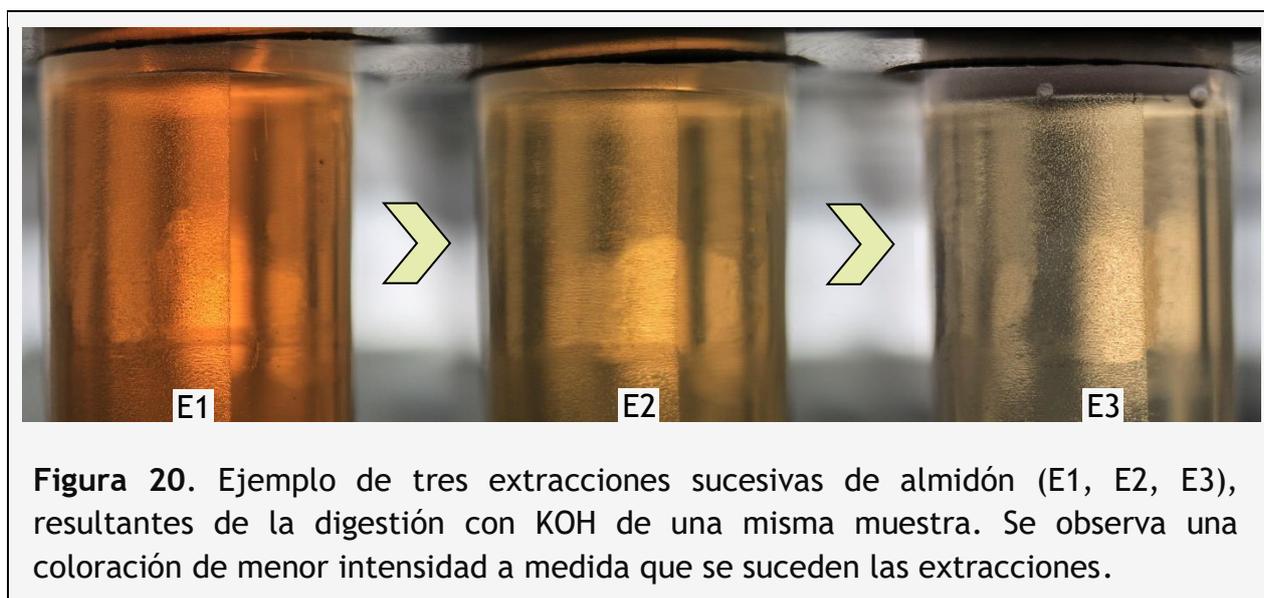


Figura 20. Ejemplo de tres extracciones sucesivas de almidón (E1, E2, E3), resultantes de la digestión con KOH de una misma muestra. Se observa una coloración de menor intensidad a medida que se suceden las extracciones.

FASE 4. Degradación enzimática del almidón en glucosa

El nivel de almidón solubilizado a partir de material vegetal se determina tras su degradación en glucosa. Para ello, a cada una de las extracciones se le añaden dos enzimas de forma consecutiva: se inicia el tratamiento aplicando α -amilasa y, a continuación, se adiciona amiloglucosidasa. Tras ambas reacciones enzimáticas, se valora la glucosa liberada resultante de la degradación del almidón.

Tratamiento con enzima α -amilasa

La cantidad de α -amilasa necesaria se ha de preparar en el momento de su uso, ya que se degrada y pierde actividad rápidamente. Se parte de α -amilasa comercial Sigma A3176-1MU/16U/mg proveniente de páncreas porcino (Sigma-Aldrich). Se pesan 25 mg de α -amilasa en una balanza de precisión.

A la enzima se le añaden 900 μL de agua destilada ultrapura y 100 μL de buffer α -amilasa 10X¹⁰, y se agita manualmente de forma suave. A continuación, de cada extracción se toman 200 μL y se añaden los correspondientes reactivos, en el siguiente orden:

- 1) 28 μL ¹¹ de ácido clorhídrico (HCl) 1 N.
- 2) 30 μL de buffer α -amilasa 10X.
- 3) 42 μL de α -amilasa [400 U/mL].

La preparación se introduce en baño de agua a una temperatura de 50 °C durante 2 horas, en condiciones de oscuridad.

Tratamiento con enzima amiloglucosidasa

Al igual que en el caso anterior, la preparación de *amiloglucosidasa* se realiza el mismo día de su uso. Se parte de *amiloglucosidasa* comercial Sigma A7420-100 MG/30-60U/mg proveniente de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). Se pesan 5 mg de enzima y se añade 1 mL de tampón acetato sódico 0,1 M (pH 5,0). A cada una de las muestras tratadas previamente con α -amilasa se le añaden los siguientes reactivos en el orden indicado:

- 1) 150 μL de tampón acetato sódico 0,1 M (pH 5,0).
- 2) 50 μL de *amiloglucosidasa* [150-300 U/mL].

La preparación se introduce en baño de agua a una temperatura de 55 °C durante 2 horas, en condiciones de oscuridad. A continuación, se centrifugan las muestras a 2500 r.p.m. durante 10 minutos, para separar el sobrenadante de los restos sólidos generados durante las reacciones enzimáticas.

Tras este proceso, se realizan tres valoraciones de cada una de las extracciones: R1, R2 y B; con el fin de asegurar que la determinación se ha desarrollado adecuadamente. Cada valoración tiene la siguiente función:

- R1: indica el valor final de glucosa.
- R2: se utiliza como control, ha de tener un valor entorno al 50% del valor de R1.
- B: sirve como valor “cero” de referencia para cada lectura.

Cada valoración se compone de una alícuota (Tabla 4) de cada extracción, a la que se añade tampón acetato 50 mM (pH 5,0), hasta alcanzar un volumen de 200 μL . A continuación, se añaden 2 mL de la preparación enzimática PGO¹² (Sigma-Aldrich).

¹⁰ El buffer α -amilasa 10X está compuesto de una solución de cloruro de sodio (NaCl) 67 mM y fosfato sódico de dihidrógeno (NaH₂PO₄) 0,2 M, en 250 mL de agua destilada, con pH 7,0.

¹¹ Cantidad determinada experimentalmente para neutralizar el exceso de KOH.

¹² La valoración por colorimetría se realiza mediante la adición de una preparación enzimática PGO, compuesta de glucosa oxidasa, peroxidasa de rábano y sales (Sigma-Aldrich, 2018c).

Tabla 4. Valoración del almidón de cada extracción. Se realizan dos repeticiones (R1, R2) y una valoración de referencia (B) para validar cada analítica.

Preparación	Alícuota	Tampón acetato 50 mM (pH 5,0)	PGO
R1	100 µL	100 µL	2 mL
R2	50 µL	150 µL	2 mL
B	0 µL	200 µL	2 mL

Una vez aplicados todos los reactivos, las preparaciones se mantienen en baño de agua a una temperatura de 25 °C, durante 45 minutos y en condiciones de oscuridad. Pasado este tiempo, se realiza la lectura en un espectrofotómetro (Biochrom Libra S60) a una longitud de onda de 420 nm.

El método de lectura mediante espectrofotometría requiere de la elaboración previa de una recta “patrón” con la que poder comparar los resultados cada una de las valoraciones. Para generar dicha recta, se utiliza glucosa comercial (α -D (+)-Glucose, $\geq 99\%$, anhydrous. Fisher Scientific), tampón acetato 50 mM (pH 5,0) como matriz y reactivo PGO (**Figura 21**). El número de patrones que componen la recta está determinado por la concentración máxima de glucosa esperada y el grado de precisión requerido. En este caso, el rango alcanza una concentración máxima de 0,4 mg/mL de glucosa y está formado por cuatro intervalos idénticos. La concentración de almidón de cada muestra se calculó a partir de la ecuación de la recta “patrón”.

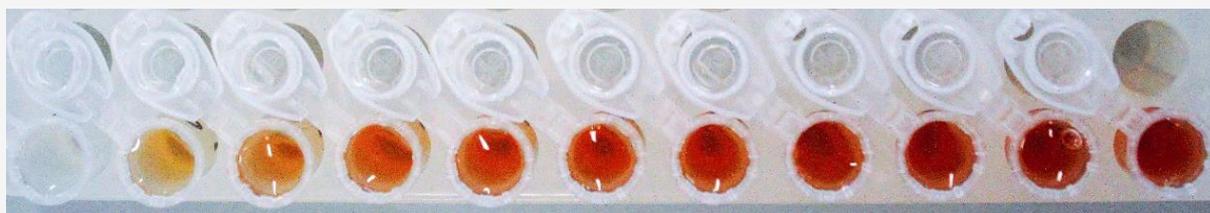


Figura 21. Ejemplo de patrones preparados a partir de glucosa comercial para elaborar la recta “Patrón”. Se observa un gradiente de color, siendo más oscuro a medida que aumenta la concentración de glucosa.

III.3. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE ALMIDÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Para obtener un valor numérico mediante espectroscopía infrarroja del nivel de almidón presente en el material vegetal, es necesario disponer previamente de una base de datos inicial con la que poder comparar las lecturas realizadas mediante espectroscopía infrarroja. En este caso, la base de datos se ha creado a partir del análisis de muestras de los portainjertos de vid seleccionados por el vivero entre 2014 y 2015 mediante el

método enzimático descrito anteriormente y, de forma paralela, se ha obtenido la información espectral (espectro) de cada una de las muestras.

Posteriormente, a cada espectro se le asigna el valor de almidón determinado analíticamente de forma enzimática, pudiendo así calibrar el método. A continuación, se detalla cada una de las fases que componen el protocolo para la cuantificación de almidón en sarmientos de vid mediante espectroscopía infrarroja.

FASE 1. Preparación del material vegetal

Se procede de forma similar a lo detallado en la fase 1 del método enzimático. Una vez comprobados los portainjertos, se etiquetan y se toma nota del peso de cada uno de ellos. Se descorteza utilizando una cuchilla, retirando únicamente la capa externa, se pesan y se secan en estufa a una temperatura de entre 68 °C y 70 °C, durante 3 días. Pasado este tiempo se realiza un último control de peso.

El material vegetal seco se tritura utilizando un molino (RETSCH SM100neu) equipado con una malla de 0,25 mm de luz. El material vegetal triturado se homogeneiza con un tamiz normalizado de 0,25 mm, retirando aquellas fibras que hayan podido pasar a través de la malla. El objetivo es disminuir la granulometría para aumentar y mejorar el contacto entre la muestra y el cristal de diamante del espectroscopio (**Figura 22**).



Parte del material tamizado se almacena en un microtubo cerrado herméticamente, en condiciones de oscuridad y a una temperatura de -20 °C para asegurar su conservación hasta su lectura.

FASE 2. Elaboración de la base de datos (BD)

Cada una de las muestras ya tamizadas se analiza mediante el método enzimático descrito en el capítulo III, apartado 2. Se seleccionan aquellas muestras cuyos niveles de almidón abarquen, de forma homogénea, el rango de almidón que se espera encontrar.

Para la obtención de los espectros, se toma una pequeña porción de la muestra tamizada y se deposita sobre el cristal de diamante del accesorio ATR del espectrómetro FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS 5, iD7), cubriéndolo en su totalidad (**Figura 23.A**) y aplicando presión con el dispositivo diseñado para tal fin (**Figura 23.B**).

La toma de muestras del software OMNIC™ 9 (Thermo Fisher Scientific, 2012) se configura en modo absorbancia, con una resolución de 4 cm^{-1} , un espaciado de $0,482\text{ cm}^{-1}$, y 16 barridos por lectura (**Figura 23.C**).

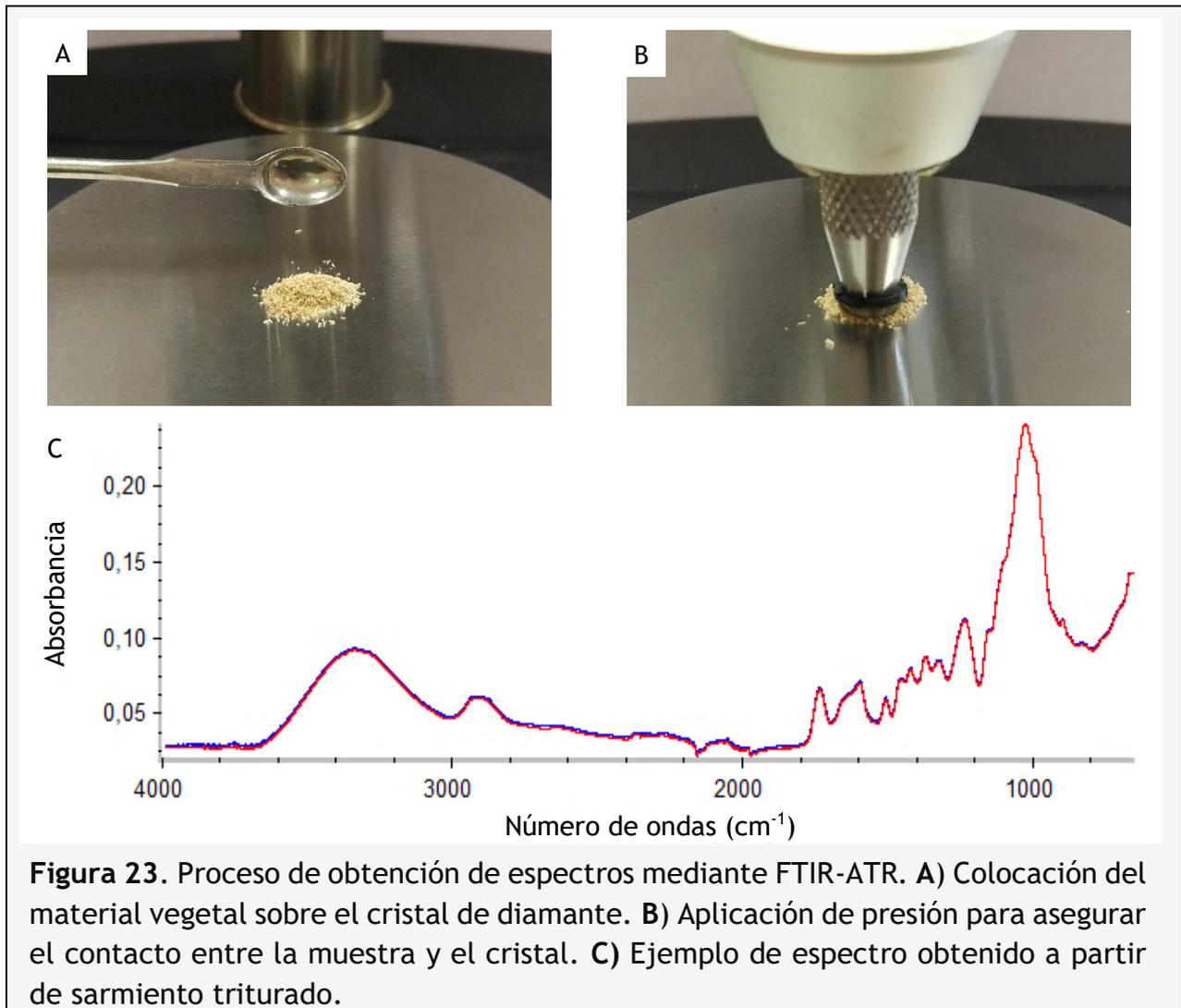


Figura 23. Proceso de obtención de espectros mediante FTIR-ATR. **A)** Colocación del material vegetal sobre el cristal de diamante. **B)** Aplicación de presión para asegurar el contacto entre la muestra y el cristal. **C)** Ejemplo de espectro obtenido a partir de sarmiento triturado.

De cada una de las muestras se toman dos lecturas de la siguiente forma:

- 1) Se coloca el material vegetal en el accesorio ATR, se espera hasta la estabilización de la señal y se realiza la lectura del primer espectro.
- 2) Sin retirar el material vegetal, se genera el segundo espectro.

Si el material vegetal ya tamizado no presentase una clara homogeneidad, se duplicará la lectura de espectros, contrarrestando así parte de la variabilidad de la muestra.

FASE 3. Configuración, calibración y validación del método

Para ello se utilizó el software TQ Analyst™ y se siguieron las indicaciones sugeridas por el propio software para la elaboración de métodos cuantitativos (Thermo Fisher Scientific, 2014c) a fin de desarrollar la calibración del método a partir de la base de datos de espectros.

La información espectral se midió en aquellas regiones, dentro del rango del espectro, relacionadas directamente con la estructura molecular del almidón: 800-1500 cm^{-1} (huella digital), 2800-3000 cm^{-1} (estiramiento del enlace CH) y 3000-3600 cm^{-1} (estiramiento del enlace OH) (Amir *et al.*, 2013); y en aquellas regiones en las que, de forma visual, se pueden apreciar diferencias entre los espectros individuales del almidón y la celulosa: 740-800 cm^{-1} y 1500-1700 cm^{-1} (Figura 24).

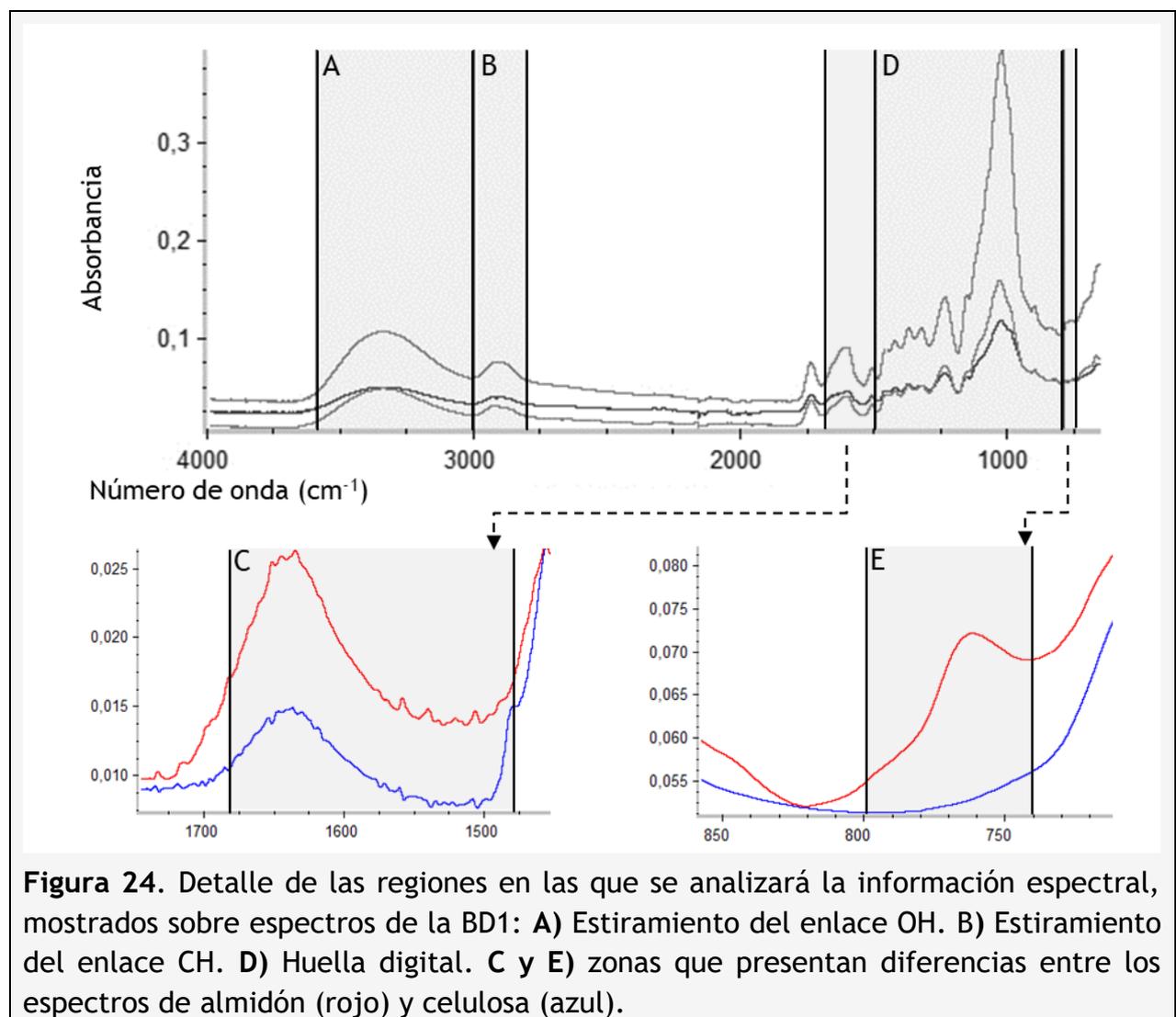


Figura 24. Detalle de las regiones en las que se analizará la información espectral, mostrados sobre espectros de la BD1: A) Estiramiento del enlace OH. B) Estiramiento del enlace CH. D) Huella digital. C y E) zonas que presentan diferencias entre los espectros de almidón (rojo) y celulosa (azul).

Como primer paso, se realizó una calibración previa con el objetivo de optimizar la base de datos inicial. Posteriormente, se realizaron diferentes calibraciones en las que se variaron los siguientes parámetros: el número de espectros, para observar la influencia

del tamaño de la base de datos inicial, así como el tipo de región y ajuste de la línea base del espectro, para determinar si es adecuado procesar la información o si es preferible que la calibración se realice sobre los datos espectrales sin modificar.

Por último, se procedió a la validación de cada una de las calibraciones mediante la herramienta de validación cruzada. El método se basa en un análisis cuantitativo de tipo PLS, configurado de la siguiente forma: para el tipo de espesor (en modo “*predecir*”) se ha considerado un valor por defecto de 4,36 μm , por ser el valor del espesor efectivo en el que actúa la onda evanescente del accesorio ATR con cristal de diamante, rebote simple y ángulo de 45° (Thermo Fisher Scientific, 2014a; PIKE Technologies, 2018).

Se añadieron al método los espectros de las muestras de sarmientos y a cada uno de ellos se le asignó su correspondiente valor de almidón, determinado previamente por el método enzimático. De esta forma se genera la base de datos inicial (BD0), en la que se integran los valores de almidón con la información espectral.

Los pasos seguidos tras la configuración inicial del método son los siguientes:

- **Paso 1: calibración previa.** Se realizó una calibración previa en la que el software eligió los patrones con los que validar el método, siendo estos entre el 8 % y el 15 % del total de espectros de la BD0. A continuación, se aplicó la prueba de Chauvenet, para detectar y eliminar todos los espectros cuyos valores de almidón puedan ser considerados como atípicos (**Figura 25**), dando como resultado una nueva base de datos (BD1), la cuál sería el punto de partida de las diferentes calibraciones.

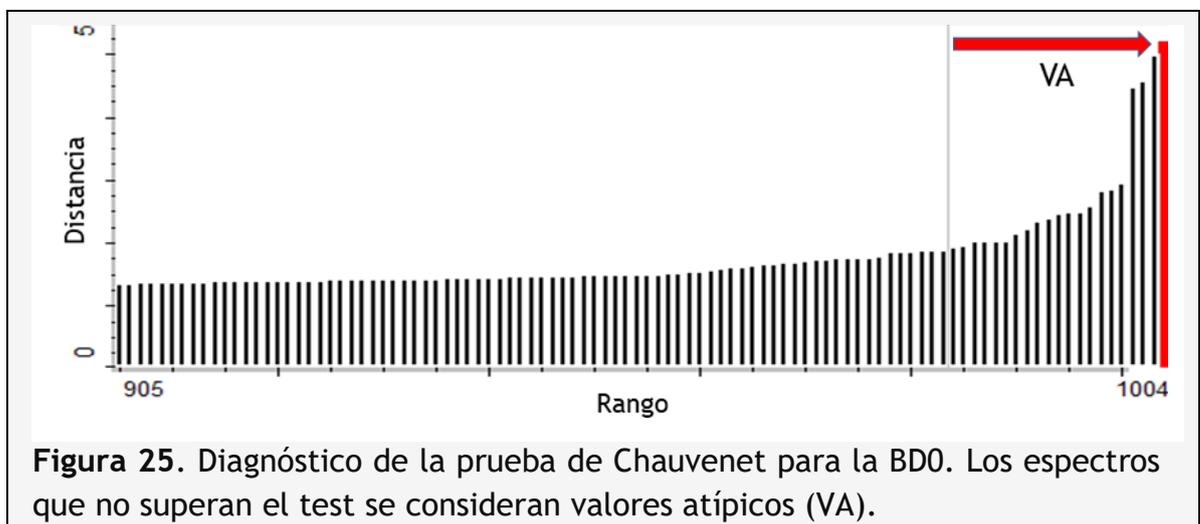


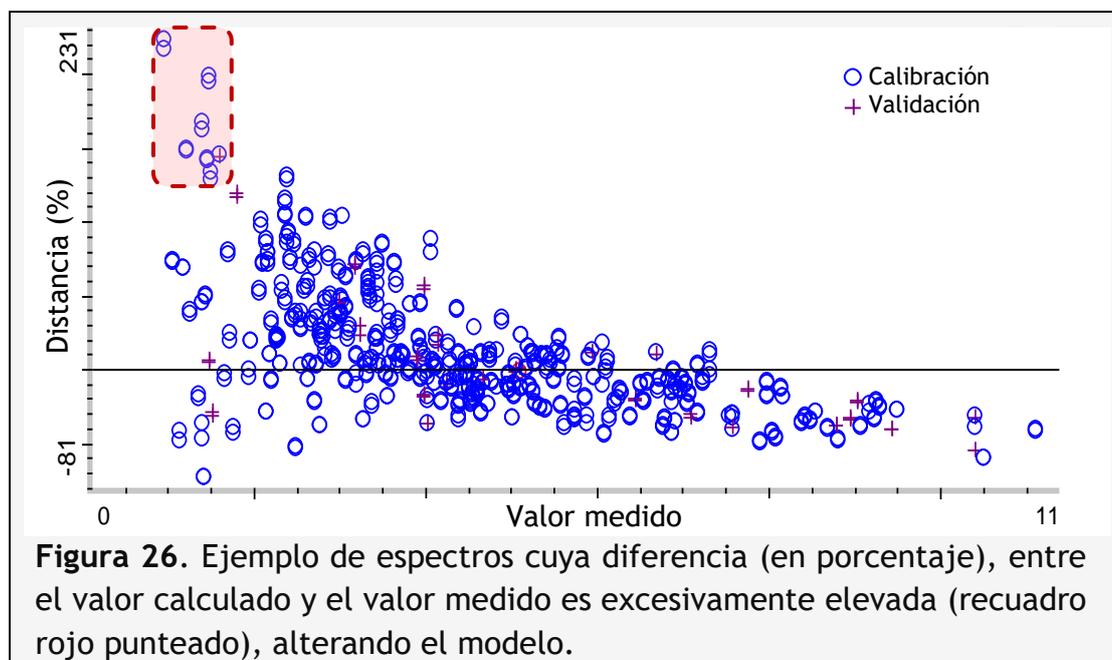
Figura 25. Diagnóstico de la prueba de Chauvenet para la BD0. Los espectros que no superan el test se consideran valores atípicos (VA).

- **Paso 2: calibraciones de ajuste.** Una vez seleccionados los espectros, se realizaron 18 calibraciones en las que se contemplaron las siguientes variables:
 - A. Tamaño de la base de datos
 - ~ BD1: se utilizan todos los espectros que cumplan el test de Chauvenet. Se mantendrán los espectros de validación escogidos por el software.

- ~ BD2: Se busca optimizar el valor de los diferentes indicadores resultantes de la calibración: Error Cuadrático Medio de la Calibración (RMSEC), Error Cuadrático Medio de la Predicción (RMSEP) y sus correspondientes coeficientes de correlación. Se pretende alcanzar un valor del coeficiente de correlación del RMSEC de 0,8, como mínimo.

Para ello, se reduce de forma paulatina el número de espectros de la BD1 hasta en un tercio, aproximadamente, mediante una selección manual de aquellos cuya concentración calculada difiera considerablemente de la concentración medida (**Figura 26**), en este proceso se pueden retirar algunos de los espectros utilizados para la validación, por lo que se puede considerar la opción de utilizar otros en su lugar.

Posteriormente, se seleccionan los que no cumplan el criterio, sin retirar un número excesivo de ellos en cada iteración (entre 1 y 10), se recalcula y si aun así el resultado no es aceptable, se continúa retirando espectros.



- ~ BD3: se realiza una nueva reducción partiendo de la BD2 y siguiendo el mismo método. Esta vez se busca una reducción de dos tercios de la BD1, aproximadamente; y un valor del coeficiente de correlación del RMSEC de 0,9, como mínimo.

B. Tipo de procesado de la región del espectro

- ~ Espectro original (E): se miden las intensidades de todos los puntos en la región especificada, de tal forma que la información espectral no se ve alterada.

- ~ Primera derivada (1D): se realiza una estimación de la primera derivada del valor de cada punto en la región especificada.
- ~ Segunda derivada (2D): se realiza una estimación de la segunda derivada del valor de cada punto en la región especificada.

C. Tipo de ajuste de la línea base

- ~ Ninguno (N): no se modifica la línea base.
- ~ Extracción lineal (EL): técnica para estimar una corrección de la medida mediante el cálculo de mínimos cuadrados lineales ajustados a la región especificada. A menudo se utiliza este ajuste en análisis de tipo PLS cuando las propiedades de la línea base de los espectros de calibración y los espectros de muestras desconocidas puedan variar (Thermo Fisher Scientific, 2014c).

La relación de las variables de cada calibración se recoge en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Relación de las 18 calibraciones y las variables que las definen. A: tamaño de la base de datos, B: tipo de procesado de la región del espectro, C: tipo de ajuste de la línea base.

CALIBRACIÓN	A	B	C	CALIBRACIÓN	A	B	C
CAL01	BD1	E	N	CAL10	BD2	1D	EL
CAL02	BD1	E	EL	CAL11	BD2	2D	N
CAL03	BD1	1D	N	CAL12	BD2	2D	EL
CAL04	BD1	1D	EL	CAL13	BD3	E	N
CAL05	BD1	2D	N	CAL14	BD3	E	EL
CAL06	BD1	2D	EL	CAL15	BD3	1D	N
CAL07	BD2	E	N	CAL16	BD3	1D	EL
CAL08	BD2	E	EL	CAL17	BD3	2D	N
CAL09	BD2	1D	N	CAL18	BD3	2D	EL

- **Paso 3: validación de las calibraciones.** Utilizando las herramientas disponibles en el software TQ Analyst™ se realizó la validación cruzada y el diagnóstico PRESS de cada una de las calibraciones para poder valorar la fortaleza del método predictivo y de su indicador RMSEP. La gráfica del diagnóstico PRESS indica la evolución del cálculo de la validación cruzada y del valor del RMSECV cada vez que se añade un factor.

La calibración que obtenga un menor valor de PRESS y de RMSECV utilizando el menor número posible de factores, obtendrá un RMSEP más bajo, considerándose más apta para su uso en el proceso de cuantificación. El valor del coeficiente de correlación del RMSEP ha de acercarse todo lo posible a 1 y, preferiblemente, debe ser superior a 0,9.

FASE 4. Cuantificación

Finalmente, una vez realizadas las validaciones, la calibración con mejor valoración se empleó en el método para cuantificar el contenido de almidón. Se procedió a la adquisición de espectros tal como se ha descrito anteriormente y a su cuantificación, obteniéndose el valor de almidón predicho para cada espectro.

III.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procesado de la información espectral y de los datos de mortalidad proporcionados por el vivero, se ha llevado a cabo mediante los correspondientes métodos de análisis estadísticos proporcionados por diversas herramientas informáticas (Tabla 6).

Tabla 6. Relación de las diferentes herramientas y análisis estadísticos empleados.

Software	Análisis estadístico
TQ Analyst™ 9 (Thermo Fisher Scientific, 2014b)	Diagnóstico de espectro atípico Mínimos Cuadrados Parciales Validación cruzada
SPSS Statistics 24 (IBM, 2016)	Estadísticos descriptivos
Excel 2019 (Microsoft, 2019) y XLSTAT ¹³ (Addinsoft, 2019)	Pruebas de normalidad Prueba de correlación Prueba de igualdad de medias

Diagnóstico de espectro atípico

Dentro de la base de datos pueden existir valores significativamente diferentes al resto de observaciones; a estos datos se los denomina valores atípicos. Dado que pueden influir considerablemente en el análisis y en su capacidad de predicción, es necesario identificarlos con seguridad para poder valorar si son valores representativos o si es necesario excluirlos de la base de datos (IBM, 2014).

En este caso, dado que el número de muestras utilizadas para calibrar el método es mayor a 30, el software utiliza la prueba de Chauvenet para identificar los espectros atípicos.

Esta prueba determina si la desviación existente entre el valor de un espectro y la media de la base de datos es tan grande, que la probabilidad de que se produzca es inferior a 1/20. En caso afirmativo, el espectro se considera como atípico (Thermo Fisher Scientific, 2014c) y no se tiene en cuenta para elaborar la base de datos.

¹³ Complemento para Excel 2019.

Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

Este tipo de análisis multivariante permite cuantificar un componente específico en aquellos casos en los que se prevé una correlación muy compleja entre la concentración de dicho componente y la absorbancia de la muestra, principalmente debido al intenso solapamiento entre los componentes (Thermo Fisher Scientific, 2009, 2014c).

Este método combina características del análisis de componentes principales y del modelo de regresión lineal múltiple, debido a la necesidad de analizar múltiples variables con relaciones desconocidas entre sí. Tiene como fin la creación de un modelo que prediga el resultado, pero sin que sea necesario tratar de entender la relación existente entre las variables. El análisis de PLS observa los pares de valores X e Y de un punto y compara la relación entre pares sucesivos, eligiendo aquellos pares de valores en los que la relación sea más fuerte.

De esta forma busca asociaciones entre los intervalos de los factores que indiquen una alta variación en los resultados y, al mismo tiempo, una predicción precisa (Tobias, 1995). Para calibrar el método, TQ Analyst™ selecciona al azar una parte de los espectros de la base de datos (entre el 8 y el 10%) para validar la calibración. Una vez realizado el cálculo se obtienen los índices con los que evaluar la potencia del modelo:

- RMSEC y RMSEP y sus coeficientes de correlación.
- Número de factores utilizados en el cálculo.

Cuanto más bajos sean los valores de los errores y más elevados sus coeficientes de correlación, mejor es el ajuste del modelo (Zhao *et al.*, 2015). También resulta interesante que la calibración se realice con el menor número posible de factores. Además, es necesario validar el método PLS, que en este caso se realizó mediante la técnica de validación cruzada (Chen *et al.*, 2010).

Validación cruzada

Para hacer una estimación robusta de los resultados del modelo predictivo se aplica el método de validación cruzada *k-fold*, excluyendo en cada iteración 10 espectros del modelo de calibración, reduciendo así el tamaño del grupo de prueba establecido por defecto por TQ Analyst™ para cada BD: 165 (BD1), 132 (BD2) y 40 (BD3); elevando así el número de iteraciones hasta las 33, 27 y 16, respectivamente.

Los valores del grupo de prueba son predichos utilizando el resto de los espectros de la calibración de partida (grupo de entrenamiento) (Refaeilzadeh *et al.*, 2009) (**Figura 27**).

Tras calcular las diferentes iteraciones, se obtiene el valor del Error Cuadrático Medio de la Validación Cruzada (RMSECV) para el modelo de predicción, repitiendo el proceso de forma idéntica para el resto de las calibraciones a validar.

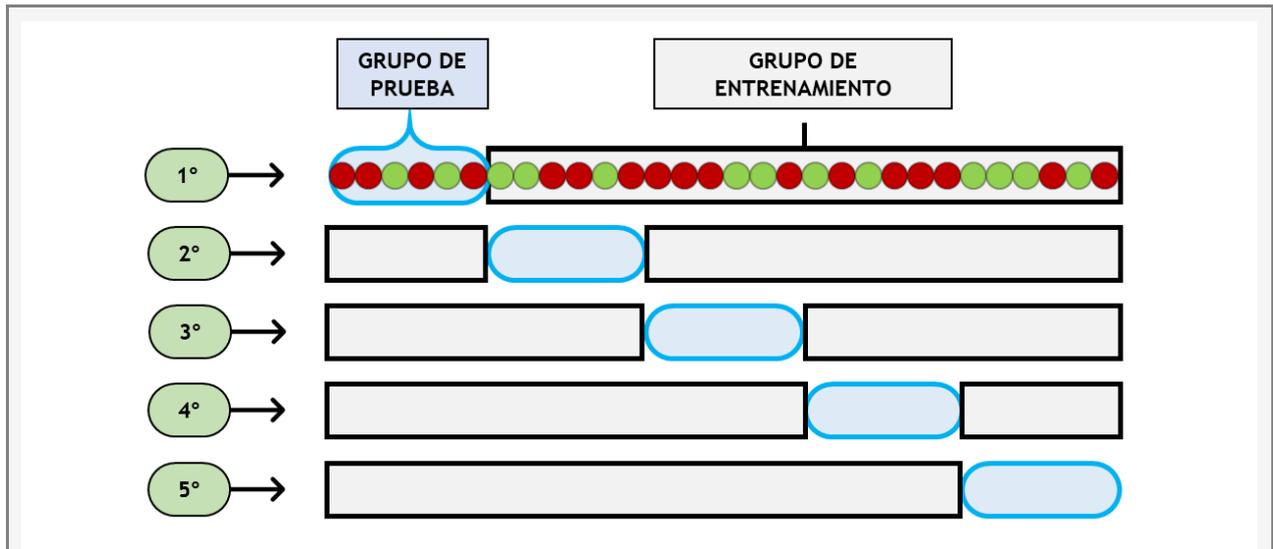


Figura 27. Ejemplo esquemático de una validación cruzada de 5 pasos. Adaptado de Institute for Genomics and Bioinformatics - Graz University of Technology (2006).

Para observar cómo varía el RMSECV en función del número de factores utilizados se realiza un diagnóstico del Error Residual Predicho de la Suma de Cuadrados (PRESS). El valor del PRESS se utiliza como indicador del error existente en la calibración de un método de PLS: cada vez que se añade al cálculo un factor que aporte información útil al método, el error disminuye, hasta alcanzar un punto mínimo a partir del cual el error se estabiliza o se incrementa (Thermo Fisher Scientific, 2014c) (**Figura 28**).

Un número bajo de factores indica que se alcanza el valor de error mínimo con el menor número de cálculos, siendo esto lo más deseable. En este caso se planteó el cálculo del error de la calibración con un máximo de 15 factores, elevando en 5 factores el número con el que está configurado TQ Analyst™ por defecto.

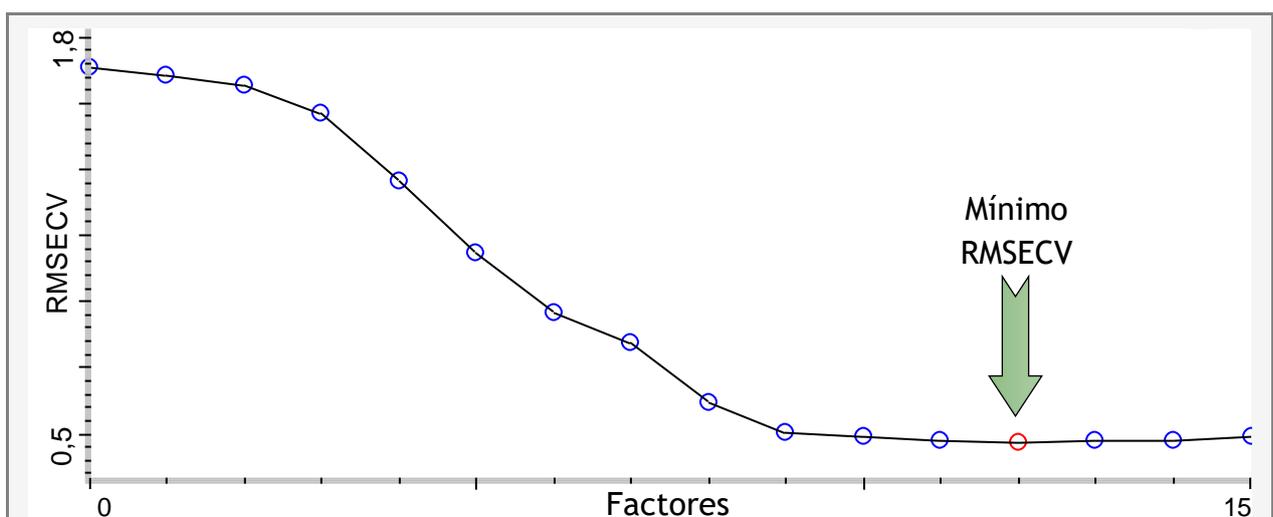


Figura 28. Detalle del resultado de un diagnóstico PRESS de 15 factores, en el que el valor mínimo del RMSECV se alcanza con 12 factores.

Prueba de normalidad

De forma previa a la realización del análisis de la relación entre las variables, es necesario conocer si los datos se ajustan a una distribución normal, o si por el contrario su distribución no se ajusta a la normal.

En primer lugar, mediante la aplicación de la herramienta de análisis de datos descriptivos de SPSS (frecuencias), se calculan los valores de los estadísticos descriptivos (media, mediana, moda, suma, varianza, rango, mínimo, máximo, asimetría y curtosis) para las variables porcentaje medio de mortalidad y porcentaje medio de contenido de almidón.

Posteriormente, se realizan comprobaciones visuales mediante la elaboración de histogramas para observar la distribución de los datos, y gráficos de probabilidad normal de tipo P-P y Q-Q para comprobar el ajuste de dichos datos a una distribución normal. Posteriormente, se aplican varias pruebas de contraste de la normalidad con demostrada capacidad para detectar el ajuste de los datos ($n < 50$) a una distribución Normal (Mohd Razali y Bee Wah, 2011; Pedrosa *et al.*, 2015); para ello se utiliza el software XLSTAT.

A continuación, se indican las pruebas a realizar y los estadísticos en que se basan:

- Shapiro-Wilk: se calcula a partir de la media y la varianza muestral con el fin de determinar si una muestra aleatoria se ajusta a una distribución normal (NIST/SEMATECH, 2013a).
- Anderson-Darling: es una modificación de la prueba Cramér-von Mises (CVM), en la que se da más peso a las colas de lo que lo hace la propia prueba CVM (Mohd Razali y Bee Wah, 2011), aumentando la sensibilidad para la detección del ajuste a una distribución determinada (NIST/SEMATECH, 2013b).
- Lilliefors: se trata de una corrección de la prueba de Kolmogorov-Smirnov, en la que se realiza una estimación de la media y la varianza a partir de los datos muestrales. Su uso es adecuado cuando no se tiene certeza acerca de que distribución siguen los datos (Abdi y Molin, 2007; Mohd Razali y Bee Wah, 2011).
- Jarque-Bera: esta prueba de ajuste se basa en la asimetría y en la curtosis de los residuos estimados, desde un punto de vista gráfico, el histograma de los residuos es equivalente, en términos de contraste de la normalidad, a la citada prueba de ajuste (Barrio Castro *et al.*, 2013).

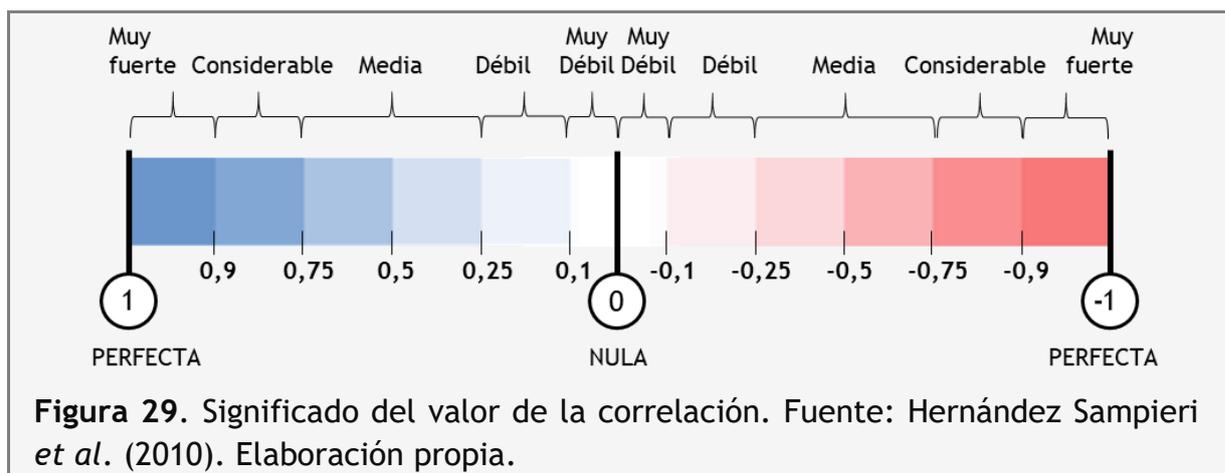
Prueba de correlación

En función del tipo de distribución a la que se ajustan los datos se calculará la correlación entre ambas variables aplicando la prueba más adecuada:

- Pearson: se aplica si los datos se ajustan a una distribución normal. Es un estadístico paramétrico que indica el grado de relación lineal existente entre dos variables con una distribución aproximadamente normal. Para ello, se genera un diagrama de

dispersión en el que se plasma gráficamente la relación entre las variables y se calcula el coeficiente de correlación (r o R) que indica el grado de ajuste a una línea recta.

Su valor elevado al cuadrado (r^2 o R^2), se denomina coeficiente de determinación, e indica que proporción de la variabilidad es explicada por el modelo utilizado. Los posibles valores del coeficiente de correlación se encuentran entre 1 y -1 (Figura 29), existiendo en ambos casos una relación lineal *perfecta*, directa e inversa, respectivamente. Si el valor es igual a 0, la relación lineal es nula (Weisstein, 2006; Hernández Sampieri *et al.*, 2010).



- **Spearman:** es la alternativa no paramétrica a la correlación de Pearson, utilizada cuando la distribución de los datos de las variables no se ajusta a la normal. En este caso se utilizan los rangos de las variables y no sus valores. En cuanto al potencial valor de la correlación, se aplican los mismos criterios que para el coeficiente de correlación de Pearson (Ramírez-Alan, 2017).

Prueba de igualdad de medias

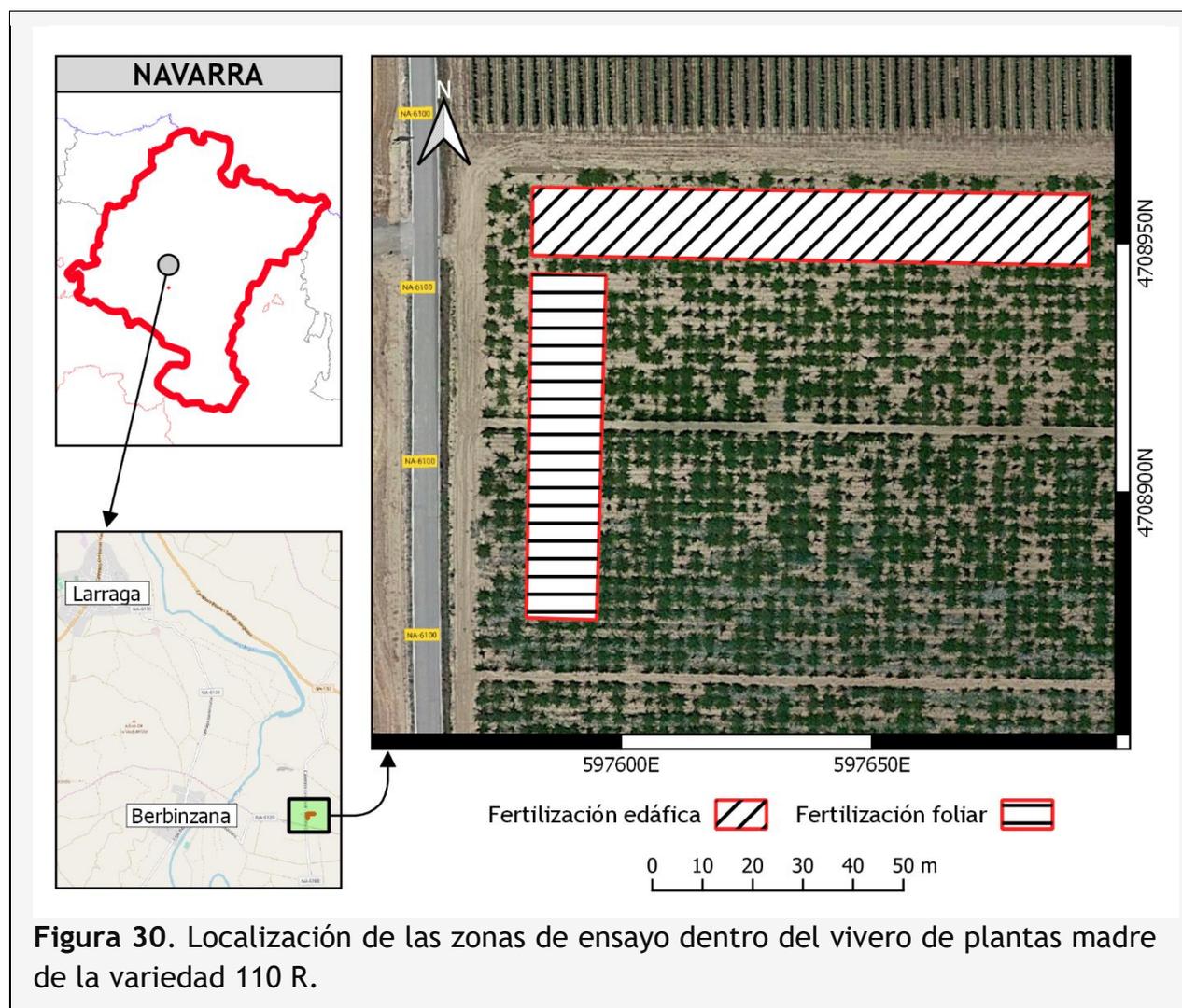
Para comprobar si existe diferencia entre las medias de dos grupos de datos y su significancia, se aplicaron las siguientes pruebas (Barón López, 2019):

- **t de Student:** para su aplicación los valores de los grupos han de ajustarse a una distribución normal, el muestreo ha de ser aleatorio y tienen que existir una igualdad en la varianza de ambas poblaciones. La prueba utiliza la media, la varianza y los grados de libertad. (Amat Rodrigo, 2016).
- **Wilcoxon:** en este caso, la prueba se aplica si los datos no se ajustan a una distribución normal. Además, las muestras han de ser aleatorias, se tienen que poder ordenar de menor a mayor y ha de existir una igualdad de varianza entre los grupos (Amat Rodrigo, 2017).

III.5. ENSAYOS PARA AUMENTAR EL CONTENIDO DE ALMIDÓN EN SARMJETOS DE PLANTAS MADRE

III.5.1. LOCALIZACIÓN

El campo de ensayo se localizaba en una de las parcelas dedicadas al cultivo de plantas madre de Viveros Villanueva Vides, en el municipio de Larraga (Navarra) (Figura 30).



III.5.2. APLICACIÓN DE MAGNESIO FOLIAR SOBRE SARMJETOS DE PLANTAS MADRE

Se realizaron tres tratamientos diferentes: dos dosis diferentes de un fertilizante foliar con base de magnesio (CHELAFARM 6% Mg), aplicado mediante pulverización; y un tercer tratamiento sin aplicación, que sirvió como control negativo (Tabla 7).

Las aplicaciones siempre se realizaron evitando las horas de mayor insolación. Cada aplicación se realizó por duplicado: la primera al inicio del estado fenológico de envero [“estado 81” según el código BBCH (2001)], y la segunda 15 días después.

Tabla 7. Relación de tratamientos con base de magnesio y dosis aplicadas.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DOSIS
Magnesio 50	M50	50 g Mg/ha
Magnesio 150	M150	150 g Mg/ha
Control	C	0 g Mg/ha

El ensayo se realizó durante dos años sobre un total de 60 plantas de la variedad 110 R, agrupadas en 12 bloques de 5 plantas cada uno, de las que se muestrearon únicamente las 3 plantas centrales. (Figura 31).

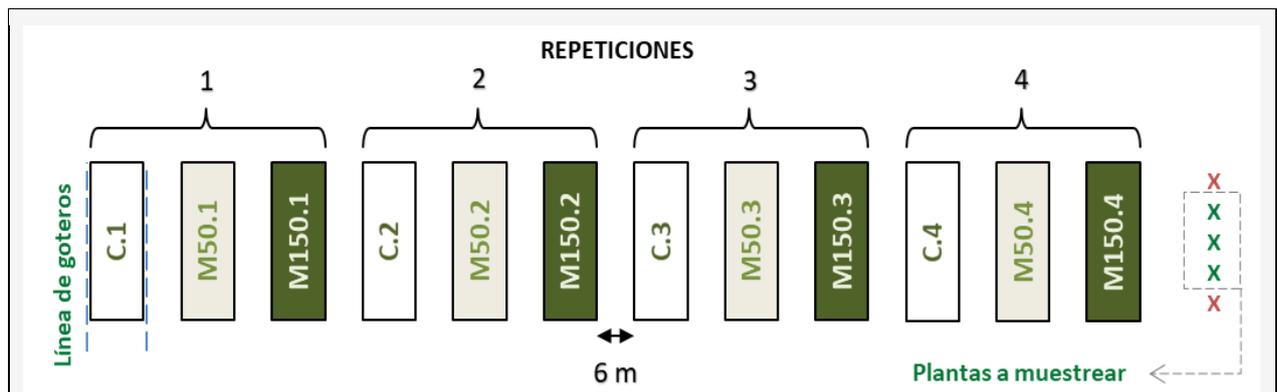


Figura 31. Esquema del diseño experimental del ensayo. El marco de plantación es de 3 X 3 m, manteniéndose una línea de plantas sin tratar entre cada bloque.

Dado que el crecimiento de plantas madre no se controlaba mediante ningún sistema de conducción, su desarrollo vegetativo formaba una maraña de sarmientos. Por lo tanto, para asegurar que cada tratamiento se aplicaba correctamente, la pulverización de cada dosis (Figura 32) se realizó en un radio de 75 cm, aproximadamente, tomando como referencia el punto central de la cepa. Durante los dos años de duración del ensayo, sobre la parcela se realizaron las labores agrícolas habituales.



Figura 32. Detalle de aplicación de tratamiento foliar en el campo de ensayo mediante sistema de pulverización manual.

De las plantas centrales se muestreó un sarmiento al azar, correctamente desarrollado, siendo necesaria una longitud útil mínima de 120 cm. La recogida del material vegetal se realiza durante el estado fenológico de parada vegetativa [“estado 97” según el código BBCH (2001)].

Los sarmientos muestreados se procesaron siguiendo el mismo método de preparación utilizado por el vivero como se indica en el capítulo I, apartado 1.2.1, y descrito en el capítulo III, apartado 2, fase 1: de cada sarmiento se retiraron aquellas partes cuyo diámetro era inferior a 6 mm y superior a 12 mm, dividiéndose el resto del sarmiento en segmentos de 40 cm de longitud (Figura 33), obteniéndose estacas similares a las producidas por el vivero. El contenido de almidón se analizó utilizando el método de espectroscopia infrarroja, descrito en el capítulo III, apartado 3.

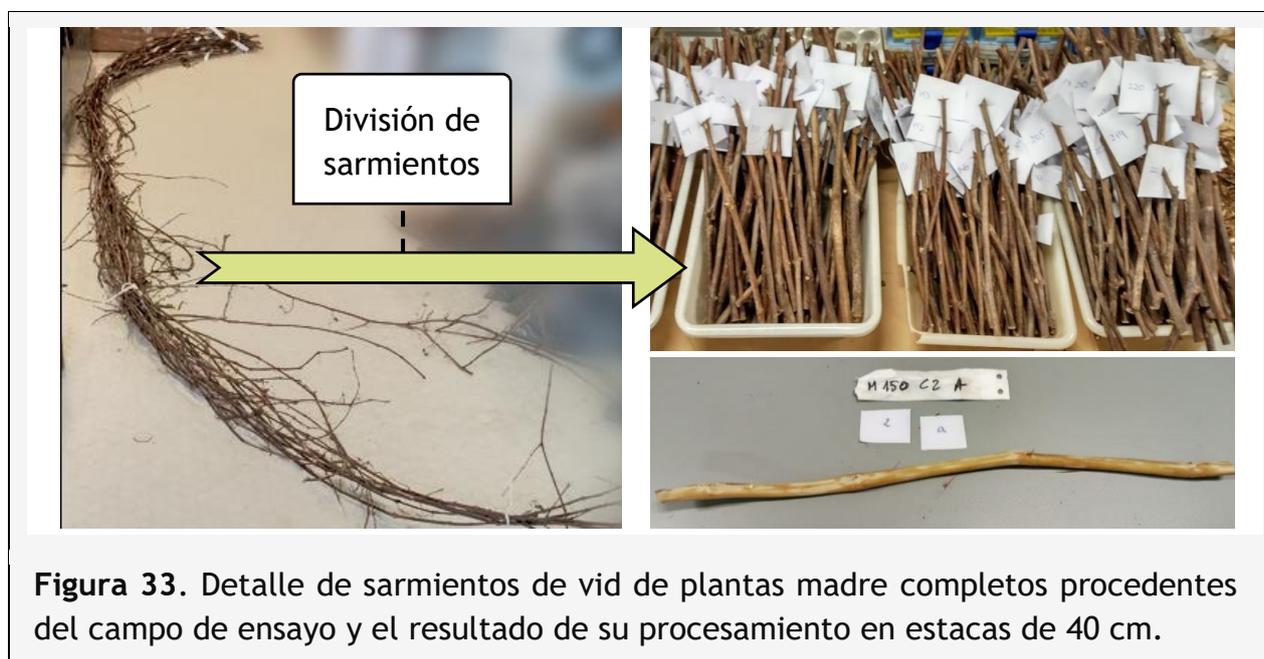


Figura 33. Detalle de sarmientos de vid de plantas madre completos procedentes del campo de ensayo y el resultado de su procesamiento en estacas de 40 cm.

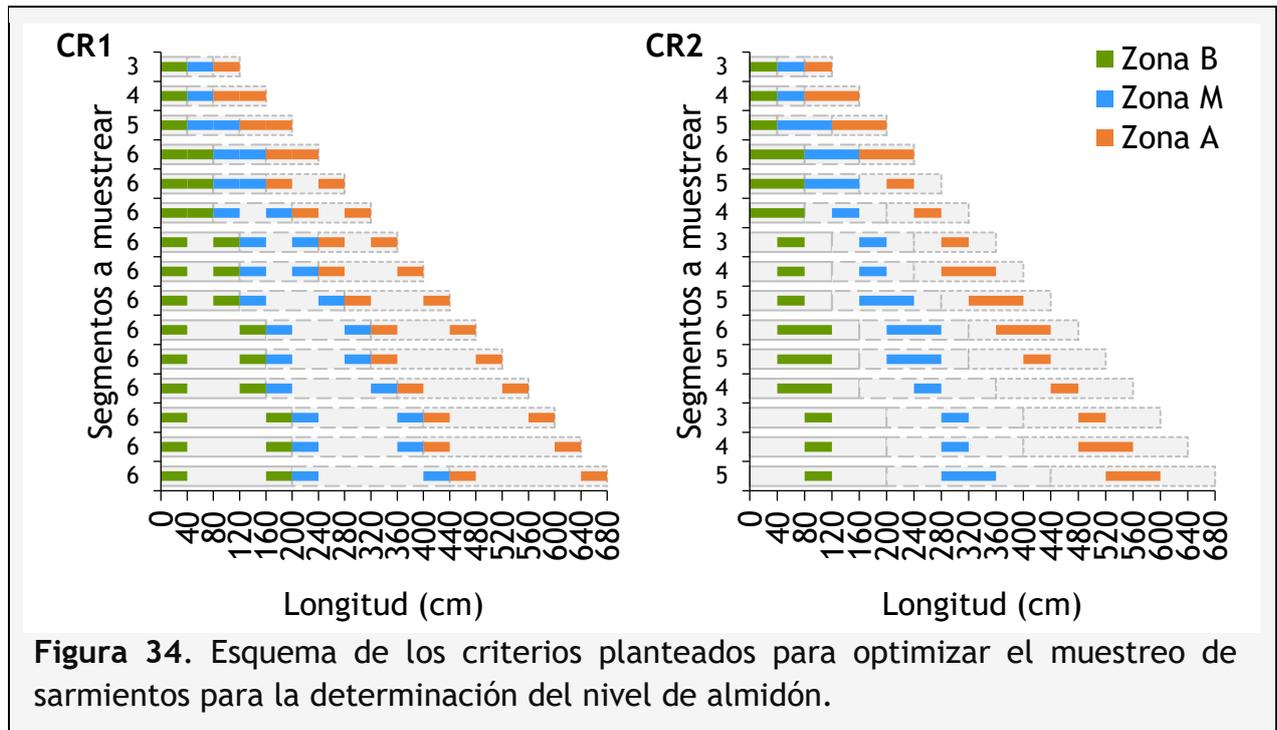
Dado que los sarmientos se muestrearon al azar, existió una gran diferencia entre la longitud de los mismos y, por lo tanto, no se obtuvo un número homogéneo de estacas por sarmiento, oscilando en un rango de entre 3 y 17 estacas.

Esta heterogeneidad del número de muestras por sarmiento, junto con el elevado volumen total de muestras, hizo necesaria la realización de un análisis estadístico de los valores de almidón de cada portainjerto, con el objetivo de determinar el modo óptimo de muestrear sarmientos de diferentes longitudes para que el resultado de almidón fuese representativo, realizando el menor número de determinaciones posible.

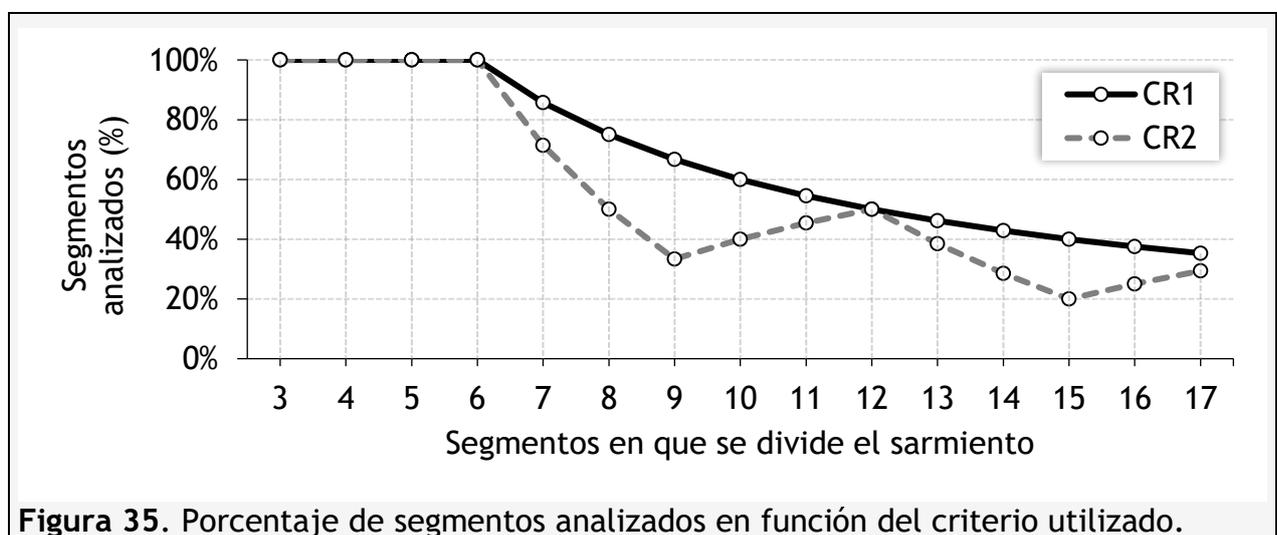
Para ello, cada sarmiento se dividió en 3 zonas proporcionales a su longitud: basal (B), media (M) y apical (A). Cada una de ellas se componía de uno o varios de segmentos de 40 cm, manteniendo así una similitud con las estacas producidas por el vivero. Partiendo del análisis de la totalidad de las estacas obtenidas, se plantearon 2 criterios de muestreo selectivo:

- **CR1:** de cada zona (B, M, A) se analizan los segmentos de los extremos.
- **CR2:** de cada zona (B, M, A) se analizan el/los segmento/s central/es.

Independientemente del criterio aplicado, el resultado será idéntico para sarmientos de una longitud útil de hasta 240 cm, al analizarse el sarmiento al completo. A partir de una longitud útil de 280 cm, el valor medio de almidón del sarmiento variará en función del criterio aplicado (**Figura 34**).



Parte de los segmentos no se tendrán en cuenta para el análisis del contenido de almidón: disminuyendo el porcentaje del sarmiento analizado a medida que se incrementa el número de segmentos en que se divide el sarmiento (**Figura 35**). Tras aplicar los criterios de muestreo planteados y en base a los valores de almidón obtenidos, se halló el valor medio del contenido de almidón para cada sarmiento.



A los valores medios obtenidos [Valor medio real (VMR), valor medio del CR1 (VMCR1) y valor medio del CR2 (VMCR2)] se les aplicaron varias pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk, Anderson-Darling, Lilliefors, Jarque-Bera) y una prueba de comparación de medias (t-de Student o Wilcoxon) para determinar si el criterio de muestreo afectaba al resultado final. Los sarmientos restantes del campo de ensayo fueron procesados por personal del vivero para producir planta injertada y obtener, al final del ciclo, el porcentaje de planta viable de cada tratamiento. Finalmente, se realizó una comparativa entre el valor medio de almidón de cada tratamiento y el número de plantas viables obtenidas.

III.5.3. APLICACIÓN DE FERTILIZACIÓN EDÁFICA EN CULTIVO DE PLANTAS MADRE

El ensayo se realizó durante dos años sobre un total de 75 plantas de la variedad 110 R con un marco de plantación de 3 X 3 m. Constaba de 5 tratamientos: un control negativo, un tratamiento con difosfato amónico (2 dosis diferentes) y un tratamiento con cloruro potásico (2 dosis diferentes) (Tabla 8). Los tratamientos se realizaron por triplicado. Se mantuvieron 12 y 6 m de separación entre los bloques, como se puede observar en la Figura 36. Con esta separación se pretende asegurar la integridad del ensayo. Con el mismo fin, se muestrearon las 3 plantas centrales de cada tratamiento.

Tabla 8. Relación de tratamientos y dosis de fertilizantes aplicadas al suelo.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	DOSIS
Difosfato amónico	DAP1	200 kg/ha
	DAP2	400 kg/ha
Cloruro potásico	KCl1	100 kg/ha
	KCl2	250 kg/ha
Control	C	0 kg/ha

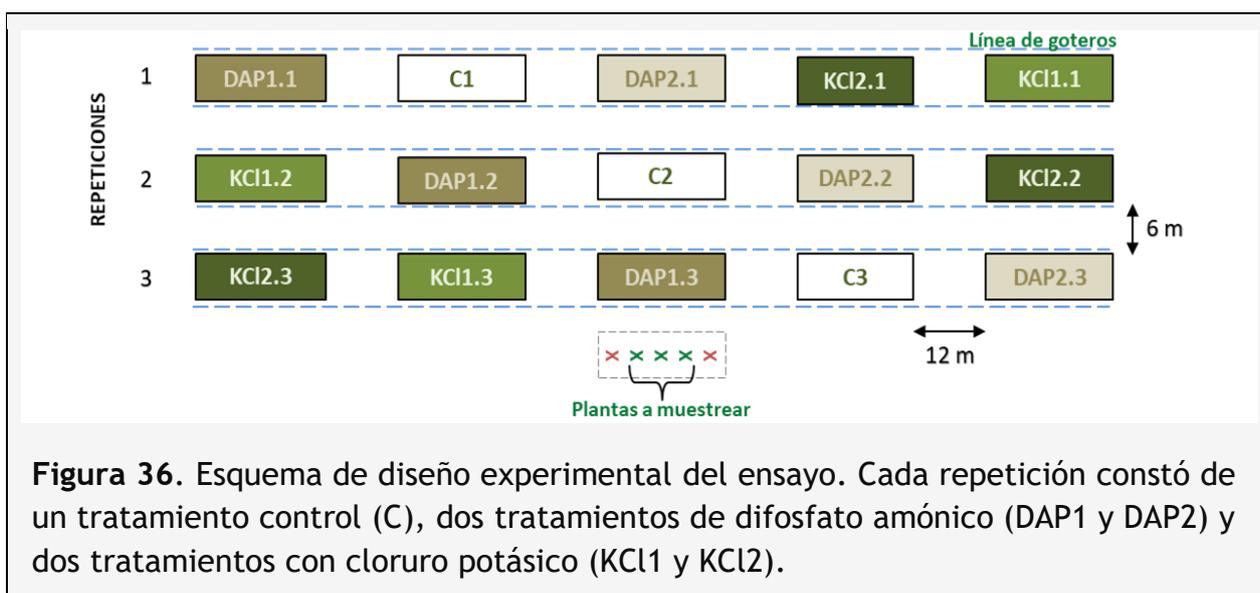


Figura 36. Esquema de diseño experimental del ensayo. Cada repetición constó de un tratamiento control (C), dos tratamientos de difosfato amónico (DAP1 y DAP2) y dos tratamientos con cloruro potásico (KCl1 y KCl2).

Cada tratamiento se aplicó sobre un bloque de 5 plantas madre (**Figura 37**). Al finalizar el periodo vegetativo [“estado 97” según el código BBCH (2001)] se tomó muestra de suelo para su análisis nutricional, según lo descrito por Olego *et al.* (2014), y se recogieron 2 sarmientos de cada planta. Cada uno de ellos se procesó siguiendo el criterio CR1 descrito en el capítulo III, apartado 5.2; y el nivel de almidón se analizó mediante el método descrito en el capítulo III, apartado 3.



III.6. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ALMIDÓN Y LA MORTALIDAD

Se utilizaron únicamente aquellos portainjertos seleccionados por el vivero de los años 2014-2017 de los que se disponía de su porcentaje de mortalidad, lo que supone un total de 616 portainjertos, correspondientes a las variedades 110 R, 1103 P, 140 Ru y 41B M.

El estudio consistió en analizar la normalidad de los datos de contenido de almidón y de porcentaje de mortalidad para determinar si los valores seguían una distribución normal. A continuación, se aplicó una prueba de correlación para determinar qué tipo de relación existía entre las variables. En los casos en que la distribución de los datos fue normal, se aplicó una prueba de correlación de Pearson. Por el contrario, si los datos no se ajustaban a una distribución normal, se aplicó una prueba de correlación de Spearman.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y ANÁLISIS

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación, se exponen los resultados obtenidos de los diferentes trabajos realizados durante el desarrollo de los objetivos específicos planteados en el capítulo II.

IV.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ENZIMÁTICO

Una de las principales adaptaciones sobre el método enzimático de partida (Chow y Landhüsser, 2004) consistió en analizar la fase de extracción de almidón del material vegetal mediante su digestión con KOH. Además, se adoptaron cambios en el procesado del material vegetal y en la degradación enzimática.

IV.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE TRITURADO

Este punto del protocolo inicial no estaba diseñado para que las muestras de material vegetal fuesen analizadas mediante dos técnicas distintas: digestión enzimática y FTIR. El método enzimático no especifica la necesidad de realizar un triturado específico, pero dado que la técnica de análisis mediante FTIR indica que se necesita asegurar un contacto óptimo entre el accesorio ATR y la muestra (en un rango de 2-5 nm), resultó necesario optimizar el procesado de las muestras para poder analizarlas mediante ambos métodos.

Los 2 molinos disponibles inicialmente: IKA MF10 basic y Culatti DFH 48, tenían la capacidad de triturar la muestra hasta una granulometría de 2 y 0,7 mm, respectivamente. El proceso se realizaba de forma continua: primero se obtenía un triturado bastante basto y posteriormente se volvía a triturar para disminuir su granulometría. Aun con este doble procesado, la mayoría del material triturado resultaba demasiado heterogéneo para su análisis mediante FTIR, por lo que optó por la utilización de un molino de mayor potencia con capacidad para disminuir drásticamente la granulometría de la muestra al equipar una malla de 250 μm de luz.

Al mismo tiempo se reduce considerablemente el tiempo de procesado de cada muestra, pasando de una media de 8 min utilizando los 2 molinos, a realizar el triturado en 2 min, de media. Esto supone un descenso del 75% en el tiempo utilizado para procesar el material vegetal.

IV.1.2. DIGESTIÓN Y EXTRACCIÓN DE ALMIDÓN CON KOH

Para la optimización de esta fase del protocolo se analizaron un total de 185 portainjertos. Tras el procesado y la extracción de azúcares solubles, cada uno de ellos fue sometido a 4 extracciones consecutivas con KOH y se procedió a determinar la cantidad de almidón extraído en cada una de ellas, obteniéndose que porcentaje del almidón total era extraído en cada una de las extracciones (**Tabla 9**). En cada intervalo

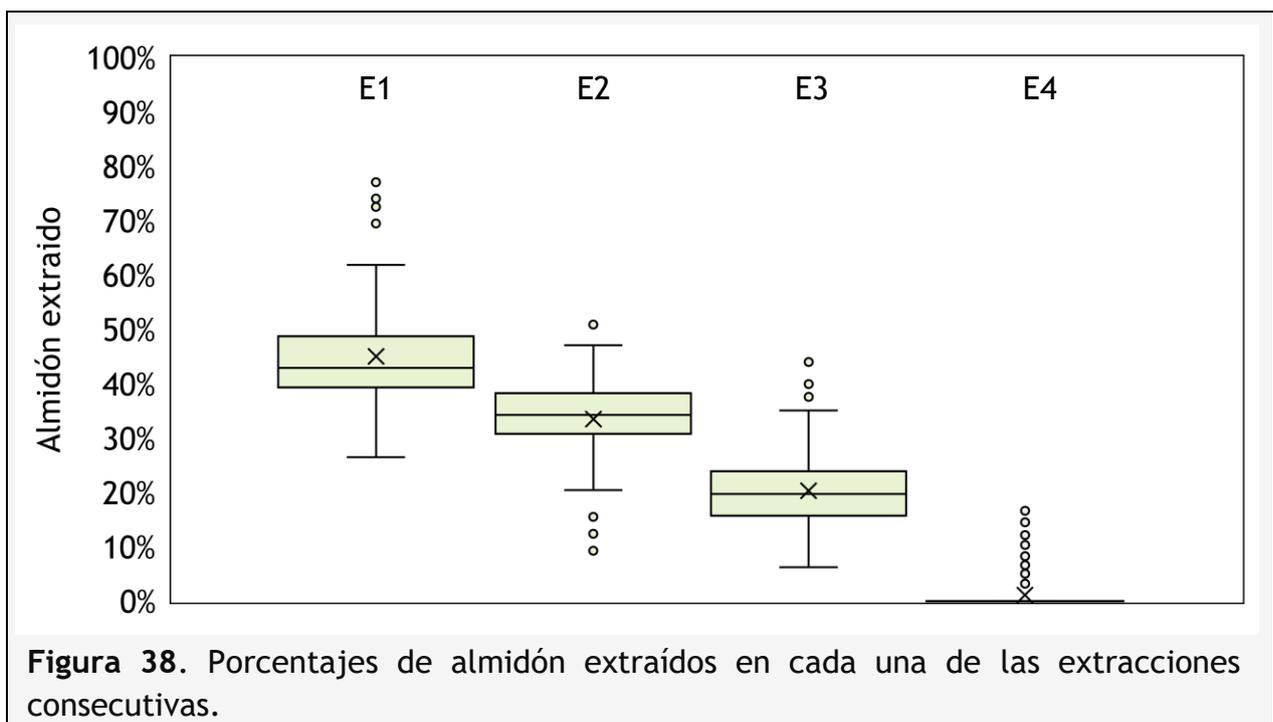
se contabilizan aquellos casos en los que el porcentaje de almidón extraído cumple con el siguiente criterio:

$$> \text{valor}_{\min} \Leftrightarrow \leq \text{valor}_{\max} \xrightarrow{\text{ejemplo}} \text{Intervalo } 5\% = \text{Valores } > 0\% \text{ y } \leq 5\%$$

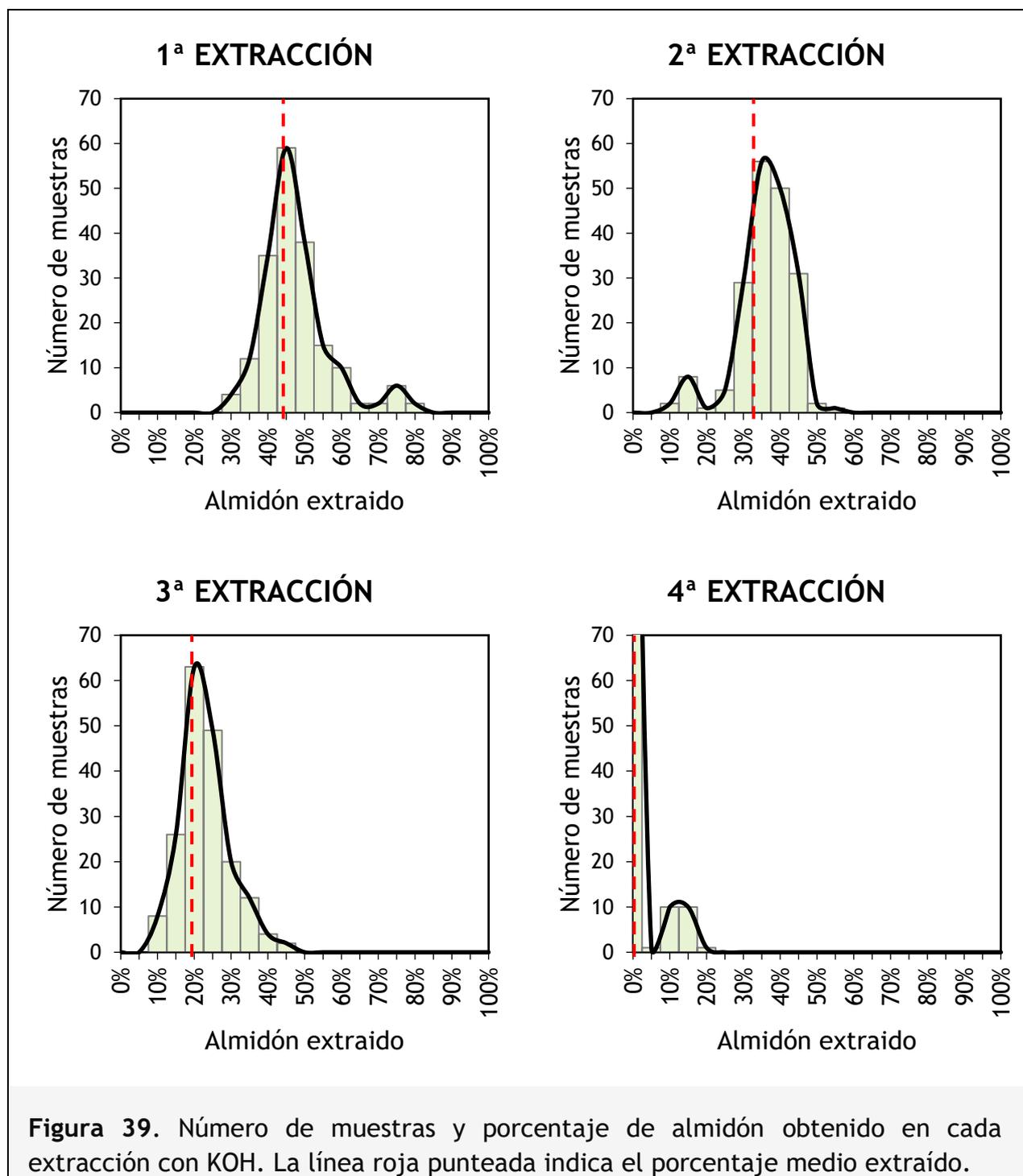
Tabla 9. Cantidades relativas (% del total) de almidón obtenido en cada extracción y número de casos comprendidos en cada intervalo. E1: primera extracción; E2: segunda extracción; E3: tercera extracción, y E4: cuarta extracción.

Intervalo	0%	0% - 5%	5% - 10%	10% - 15%	15% - 20%	20% - 25%	25% - 30%	30% - 35%	35% - 40%	40% - 45%	45% - 50%	50% - 55%	55% - 60%	60% - 65%	65% - 70%	70% - 75%	75% - 80%	80% - 85%	85% - 90%	90% - 95%	95% - 100%
Frecuencia E1						4	12	35	59	38	15	10	2	2	6	2					
E2		2	8	1	5	29	56	50	31	2	1										
E3		8	26	63	49	20	12	4	2												
E4	163	1	10	10	1																

En las extracciones E1, E2 y E3 se puede observar una agrupación del porcentaje parcial extraído, resultando similar en la mayoría de los casos (**Figura 38**). Es necesario destacar que en todas las extracciones aparecen valores atípicos, si bien en el caso de la E4, los valores detectados como atípicos se corresponden con las muestras en las que se ha extraído algún porcentaje de almidón.



En la **Figura 39** se observa como la distribución de los porcentajes de almidón extraído se puede considerar simétrica en los tres primeros casos (E1, E2 y E3), mientras que, en el caso de la E4, el 88% de los casos tienen un valor igual a 0%.



Por último, se observa como el porcentaje medio de almidón extraído (**Tabla 10**) disminuye tras cada extracción, de tal forma que el porcentaje medio acumulado en la tercera extracción se corresponde prácticamente con el 99% del valor total extraído.

Tabla 10. Porcentaje de almidón extraído por cada extracción: porcentaje medio por extracción y acumulado, desviación estándar (DE), diferencia entre extracciones.

Extracción	Porcentaje medio	DE	Diferencia	Porcentaje medio acumulado
E1	45,04%	9,45%	---	45,04%
E2	33,51%	7,48%	11,53%	78,55%
E3	20,32%	6,68%	13,19%	98,87%
E4	1,13%	3,30%	19,19%	100,00%

En base a estos datos se decidió que para una cuantificación del nivel de almidón lo más exacta y optimizada posible, era necesario realizar 3 extracciones sucesivas con KOH y no una única extracción como reflejaba el protocolo de Chow y Landhäusser (2004).

IV. 1. 3. MODIFICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS CON ENZIMAS DEGRADATIVAS

Uno de los pasos más críticos de todo el proceso para valorar correctamente el almidón extraído se basa en su degradación enzimática a D-Glucosa y la posterior valoración de ésta. De tal forma, que cuando la degradación del almidón presente en la muestra es completa, sus niveles son equivalentes exactamente a los niveles de glucosa detectada (esto es, si en la muestra existen dos mg de glucosa se asume que en la muestra existían 2 mg de almidón).

Desafortunadamente cuando se siguió al pie de la letra el protocolo de Chow y Landhauser (2004) los resultados de cuantificación del almidón fueron desalentadores, puesto que para la mayor parte de las muestras analizadas el nivel de almidón detectado era cero o próximo a cero. Estos resultados eran muy extraños puesto que de asumirlos significaría que los portainjertos analizados no contenían almidón alguno.

Ello nos llevó a realizar un análisis más detallado del protocolo aplicado por ambos autores para la degradación de almidón a D-glucosa. Como se indica en su publicación el ensayo consiste en realizar una degradación simultánea del almidón con la enzima α -amilasa de *Bacillus licheniformis* y amiloglucosidasa de *Aspergillus niger*. Ambas enzimas eran coincubadas en presencia de almidón en tampón acetato a pH 5,1 y 50 °C durante 48 horas.

Estas condiciones de ensayo resultaron llamativas por varios hechos:

- En primer lugar porque, según se indica en la hoja de información del producto, la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich, 2018a) tiene un rango de pH en el que es activa, comprendido éste entre 5 y 9, con un rango de pH óptimo de 7-9. De hecho, el fabricante recomienda realizar la reacción de degradación a un pH de 6,9. Este hecho claramente nos indicaba que en las condiciones de ensayo de Chow

y Landhauser (2004) (pH 5,1) el enzima α -amilasa no era activa (o más bien tenía una actividad residual), dado que la incubación se realizaba muy cerca del límite inferior de pH de actividad del enzima.

- Por lo que respecta al enzima amiloglicosidasa (MERCK, 2019) su pH óptimo es de 4,5, por lo que las condiciones del ensayo serían adecuadas para su actividad.

En base a este análisis se decidió realizar los siguientes cambios:

- Sustituir el enzima α -amilasa de *Bacillus licheniformis* por α -amilasa de páncreas porcino (Sigma-Aldrich, 2018b), por una mera cuestión de precio y disponibilidad. Esta enzima tiene unas características similares (rango de pH de 5,5 a 8,0 y un pH óptimo de 7,0) a la anterior, pero es mucho más barata.
- En segundo lugar, se decidió realizar una degradación enzimática del almidón de forma escalonada: una primera degradación con α -amilasa de páncreas porcino a un pH de 7,0 (su pH óptimo) mediante incubación a 50 °C durante 2 h; y seguidamente una segunda incubación adicional usando el enzima amiloglicosidasa durante 2 h a 55 °C y a un pH de 5,0.

Una vez realizados estos cambios se comenzaron a obtener resultados que determinaban la presencia de distintos niveles de almidón en los portainjertos analizados. Del estudio realizado era evidente que en las condiciones originales del ensayo de Chow y Landhauser (2004) el enzima α -amilasa no podía funcionar porque se estaba usando a un pH totalmente inapropiado.

IV.1.4. DESARROLLO DEL PROTOCOLO

En la **Figura 40** se muestra las diferentes fases del método enzimático descrito en el capítulo III, apartado 2. En él se reflejan las adaptaciones realizadas al método inicial. Estas se han realizado en pro de la optimización del tiempo empleado en la determinación, procurando que dichos ajustes no conlleven una disminución de la validez del método de extracción de almidón.

Estas adaptaciones han consistido, por un lado, en la utilización de molinos de mayor eficiencia para reducir el tiempo de procesado del material vegetal seco (fase 1) y, por otro lado, se ha realizado una optimización del número de extracciones de KOH (fase 2), fijándose en tres, en base a los resultados expuestos en el capítulo IV, apartado 1.2, así como en la modificación de las condiciones de degradación de almidón mediante tratamientos con enzimas degradativas.

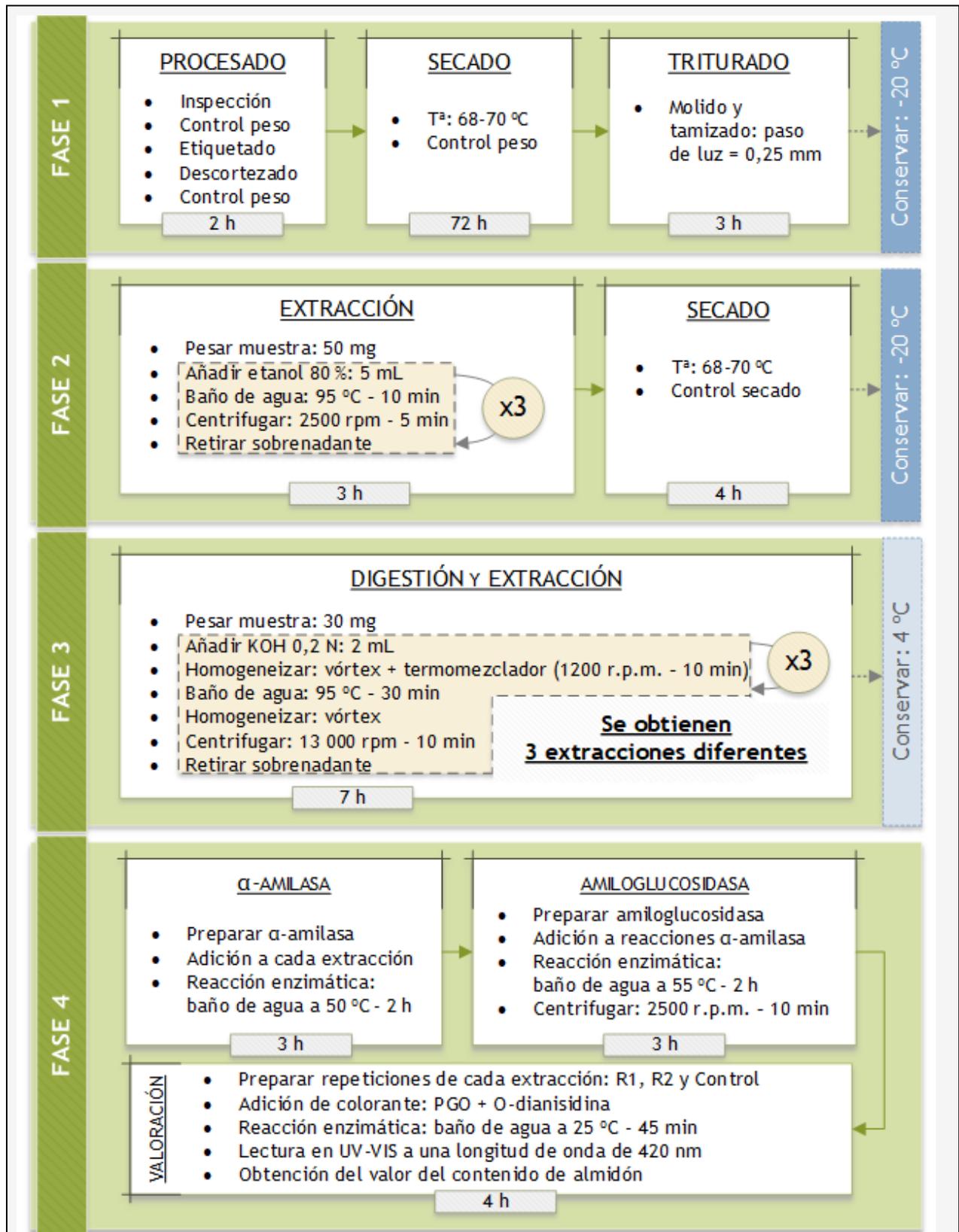


Figura 40. Esquema representativo del método enzimático optimizado para la determinación de almidón en sarmientos de vid. Fase 1: preparación. Fase 2: extracción de azúcares solubles. Fase 3: digestión de almidón. Fase 4: Degradación enzimática y valoración. Tiempos para 30 muestras.

IV.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO PREDICTIVO DEL CONTENIDO DE ALMIDÓN MEDIANTE FTIR Y PLS

A continuación, se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de las diferentes fases del protocolo de determinación de almidón mediante espectroscopia infrarroja.

IV.2.1. ELABORACIÓN DE LAS BASES DE DATOS

Se elaboraron a partir de un total de 502 muestras analizadas mediante el método enzimático. De cada muestra se obtuvieron dos espectros, por lo que la BD0 constaba de un total de 1004 espectros. Tras la detección y retirada de aquellos valores considerados como atípicos, mediante la aplicación del Test de Chauvenet, se creó la BD1, formada por 974 espectros. A partir de la BD1 se generó la BD2 mediante la retirada manual de aquellos espectros cuyo valor calculado era muy diferente del valor analizado enzimáticamente. Tras cada retirada se recalibró el método hasta alcanzar un coeficiente de correlación del RMSEC de un valor igual o superior a 0,8, lo que resultó en una reducción de la BD1 en un tercio del número de espectros, aproximadamente. La BD3 se generó a partir de la BD2 siguiendo el mismo criterio de creación de ésta, salvo que en este caso el límite buscado para el valor del coeficiente de correlación del RMSEC fue de 0,9 y la reducción de espectros se estableció en dos tercios, con respecto a la BD1. De esta forma, las BD2 y BD3 estaban compuestas por 674 y 324 espectros, respectivamente. La distribución del número de espectros dentro de cada base de datos se muestra en la **Figura 41**.

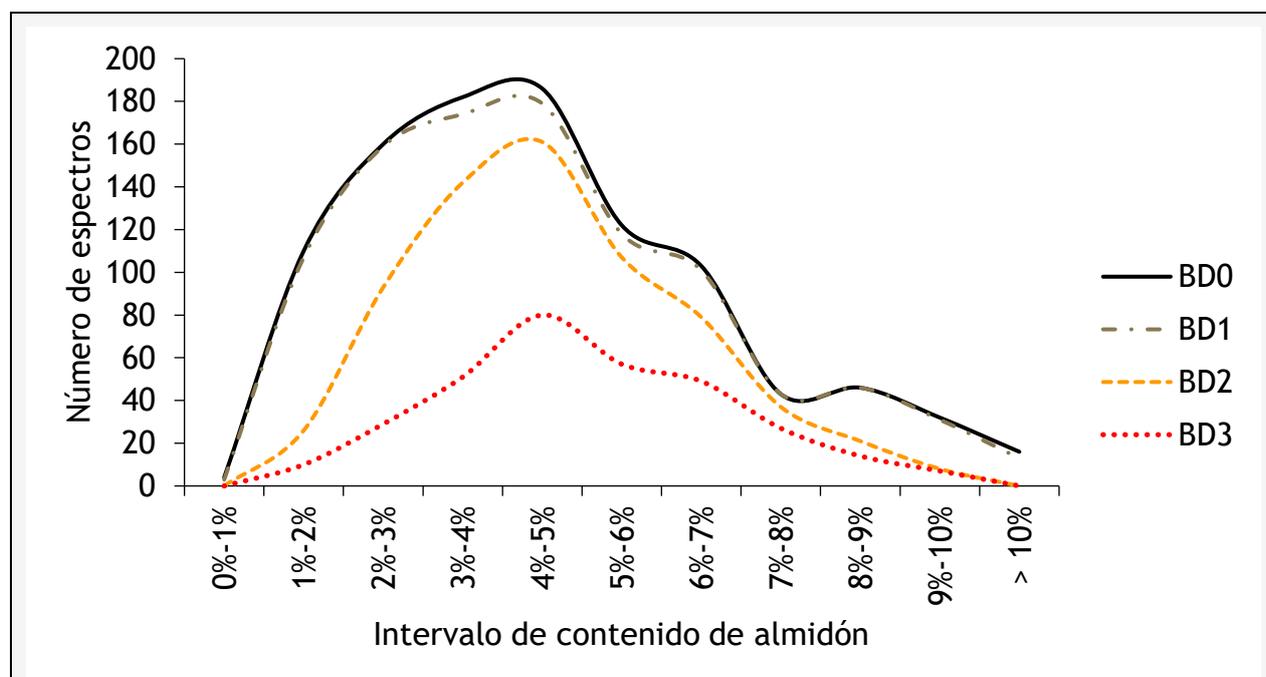


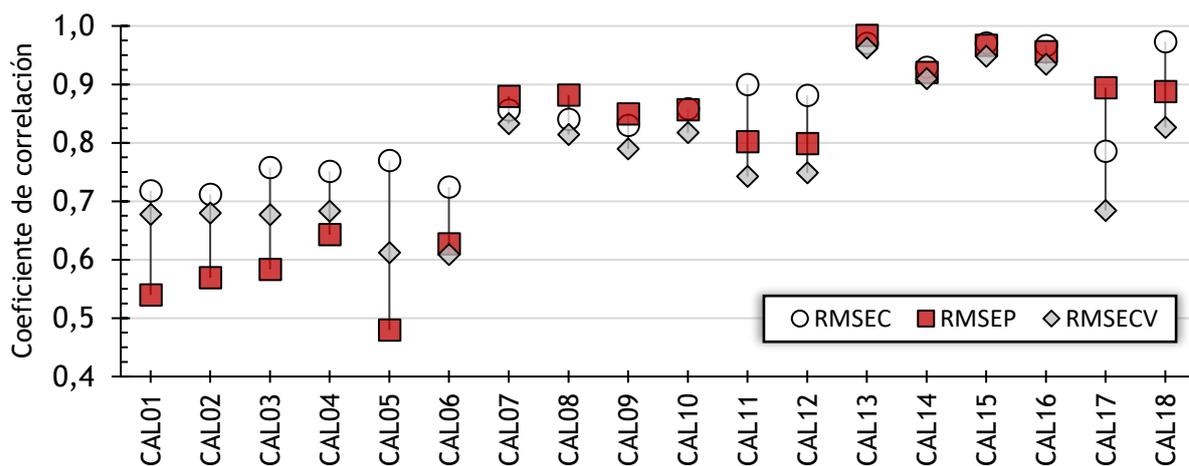
Figura 41. Histogramas de las bases de datos BD0, BD1, BD2 y BD3. Los porcentajes indican el intervalo de contenido de almidón (método enzimático).

IV.2.2. CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

A partir de las bases de datos y variando el tipo de procesado de las regiones del espectro y de la línea base, se realizaron 18 calibraciones, cuyos resultados recoge la **Tabla 11**.

Tabla 11. Resultados obtenidos para las diferentes calibraciones (CAL): Índice de rendimiento (PI), valores de RMSEC, RMSECV y RMSEP con sus correspondientes coeficientes de correlación, factores utilizados (F) y valor de PRESS.

CAL	PI	F	PRESS	RMSEC	C.C.	RMSECV	C.C.	RMSEP	C.C.
01	60,6	9	2425,4646	1,540	0,7177	1,65083	0,6774	1,940	0,5398
02	62,0	7	2409,1834	1,560	0,7116	1,64528	0,6796	1,880	0,5694
03	62,1	9	2596,2398	1,450	0,7576	1,70796	0,6771	1,870	0,5834
04	64,8	8	2537,3398	1,460	0,7511	1,68847	0,6827	1,740	0,6432
05	57,3	10	2895,9619	1,420	0,7697	1,80385	0,6119	2,110	0,4794
06	63,9	9	2932,3110	1,530	0,7246	1,81514	0,6083	1,780	0,6272
07	82,9	15	602,6502	0,895	0,8560	0,98830	0,8323	0,842	0,8798
08	82,8	9	666,0466	0,939	0,8404	1,03899	0,8140	0,850	0,8819
09	81,1	12	725,5492	0,967	0,8297	1,08440	0,7896	0,933	0,8496
10	81,4	9	700,1749	0,889	0,8582	1,06527	0,8173	0,916	0,8566
11	78,6	13	1017,8032	0,756	0,8997	1,28437	0,7425	1,050	0,8020
12	78,4	12	1005,7034	0,819	0,8812	1,27671	0,7486	1,070	0,7987
13	93,5	11	74,0547	0,434	0,9705	0,50708	0,9618	0,322	0,9840
14	86,1	11	109,3981	0,666	0,9291	0,61632	0,9097	0,688	0,9207
15	90,5	11	103,1049	0,433	0,9707	0,59833	0,9479	0,470	0,9672
16	89,3	12	112,2325	0,463	0,9663	0,62426	0,9342	0,529	0,9560
17	80,9	15	277,0061	1,110	0,7856	0,98073	0,6840	0,940	0,8943
18	82,6	15	336,4400	0,415	0,9730	1,08083	0,8262	0,859	0,8876



A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras aplicar el diagnóstico PRESS para observar la evolución del RMSECV en función del número de factores utilizados (**Figura 42 a Figura 44**). En las **Figura 45 a Figura 50** se comparan las predicciones realizadas por cada calibración.

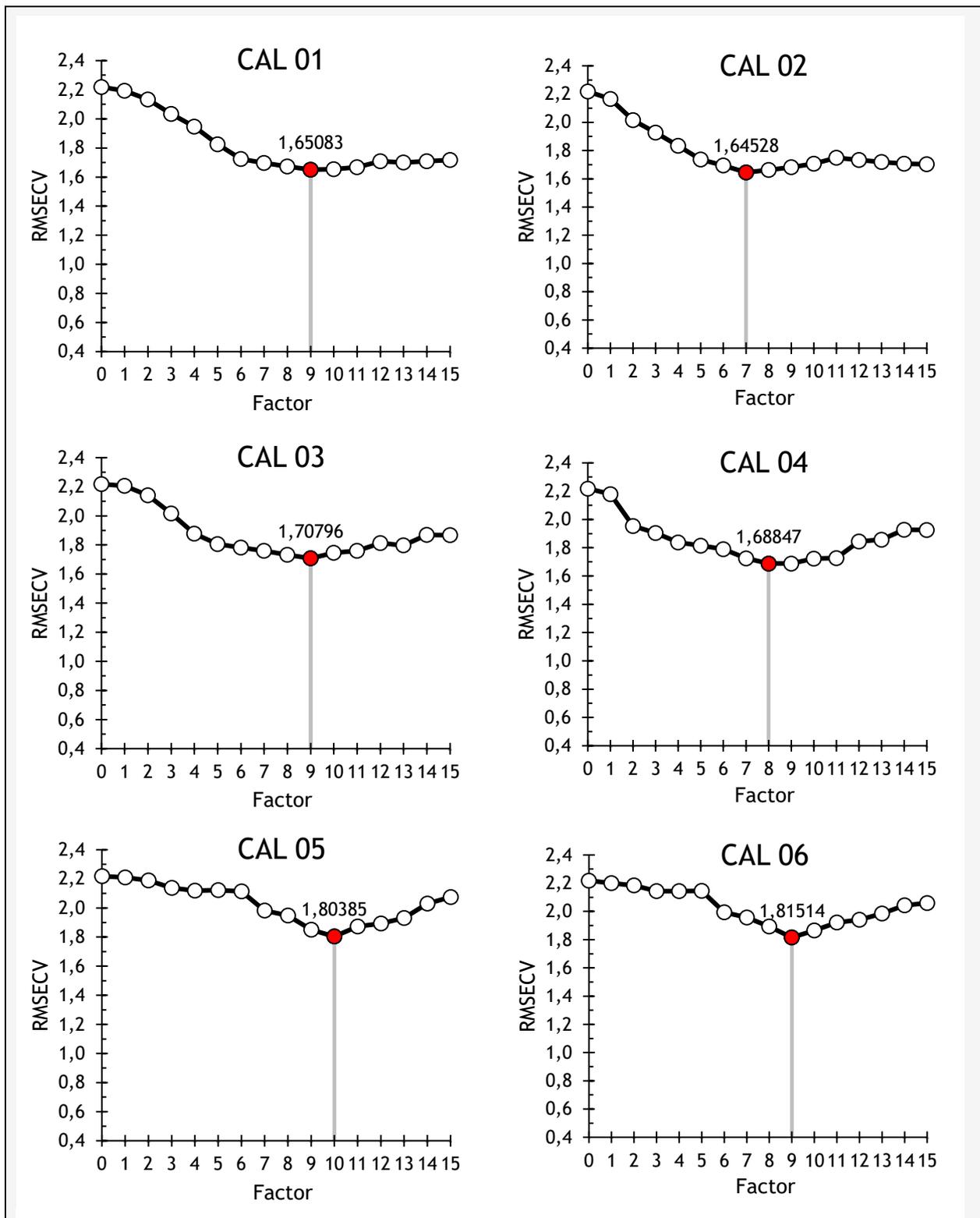


Figura 42. Resultado del diagnóstico PRESS para las calibraciones 01 a 06: evolución del RMSECV al añadir cada uno de los 15 factores calculados, siendo su valor mínimo el marcado en rojo.

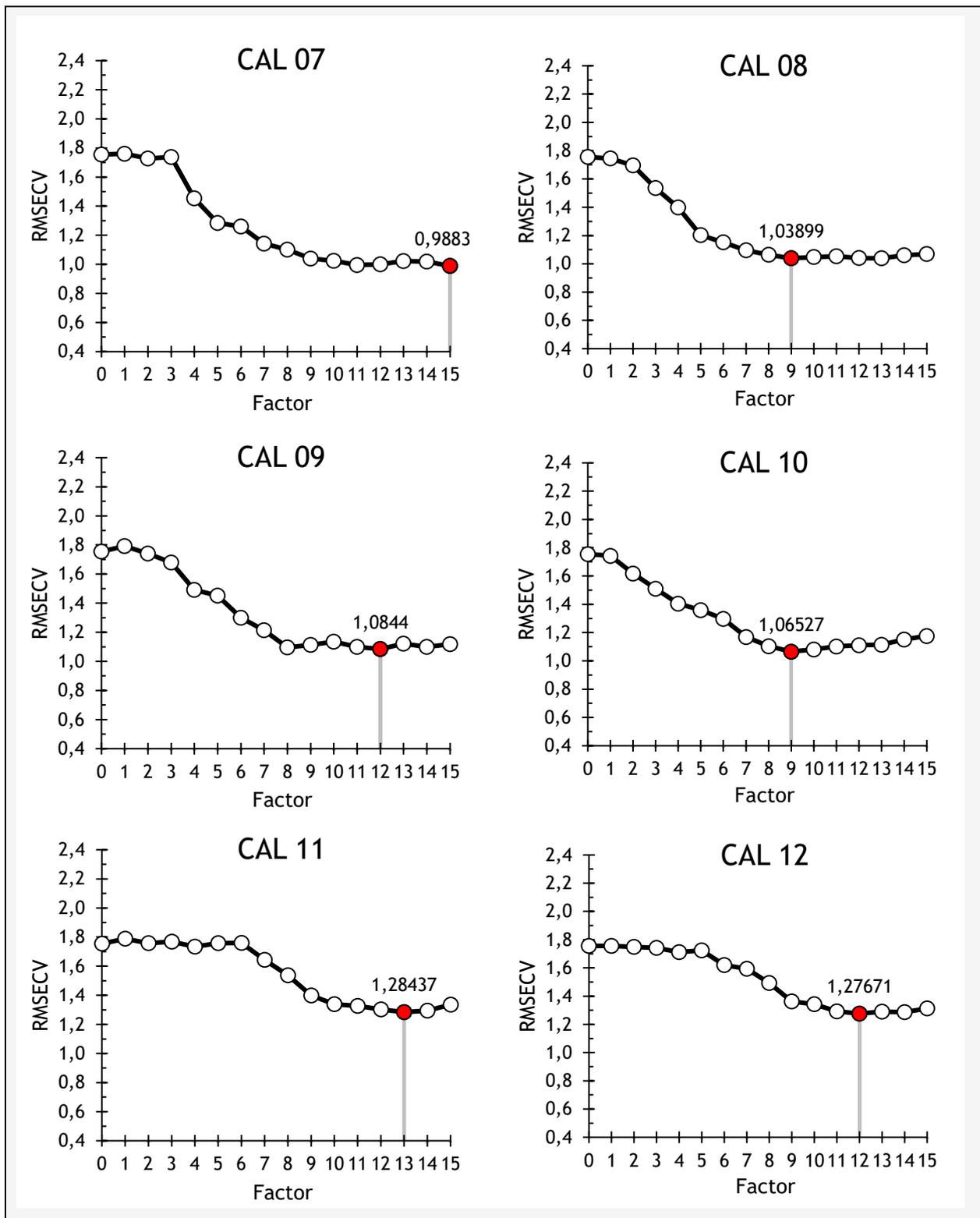


Figura 43. Resultado del diagnóstico PRESS para las calibraciones 07 a 12: evolución del RMSECV al añadir cada uno de los 15 factores calculados, siendo su valor mínimo el marcado en rojo.

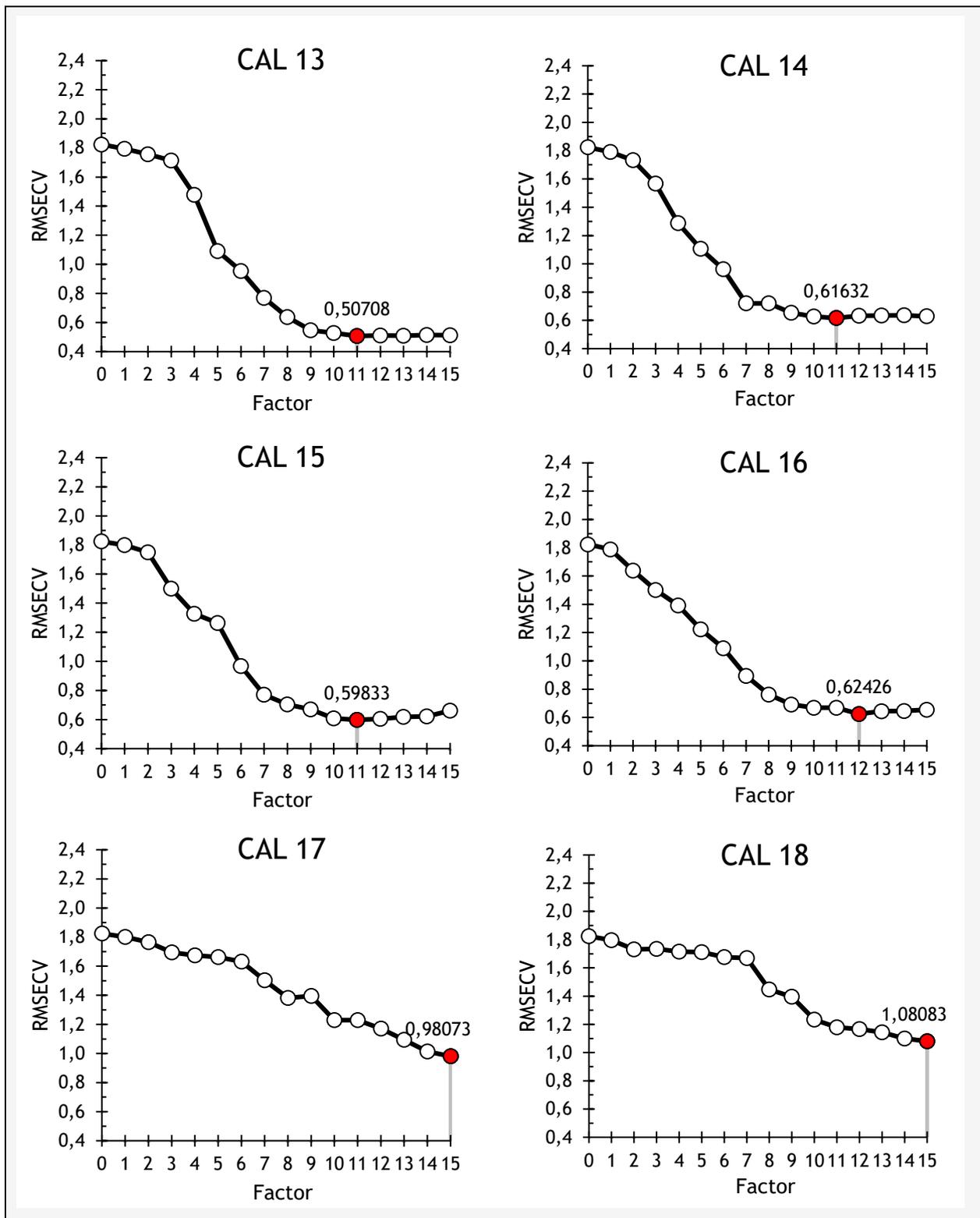


Figura 44. Resultado del diagnóstico PRESS para las calibraciones 13 a 18: evolución del RMSECV al añadir cada uno de los 15 factores calculados, siendo su valor mínimo el marcado en rojo.

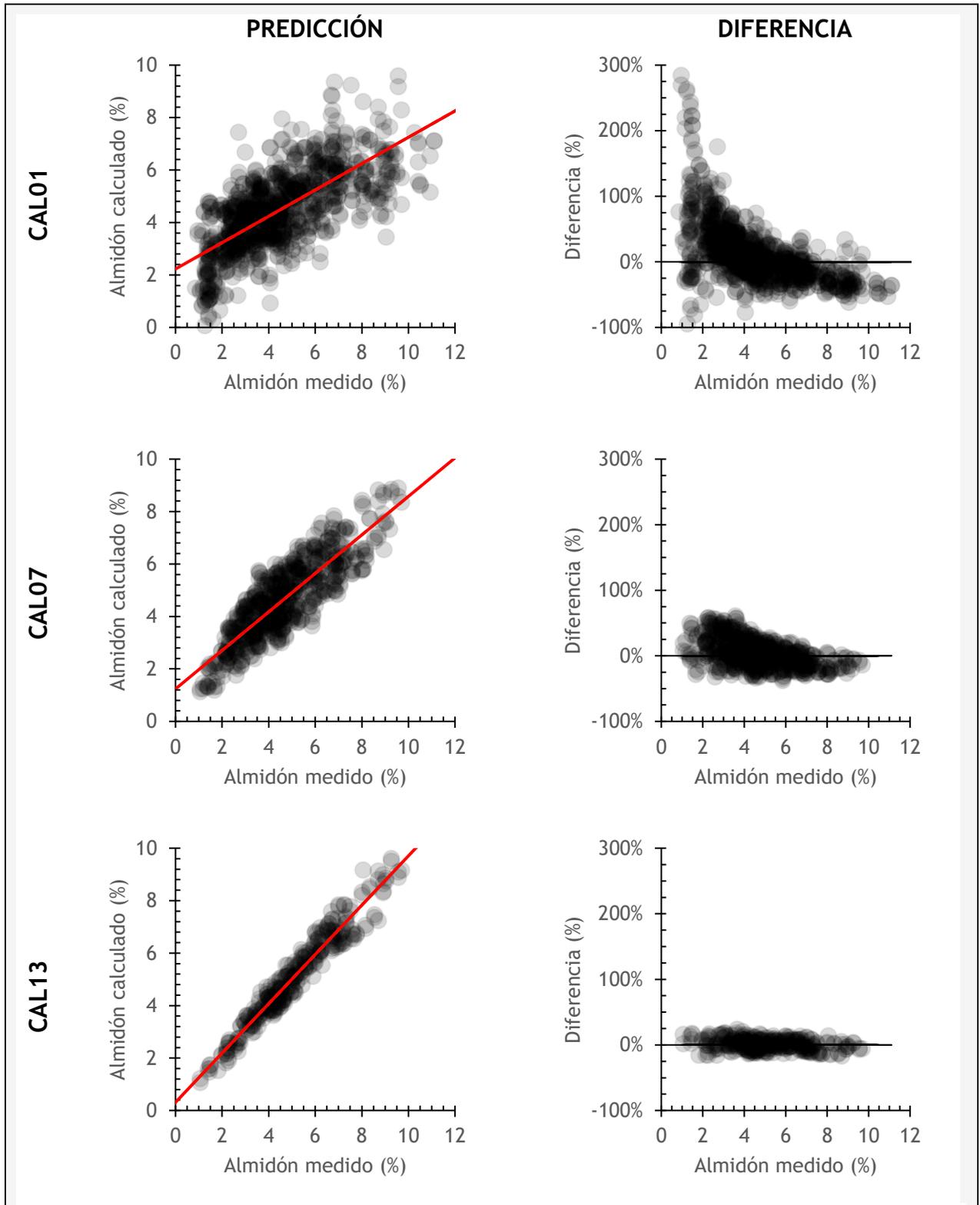


Figura 45. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (espectro original, sin ajuste de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL01, BD2: CAL07 y BD3: CAL13).

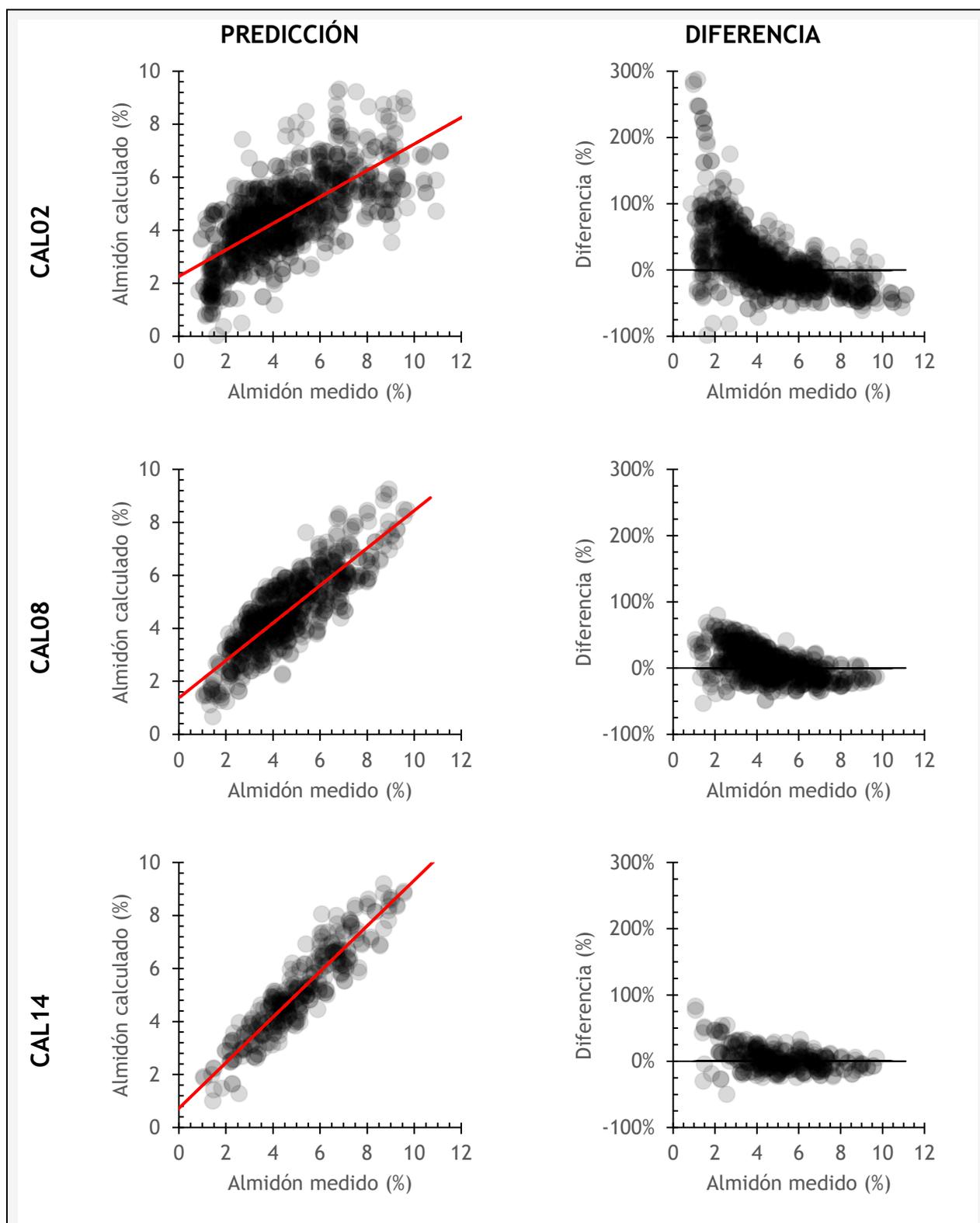


Figura 46. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (espectro original, extracción lineal de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL02, BD2: CAL08 y BD3: CAL14).

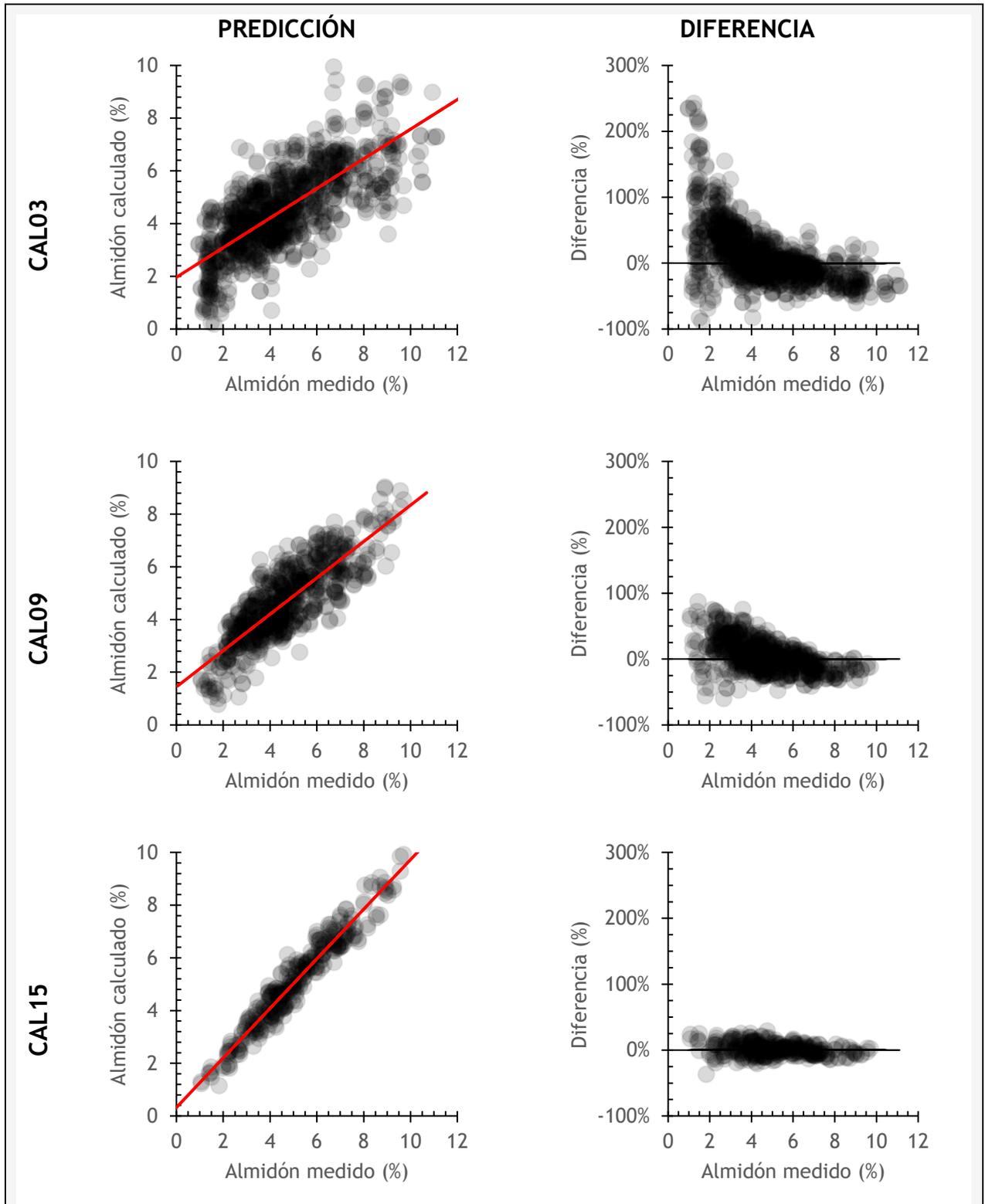


Figura 47. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (primera derivada, sin ajuste de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL03, BD2: CAL09 y BD3: CAL15).

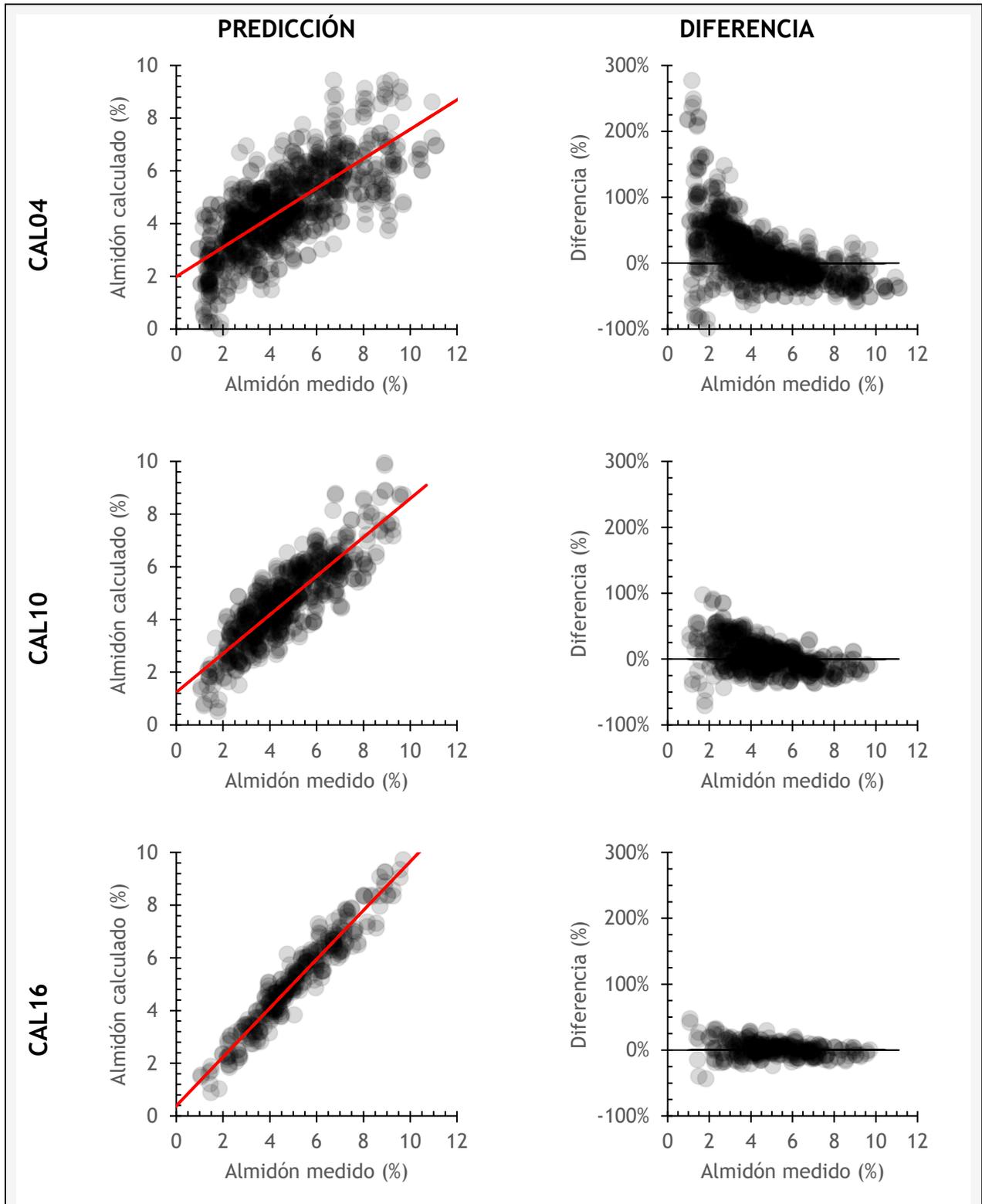


Figura 48. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (primera derivada, extracción lineal de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL04, BD2: CAL10 y BD3: CAL16).

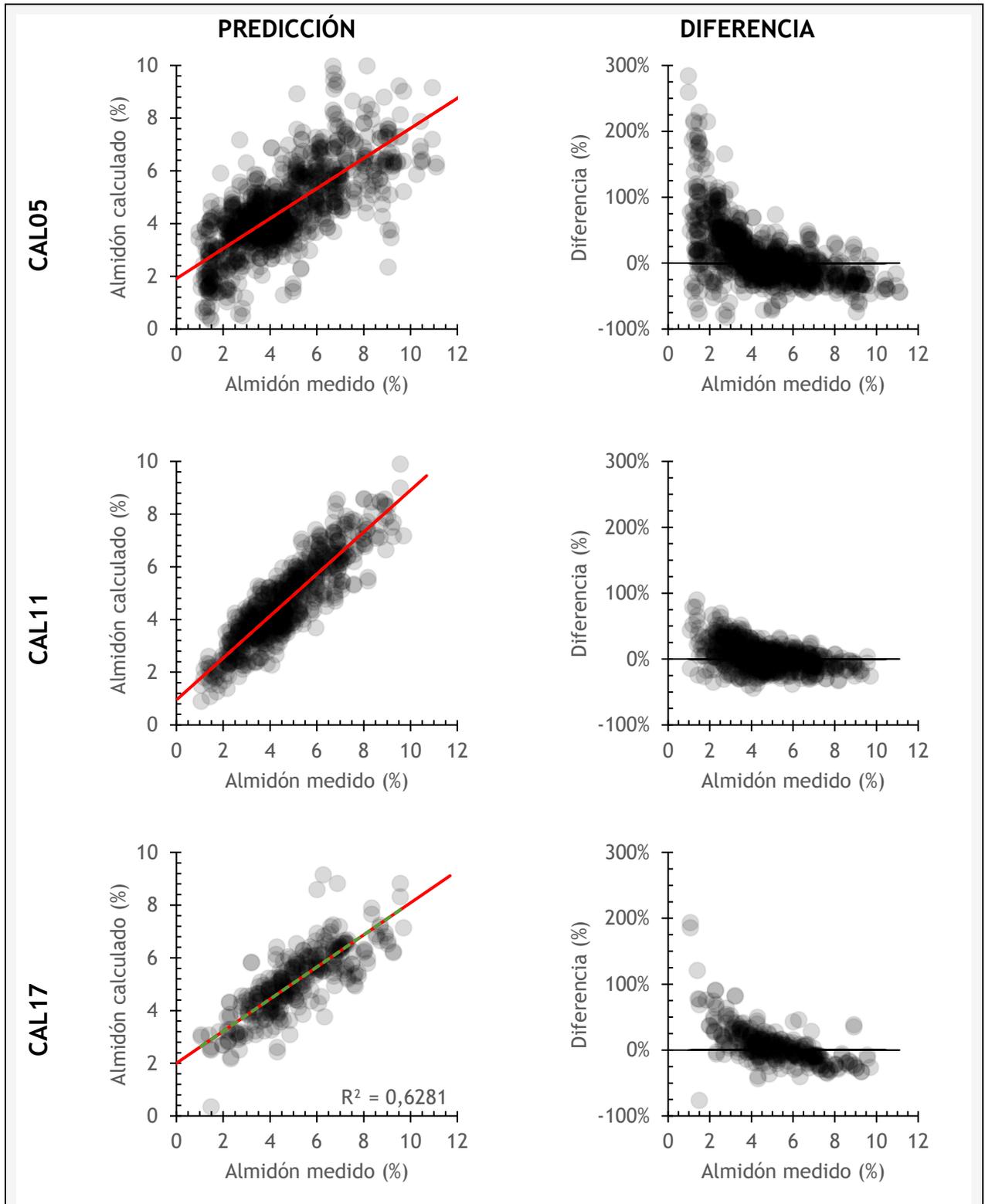


Figura 49. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (segunda derivada, sin ajuste de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL05, BD2: CAL11 y BD3: CAL17).

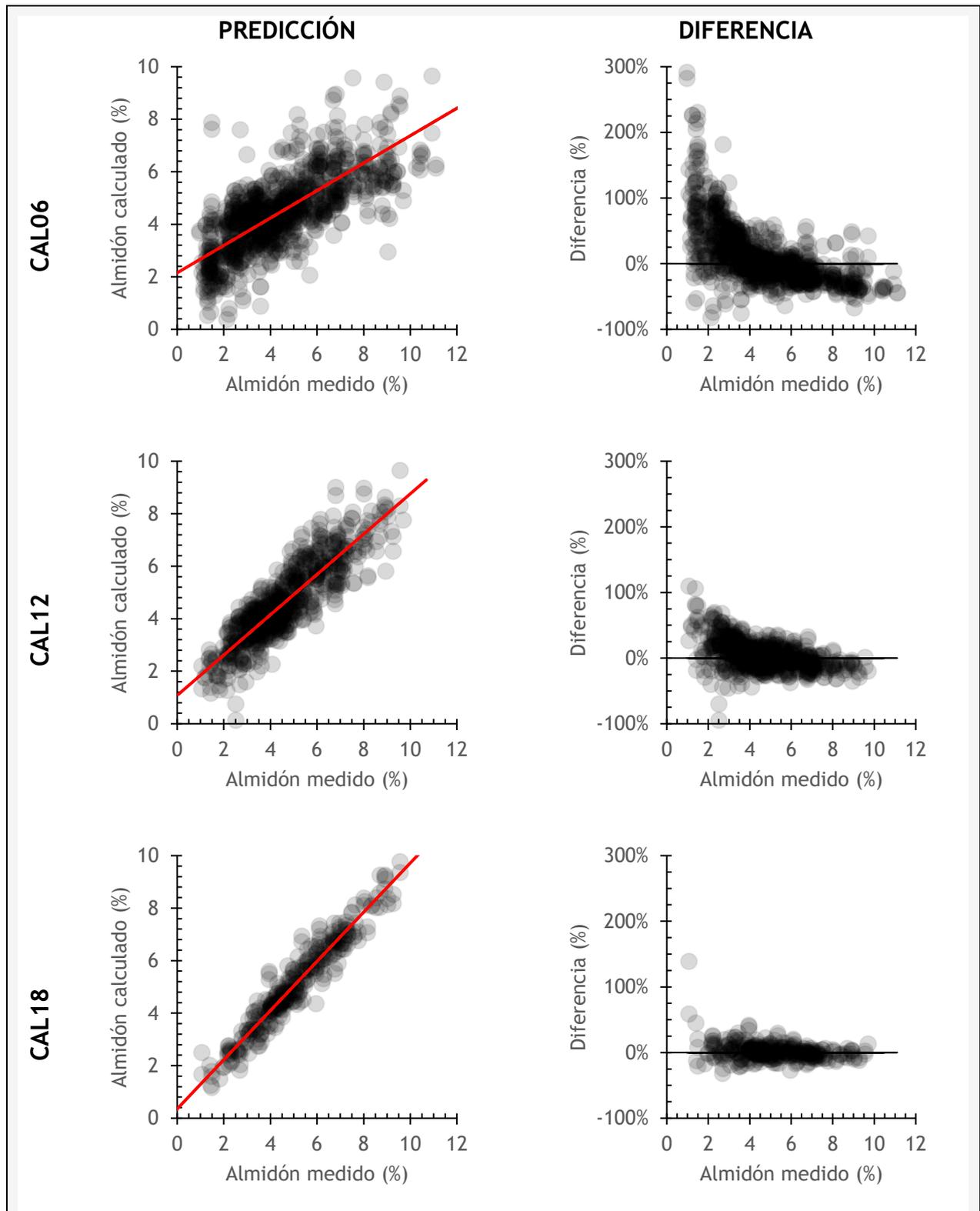


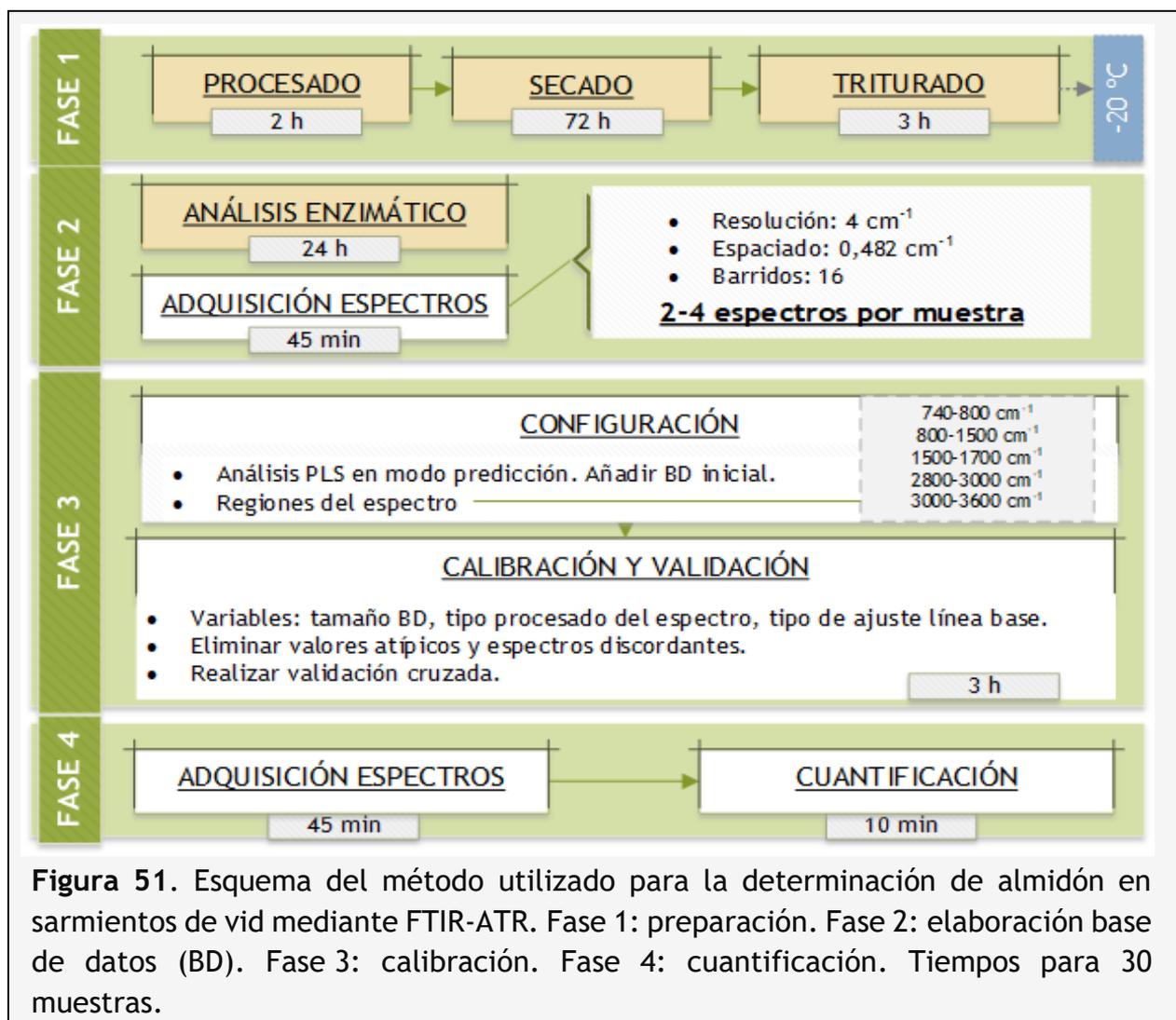
Figura 50. Resultado de la predicción del contenido de almidón: correlación entre el valor medido y el calculado (izquierda); diferencia entre el valor calculado y el valor medido (derecha). Comparativa de tres calibraciones con un mismo procesado (segunda derivada, extracción lineal de línea base), partiendo de diferentes bases de datos (BD1: CAL06, BD2: CAL12 y BD3: CAL18).

Los resultados de las calibraciones del modelo predictivo mediante análisis PLS, muestran una disminución generalizada del valor del RMSEC, del RMSECV y del RMSEP en aquellas calibraciones realizadas con una base de datos reducida, es decir, de la que se han retirado aquellos espectros cuyo valor de almidón calculado difería claramente del valor de almidón analizado.

Este descenso de los valores de los diferentes indicadores se produce en aquellas calibraciones en las que se ha mantenido la información espectral original y en las que, a la vez, no se ha realizado un ajuste de la línea base.

IV.2.3. DESARROLLO DEL PROTOCOLO

En la **Figura 51** se recoge el protocolo de cuantificación mediante FTIR-ATR. Se mantiene el protocolo anterior para la fase de procesado del material vegetal y para el análisis enzimático.



IV.3. COMPARATIVA ENTRE AMBOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Tras la optimización del método enzimático y la validación del método de espectroscopía infrarroja, se realizó una comparación de los resultados obtenidos mediante la aplicación de ambos métodos a los portainjertos seleccionados por el vivero en 2015 (Figura 52).

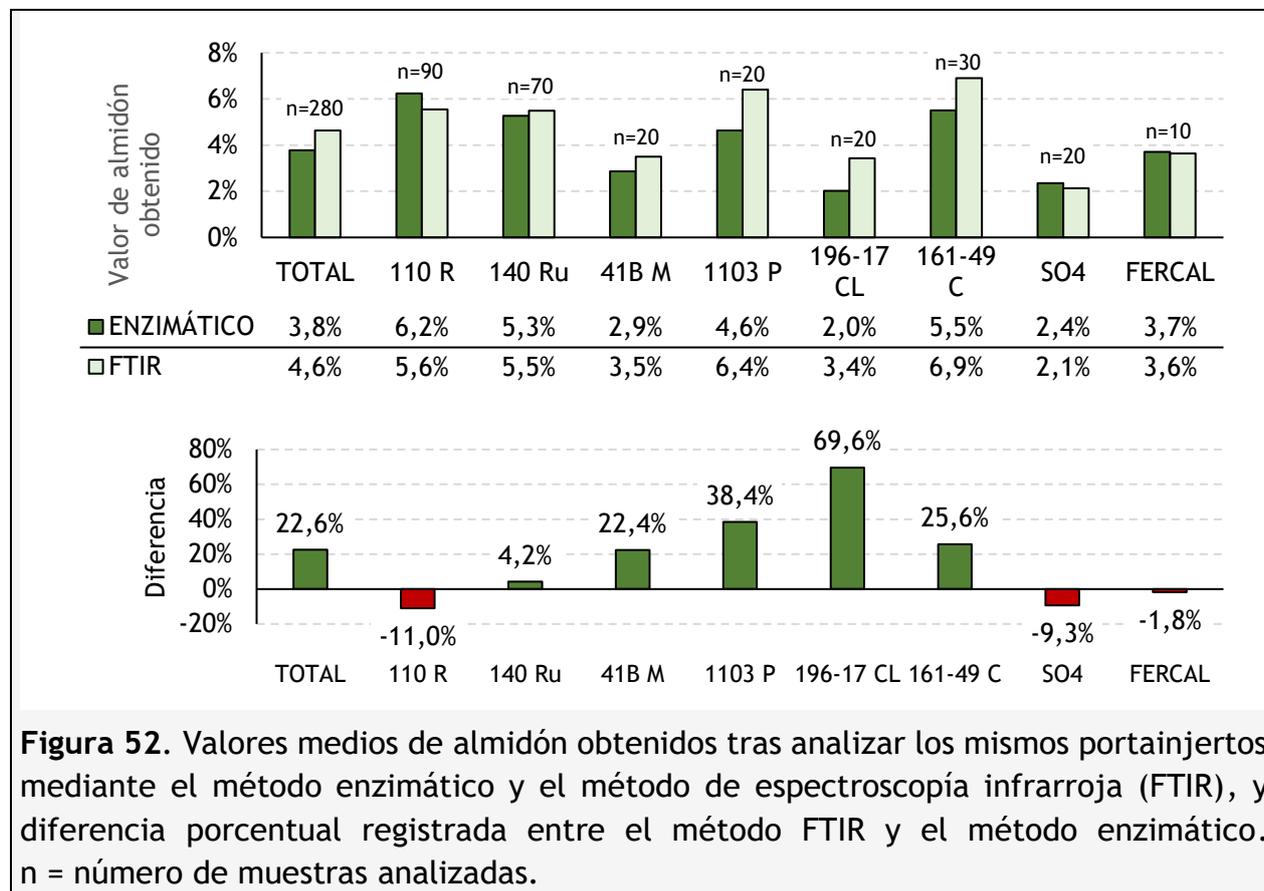


Figura 52. Valores medios de almidón obtenidos tras analizar los mismos portainjertos mediante el método enzimático y el método de espectroscopía infrarroja (FTIR), y diferencia porcentual registrada entre el método FTIR y el método enzimático. n = número de muestras analizadas.

De forma general, se observó como el método de análisis mediante FTIR tendía a realizar una predicción del porcentaje de almidón más elevado que el valor de almidón obtenido mediante el método enzimático, especialmente en el caso de las variedades 196-17 CL y 1103 P. Cabe mencionar como las variedades mayoritarias (110 R y 140 Ru) y las minoritarias (SO4 y FERCAL) contempladas en esta comparativa, mostraron una diferencia cercana e inferior al 10%, en valores absolutos.

Por otro lado, se realizó un seguimiento comparativo de los valores de almidón obtenidos de los portainjertos seleccionados por el vivero [recogidos en la **Tabla 3** (capítulo III.1)], analizados entre los años 2013 y 2017 (**Figura 53**). A nivel global, se observa una similitud y continuidad entre los valores obtenidos por ambos métodos analíticos.

A nivel varietal, este hecho se repitió de forma clara en las variedades 140 Ru, 196-17 CL, 161-49 C, SO4 y, en menor medida, 110 R; en cambio, en las variedades

41B M, 1103 P y 420A M¹⁴ aparecen ciertas discrepancias entre ambos métodos. En cuanto a la variedad FERCAL, no se disponen de datos suficientes para la comparativa.

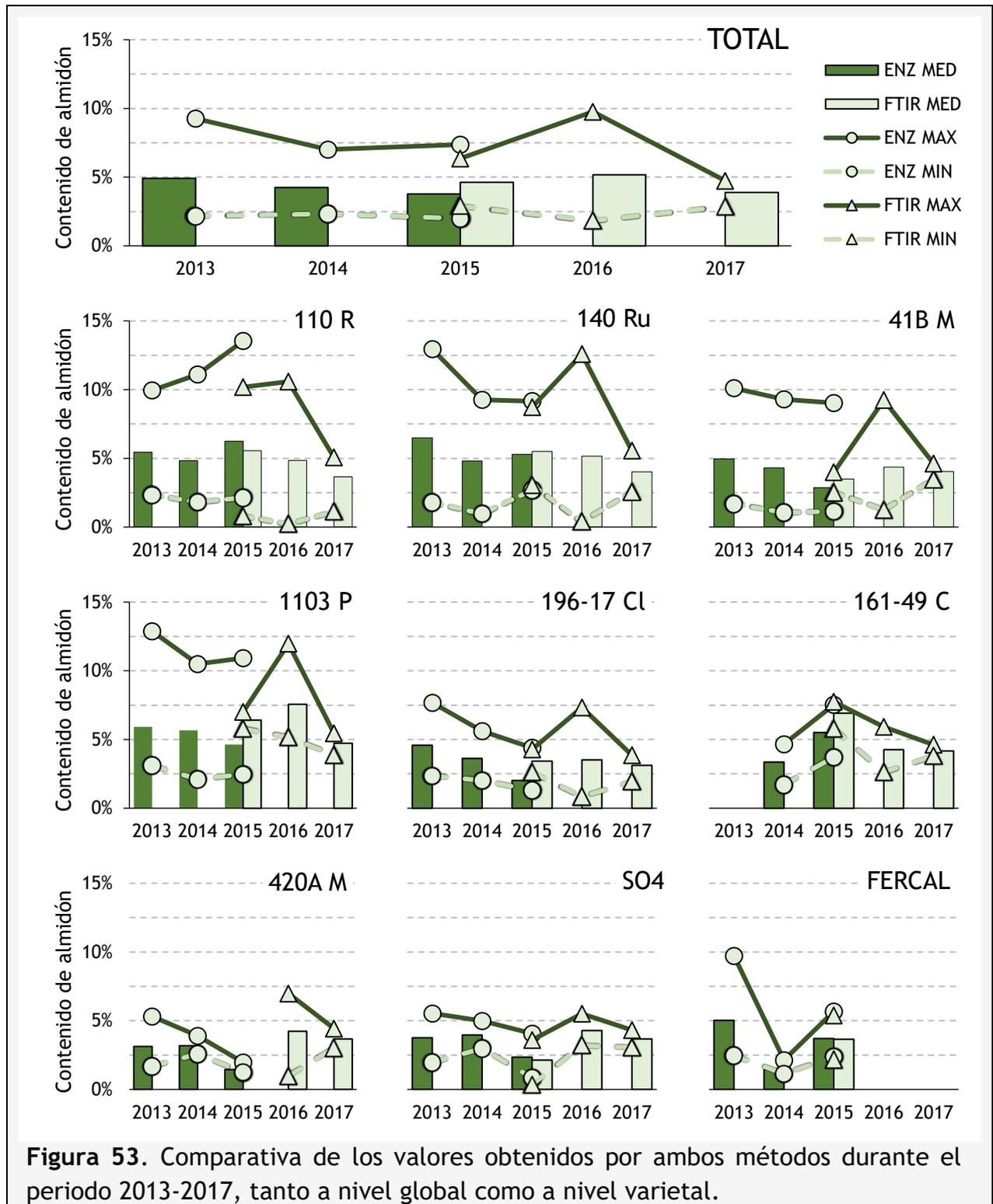


Figura 53. Comparativa de los valores obtenidos por ambos métodos durante el periodo 2013-2017, tanto a nivel global como a nivel varietal.

¹⁴ Debido a problemas técnicos, no se pudo realizar el análisis mediante FTIR de las muestras de la variedad 420A M, correspondientes al año 2015.

IV.4. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MAGNESIO FOLIAR SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN

IV.4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE MUESTREO DE SARMIENTOS DE PLANTA MADRE

En la Figura 54 se detalla el resultado del análisis de los sarmientos muestreados de las 3 plantas centrales (2, 3, 4) en cada una de las 4 repeticiones (R1, R2, R3, R4) del tratamiento control (C), y las 2 dosis de magnesio: 50 mg/ha (M50) y 150 mg/ha (M150).

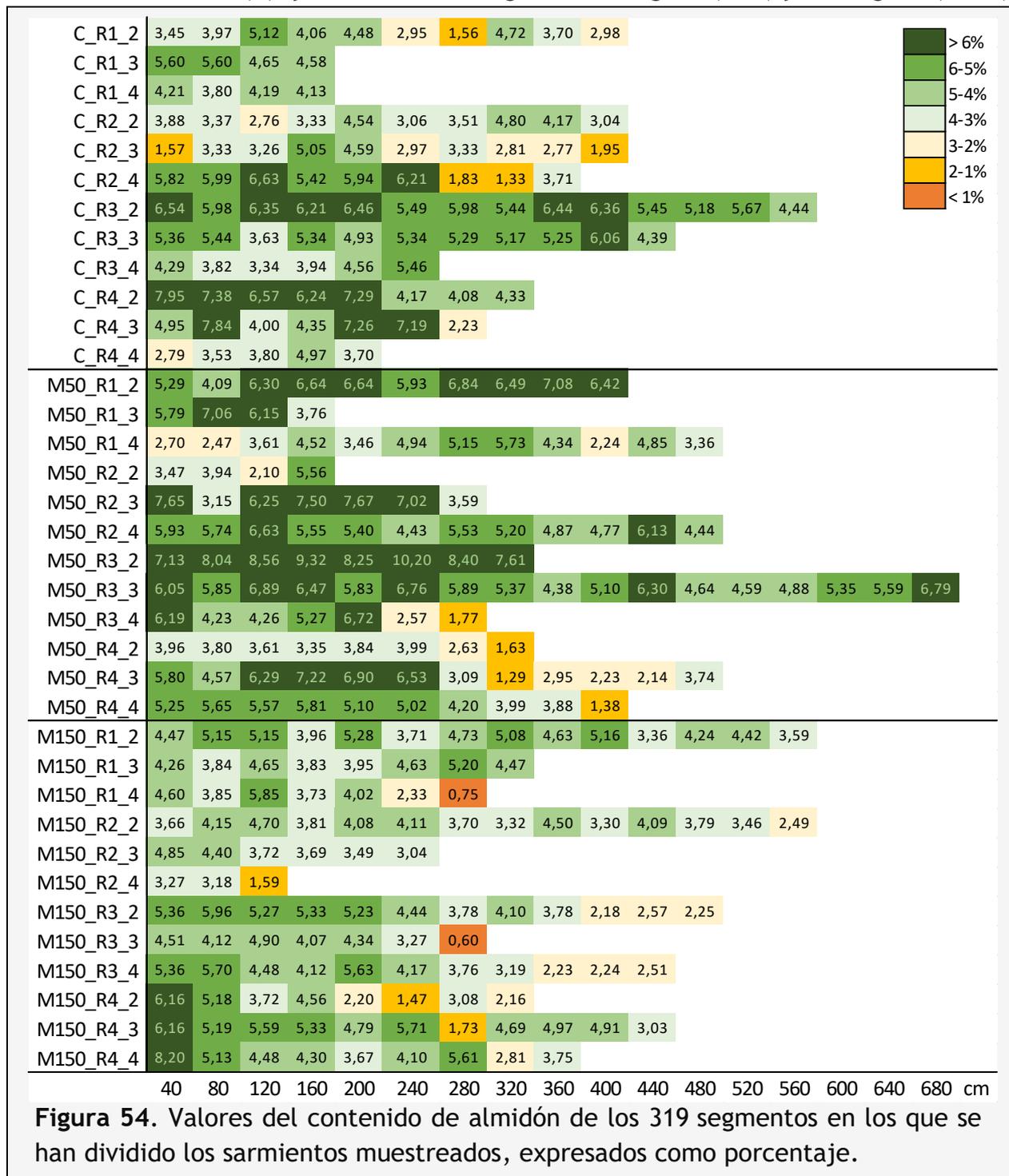


Figura 54. Valores del contenido de almidón de los 319 segmentos en los que se han dividido los sarmientos muestreados, expresados como porcentaje.

La **Figura 55** muestra la distribución del nivel de almidón a lo largo del sarmiento respecto del valor de almidón total del sarmiento. Se puede observar cierta tendencia a la acumulación de una mayor cantidad de almidón en las zonas basal y media de los sarmientos, respecto a su parte apical. Esta tendencia se cumple en todos los casos del tratamiento M150.

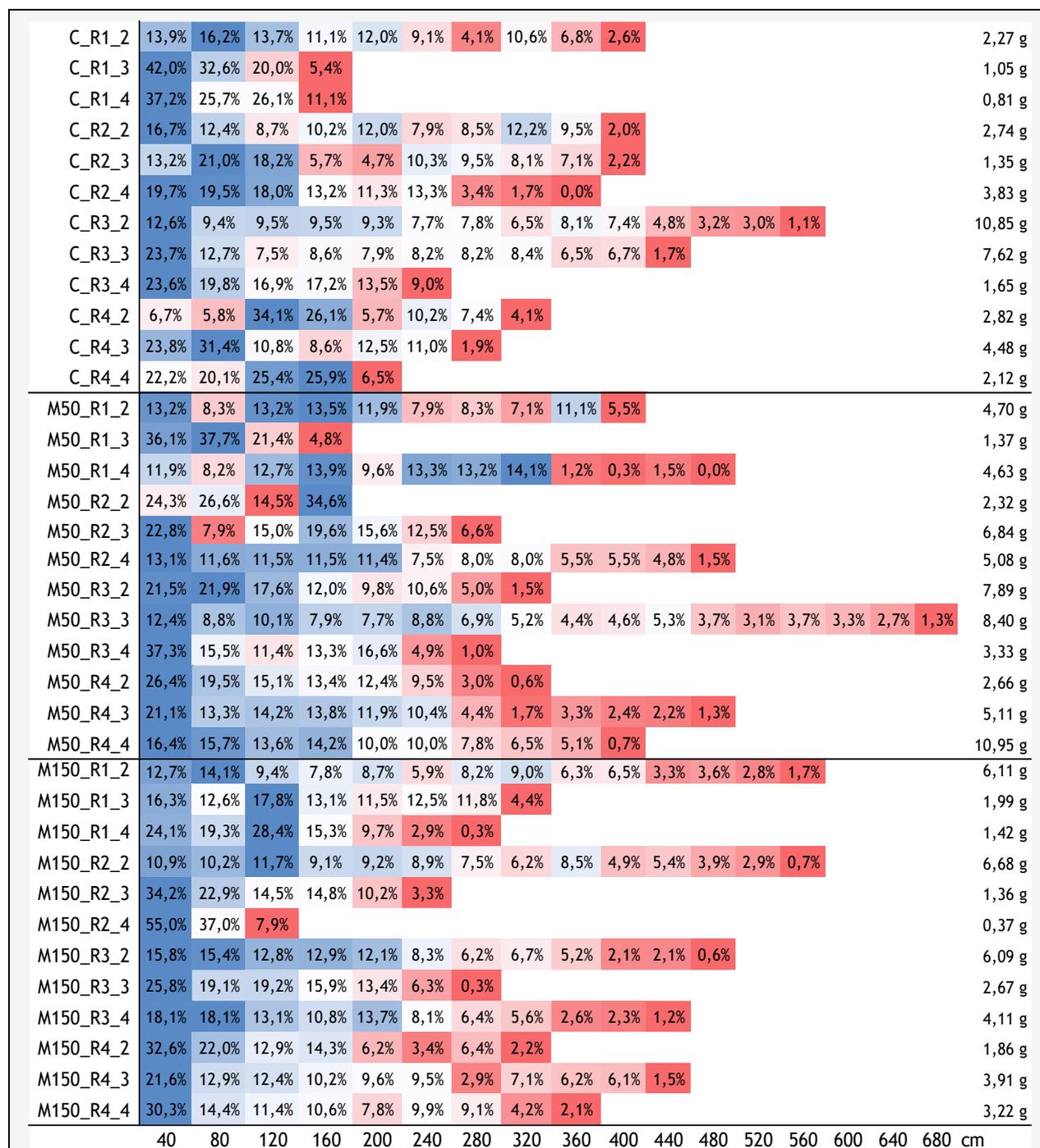


Figura 55. Distribución longitudinal del nivel porcentual de almidón en cada sarmiento analizados respecto de la cantidad total de almidón contenida en el mismo, indicada en gramos en la columna de la derecha. Valores bajos: tonos rojos, valores altos: tonos azules.

Dado el gran número de muestras a analizar, era necesario disponer de un método de muestreo que redujese su número y, por lo tanto, disminuyera el tiempo de análisis y obtención de resultados.

Al mismo tiempo, el método de muestreo debería aportar información válida sobre el contenido de almidón medio presente en el sarmiento, de tal forma que el valor obtenido fuera significativamente similar al que se obtendría analizando el sarmiento al completo.

El valor medio del contenido de almidón de cada sarmiento se obtuvo tras aplicar la metodología descrita en el capítulo III, apartado 5.2. Cada sarmiento fue dividido en 3 partes proporcionales: basal (B), media (M), apical (A), y cada una de ellas en segmentos de 40 cm.

Posteriormente se aplicaron los dos criterios de muestreo selectivo planteados (CR1 y CR2), y se calculó el valor medio para cada sarmiento (Tabla 12).

Tabla 12. Relación de valores medios de almidón (en porcentaje) para cada sarmiento: reales (VMR), según el criterio 1 (VMCR1) y según el criterio 2 (VMCR2).

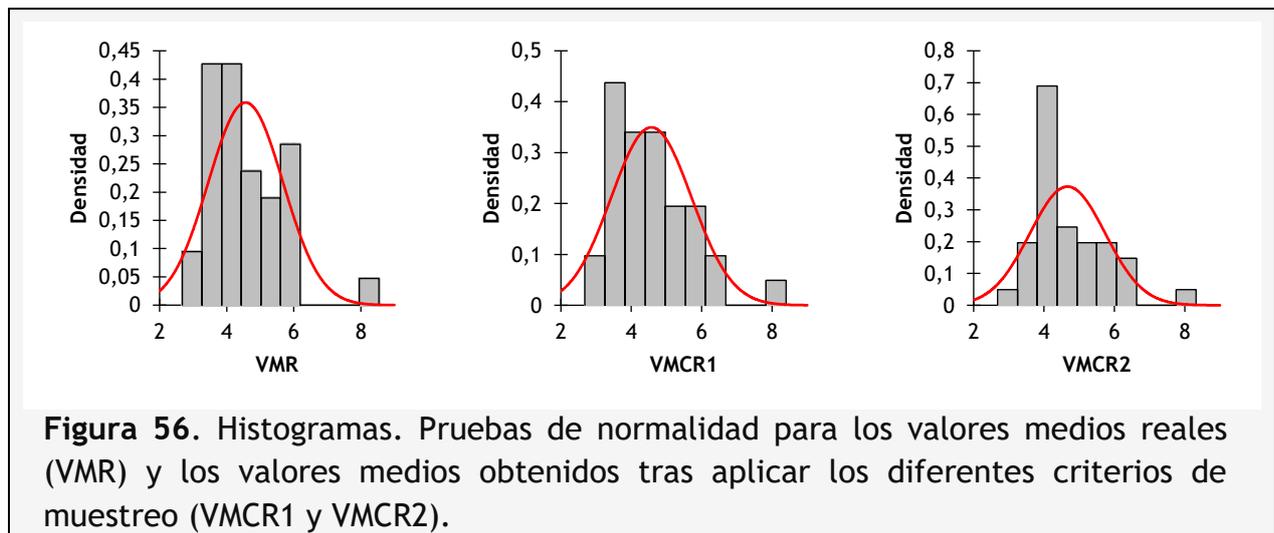
CÓDIGO	VMR	VMCR1	VMCR2	CÓDIGO	VMR	VMCR1	VMCR2
C_R1_2	3,70	3,35	4,22	M50_R2_4	5,39	5,23	5,54
C_R1_3	5,11	5,11	5,11	M50_R3_2	8,44	8,30	8,22
C_R1_4	4,08	4,08	4,08	M50_R3_3	5,69	6,06	5,37
C_R2_2	3,65	3,26	4,22	M50_R3_4	4,43	4,74	4,50
C_R2_3	3,16	3,02	3,37	M50_R4_2	3,35	3,47	3,43
C_R2_4	4,76	4,94	4,42	M50_R4_3	4,40	4,65	4,14
C_R3_2	5,86	6,08	5,87	M50_R4_4	4,58	4,54	4,65
C_R3_3	5,11	4,87	5,40	M150_R1_2	4,49	4,51	4,82
C_R3_4	4,24	4,24	4,24	M150_R1_3	4,35	4,30	4,28
C_R4_2	6,00	6,28	6,41	M150_R1_4	3,59	3,80	4,07
C_R4_3	5,40	5,10	5,67	M150_R2_2	3,80	3,64	4,08
C_R4_4	3,76	3,76	3,76	M150_R2_3	3,86	3,86	3,86
M50_R1_2	6,17	6,24	6,08	M150_R2_4	2,68	2,68	2,68
M50_R1_3	5,69	5,69	5,69	M150_R3_2	4,19	4,34	4,03
M50_R1_4	3,95	4,02	3,88	M150_R3_3	3,69	3,76	4,18
M50_R2_2	3,77	3,77	3,77	M150_R3_4	3,94	3,90	3,99
M50_R2_3	6,12	5,97	6,31	M150_R4_2	3,57	3,48	4,74

Posteriormente, se realizó un análisis de estos datos de partida para conocer sus estadísticos descriptivos (Tabla 13).

Tabla 13. Estadísticos descriptivos¹⁵ de los valores medios: reales (VMR), según el criterio 1 (VMCR1) y según el criterio 2 (VMCR2).

TRATAMIENTO		VMR	VMCR1	VMCR2
Número de observaciones		34	34	34
TC	Media	4,56%	4,56%	4,68%
	Error estándar de la media	0,20%	0,20%	0,19%
	Mediana	4,30%	4,32%	4,26%
	Moda	5,11%	3,76%	4,08%
	Suma	154,97%	155,04%	159,08%
DP	Desviación estándar	1,15%	1,17%	1,09%
	Varianza	1,312	1,374	1,187
	Rango	5,76%	5,62%	5,54%
	Mínimo	2,68%	2,68%	2,68%
	Máximo	8,44%	8,30%	8,22%
DT	Asimetría	1,257	1,070	1,124
	Error estándar de asimetría	0,403	0,403	0,403
	Curtosis	2,520	1,668	2,045
	Error estándar de curtosis	0,788	0,788	0,788

Las comprobaciones gráficas de la normalidad apuntan hacia una distribución Normal de los datos (**Figura 56** y **Figura 57**). Sin embargo, las pruebas numéricas de normalidad indican cierta discrepancia, salvo en el caso de las muestras analizadas según el criterio CR2, en el que todas las pruebas indicaban que los datos se ajustaban a una distribución no Normal (**Tabla 14**).



¹⁵ Agrupados en 3 bloques: tendencia central (TC), dispersión (DP) y distribución (DT).

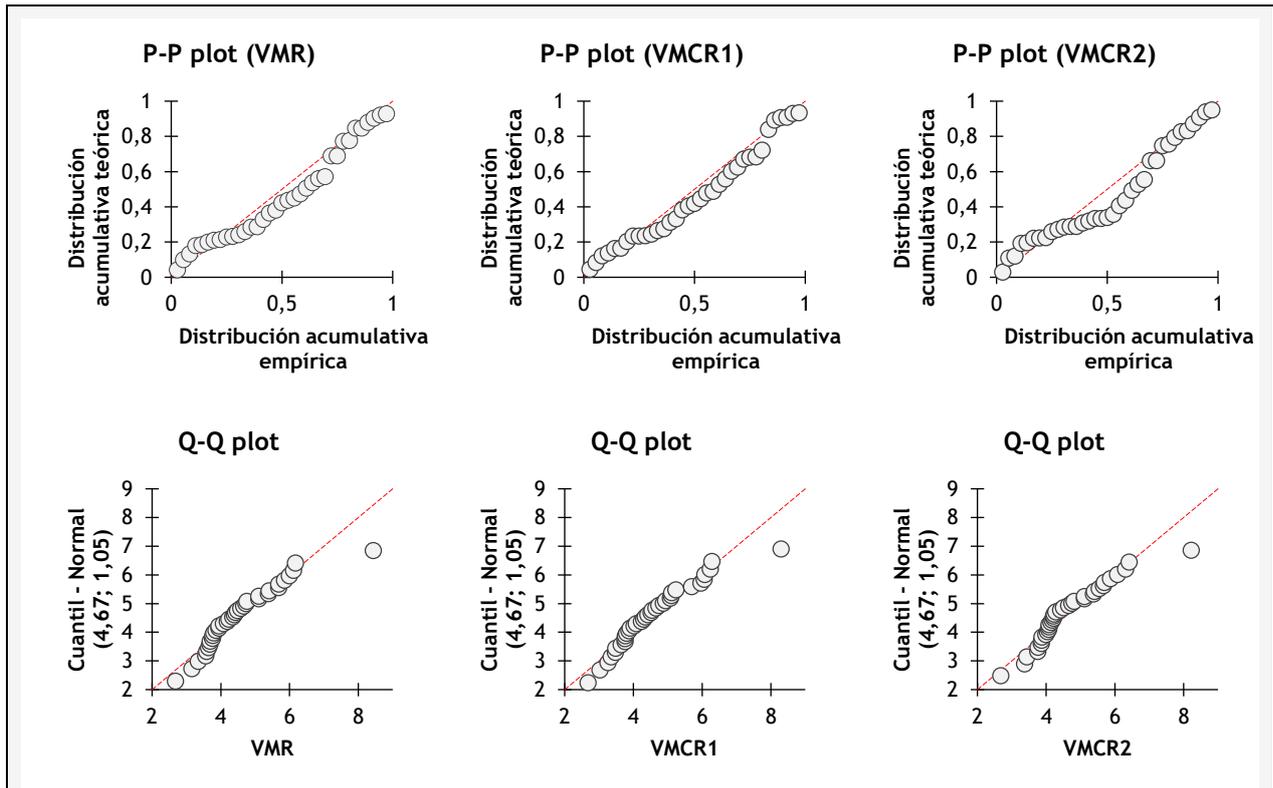


Figura 57. Gráficos P-P y gráficos Q-Q. Pruebas de normalidad para los valores medios reales (VMR) y los valores medios obtenidos tras aplicar los diferentes criterios de muestreo (VMCR1 y VMCR2).

Tabla 14. Valores p (bilateral) resultantes de las pruebas de normalidad para los valores medios reales (VMR) y los valores medios obtenidos tras aplicar los diferentes criterios de muestreo (VMCR1 y VMCR2). En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).

VARIABLE\PRUEBA	SHAPIRO-WILK	ANDERSON-DARLING	LILLIEFORS	JARQUE-BERA
VMR	0,009	0,036	0,176	0,000
VMCR1	0,036	0,110	0,548	0,010
VMCR2	0,011	0,011	0,011	0,003

A partir de estos resultados y dadas la hipótesis nula (H0) y la hipótesis alternativa (Ha):

- H0: la variable de la cual se extrajo la muestra sigue una distribución Normal;
- Ha: la variable de la cual se extrajo la muestra no sigue una distribución Normal.

Se obtiene la siguiente interpretación: los valores p superiores al nivel de significancia implican que la hipótesis nula no se puede rechazar. Por lo tanto, los valores medios del contenido de almidón siguen una distribución Normal. Esto ocurre en un tercio de los casos. Mientras, los valores p inferiores al nivel de significancia implican una aceptación de la hipótesis alternativa, por lo que los valores medios del contenido de almidón siguen una distribución no Normal. El resultado de las pruebas de normalidad no es concluyente,

pero dado que en la mayor parte de los casos los datos se ajustan a una distribución no Normal, se optó por aplicar las pruebas de Wilcoxon (de signos y de rangos con signo) (Tabla 15), para comparar los valores medios obtenidos mediante los diferentes criterios de muestreo selectivo.

Tabla 15. Resultados de las pruebas de Wilcoxon para la comparación de medias, realizadas para una significancia de alfa = 0,05.

PRUEBA DE SIGNOS			PRUEBA DE RANGOS CON SIGNO		
Valores comparados	VMR - VMCR1	VMR - VMCR2	Valores comparados	VMR - VMCR1	VMR - VMCR2
N+	14	9	V	195	119
Valor esperado	14,000	14,000	V (estandarizado)	-0,182	-1,913
Varianza (N+)	7,000	7,000	Valore esperado	203,000	203,000
valor-p (bilateral)	0,851	0,087	Varianza (V)	1928,500	1928,500
			valor-p (bilateral)	0,855	0,056

Para la interpretación de ambas pruebas se plantean las siguientes hipótesis:

- H0: la distribución de las dos muestras es la misma;
- Ha: las distribuciones de las dos muestras son diferentes.

Puesto que el valor p calculado es mayor que el nivel de significación (alfa = 0,05), en ninguno de los casos comparados se puede rechazar la hipótesis nula H0. Esto indica que **no existe una diferencia significativa entre los valores medios obtenidos analizando el sarmiento al completo y los valores medios obtenidos mediante los criterios de optimización del muestreo.** En el caso del criterio CR2, el valor p se acerca claramente al valor de significancia, no resultando muy adecuado para la optimización del muestreo.

Por tanto, de este análisis se deduce que para disponer de información realista acerca del contenido medio de almidón presente en un sarmiento de vid es suficiente con analizar parte del material vegetal, aplicando el criterio de muestreo selectivo CR1.

IV.4.2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE MAGNESIO FOLIAR SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN

A los sarmientos muestreados durante el ensayo se les aplicó el criterio CR1 (en base al análisis realizado en el apartado anterior) y se determinó su contenido de almidón mediante el método de espectroscopía infrarroja. Los valores obtenidos se recogen en la **Tabla 16**. Cabe mencionar la existencia de varias plantas sin brotar en la campaña 2017, hecho que pudiera generar cierto sesgo en los resultados. Se analizaron los valores medios de almidón para conocer sus estadísticos descriptivos (**Tabla 17**).

Tabla 16. Valores medios del contenido de almidón en cada planta (P) muestreadas de cada tratamiento (C, M50, M150) y repetición (R), durante la duración del ensayo.

CÓDIGO	2015	2017	CÓDIGO	2015	2017	CÓDIGO	2015	2017
C_R1_P2	3,35	NB	M50_R1_P2	6,24	NB	M150_R1_P2	4,51	1,99
C_R1_P3	5,11	4,63	M50_R1_P3	5,69	NB	M150_R1_P3	4,30	2,51
C_R1_P4	4,08	3,20	M50_R1_P4	4,02	3,77	M150_R1_P4	3,80	2,96
C_R2_P2	3,26	3,08	M50_R2_P2	3,77	2,49	M150_R2_P2	3,64	3,78
C_R2_P3	3,02	3,89	M50_R2_P3	5,97	3,51	M150_R2_P3	3,86	NB
C_R2_P4	4,94	2,44	M50_R2_P4	5,23	2,52	M150_R2_P4	2,68	3,08
C_R3_P2	6,08	3,01	M50_R3_P2	8,30	2,56	M150_R3_P2	4,34	NB
C_R3_P3	4,87	2,59	M50_R3_P3	6,06	NB	M150_R3_P3	3,76	2,75
C_R3_P4	4,24	2,58	M50_R3_P4	4,74	2,89	M150_R3_P4	3,90	3,10
C_R4_P2	6,28	2,88	M50_R4_P2	3,47	3,86	M150_R4_P2	3,48	2,63
C_R4_P3	5,10	4,21	M50_R4_P3	4,65	2,75	M150_R1_P2	4,51	3,72
C_R4_P4	3,76	3,74	M50_R4_P4	4,54	2,63	M150_R1_P3	4,30	3,98

Tabla 17. Estadísticos descriptivos¹⁶ los valores medios de los tratamientos C, M50 y M150 durante los dos años de estudio: 2015 y 2017.

TRATAMIENTO		C_15	C_17	M50_15	M50_17	M150_15	M150_17
Nº de observaciones		12	11	12	9	12	10
Valores perdidos		0	1	0	3	0	2
TC	Media	4,51%	3,30%	5,22%	3,00%	3,92%	3,05%
	E.E. de la media	0,31%	0,22%	0,39%	0,19%	0,15%	0,20%
	Mediana	4,56%	3,08%	4,99%	2,75%	3,88%	3,02%
	Moda	3,02%	2,44%	3,47%	2,49%	4,30%	1,99%
	Suma	54,09%	36,25%	62,68%	26,98%	47,08%	30,50%
DP	D.E.	1,07%	0,72%	1,34%	0,56%	0,52%	0,63%
	Varianza	1,143	0,522	1,785	0,311	0,274	0,393
	Rango	3,26%	2,19%	4,83%	1,37%	1,83%	1,99%
	Mínimo	3,02%	2,44%	3,47%	2,49%	2,68%	1,99%
	Máximo	6,28%	4,63%	8,30%	3,86%	4,51%	3,98%
DT	Asimetría	0,242	0,645	0,935	0,784	-1,106	0,025
	E.E. de asimetría	0,637	0,661	0,637	0,717	0,637	0,687
	Curtosis	-0,925	-0,721	1,301	-1,374	1,721	-0,642
	E.E. de curtosis	1,232	1,279	1,232	1,400	1,232	1,334

¹⁶ Agrupados en 3 bloques: tendencia central (TC), dispersión (DP) y distribución (DT).
(D.E.: Desviación estándar. E.E.: Error estándar).

Dado que existen valores perdidos, para el cálculo de las pruebas de normalidad se optó por sustituir dichos datos estimando la media (Tabla 18). Los resultados de las pruebas numéricas de normalidad indicaban que los datos se ajustaban a una distribución Normal

Tabla 18. Valores p (bilateral) resultantes de las pruebas de normalidad para los valores medios de los tratamientos C, M50 y M150 durante los dos años de estudio: 2015 y 2017. En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).

VARIABLE\PRUEBA	SHAPIRO-WILK	ANDERSON-DARLING	LILLIEFORS	JARQUE-BERA
C_15	0,568	0,618	0,809	0,729
C_17	0,471	0,506	0,472	0,623
M50_15	0,421	0,520	0,731	0,499
M50_17	0,070	0,083	0,037	0,495
M150_15	0,133	0,208	0,343	0,359
M150_17	0,642	0,385	0,131	0,941

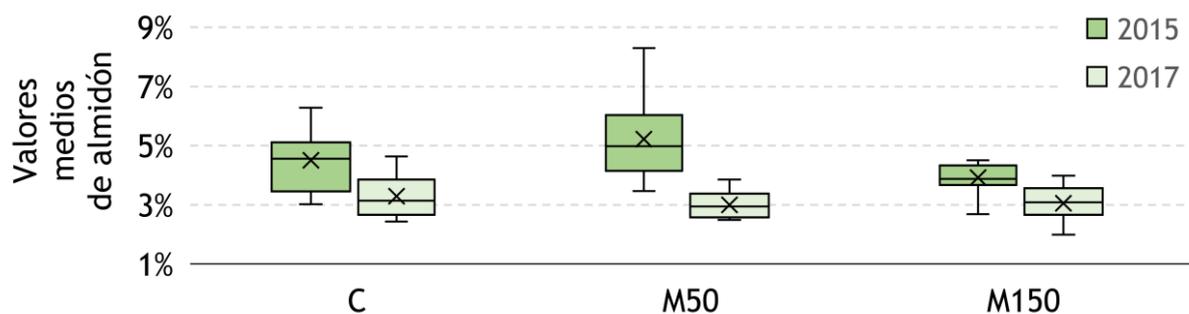
Para la interpretación de las pruebas de normalidad se plantearon las siguientes hipótesis:

- H0: la variable de la cual se extrajo la muestra sigue una distribución Normal;
- Ha: la variable de la cual se extrajo la muestra no sigue una distribución Normal.

Dado que la mayoría de los valores p son superiores al nivel de significancia (alfa = 0,05), la hipótesis nula no se puede rechazar, por tanto, los datos se ajustan a una distribución Normal. En base a estos resultados, se aplicó la prueba de t de Student (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados de la prueba de t de Student para determinar si la diferencia interanual de los valores medios de almidón de cada tratamiento es significativa. En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).

TRATAMIENTO	C	M50	M150
Diferencia	0,012	0,022	0,009
t (Valor observado)	3,102	4,960	3,872
t (Valor crítico)	2,201	2,201	2,201
GL	11	11	11
valor-p (bilateral)	0,010	0,000	0,003

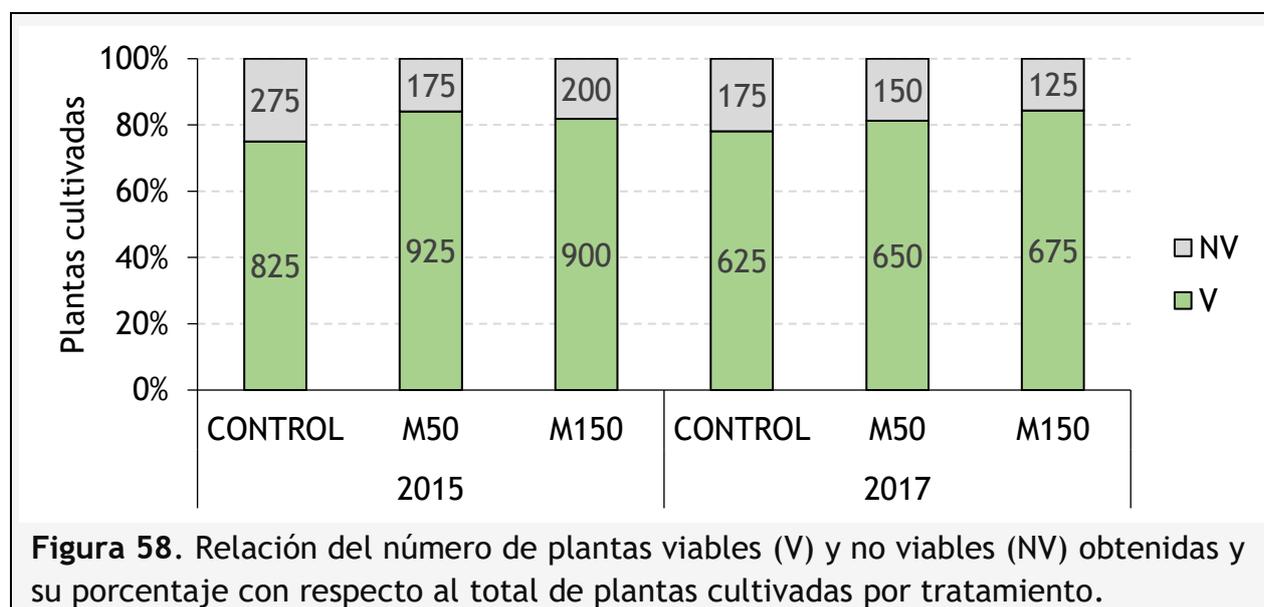


Se aprecia una mayor dispersión en los valores del primer año frente a los del segundo, que se encuentran más agrupados. Esto se observa de forma más clara en los tratamientos C y M50. Los resultados de la prueba t de Student indican que, para cada uno de los tratamientos, entre los valores medios de almidón del año 2015 y los del año 2017 existe una diferencia significativa.

Por lo tanto, los resultados sugieren que el contenido de almidón almacenado en los sarmientos no se vio alterado por las aplicaciones de magnesio foliar, ya que los resultados son significativamente diferentes entre los dos años de estudio. Por otro lado, cabe mencionar que durante el año 2017 las plantas sufrieron heladas de considerable importancia, esto pudo condicionar los resultados obtenidos en dicho año. Esto sugiere que, en condiciones climáticas normales, la aplicación de magnesio foliar en su dosis M50 podría influir positivamente en el aumento del contenido de almidón.

IV.4.3. COMPARATIVA ENTRE VALORES DE ALMIDÓN Y PORCENTAJE DE PLANTA VIABLE

A partir de las plantas madre tratadas con las diferentes aplicaciones foliares de magnesio se produjo estaca y se cultivaron un total de 5700 plantas injertadas durante los dos años de estudio. En cuanto al número de plantas viables al final del ciclo productivo (**Figura 58**), se ha registrado un incremento de la viabilidad en aquellos lotes de plantas madre tratadas con magnesio foliar.



Tomando como referencia el número de plantas viables del tratamiento C, en 2015 para los tratamientos M50 y M150 se registró un incremento del 12,1% y del 9,1%; mientras que en 2017 el incremento fue del 4,0% y del 8,0%, respectivamente.

En la **Figura 59** se muestra el valor del contenido medio de almidón para cada uno de los tratamientos junto con el número de plantas viables.

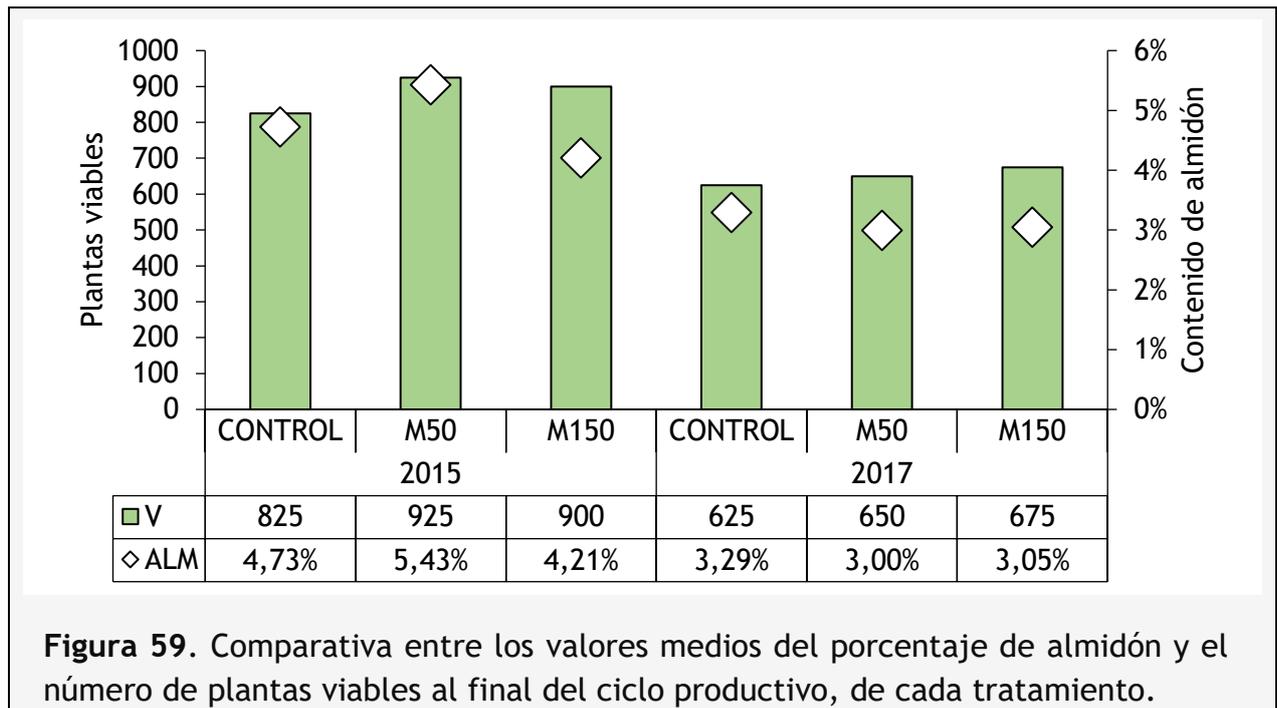


Figura 59. Comparativa entre los valores medios del porcentaje de almidón y el número de plantas viables al final del ciclo productivo, de cada tratamiento.

Aparentemente no existe una relación clara entre ambos valores, sin embargo, al realizar la correlación entre ellos se obtiene que el valor de dicha correlación es de 0,882, siendo ésta significativa con un valor $p = 0,02$ (alfa = 0,05) y un coeficiente de determinación (R^2) de 0,777 (Figura 60).

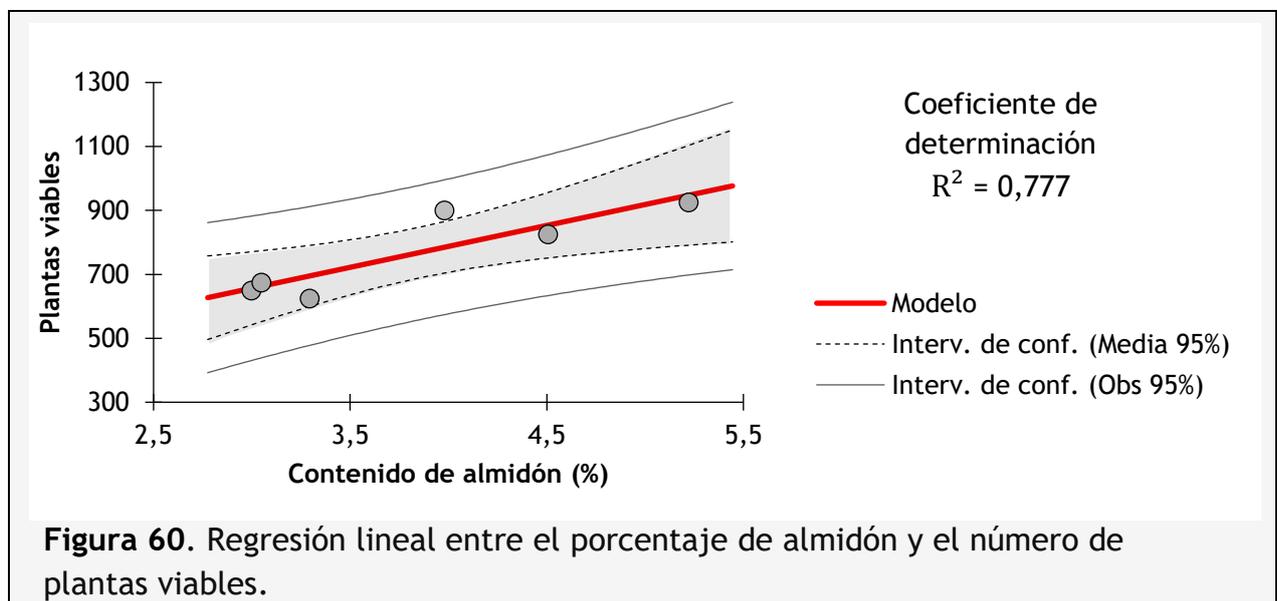


Figura 60. Regresión lineal entre el porcentaje de almidón y el número de plantas viables.

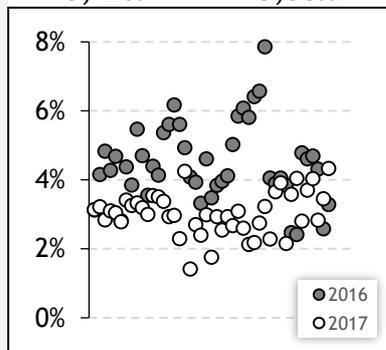
Esto indica que, en este caso concreto, el contenido de almidón puede explicar el 77,7% de la variabilidad del número de plantas viables.

IV.5. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE FERTILIZANTES EN EL SUELO SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN

Cabe mencionar que los análisis nutricionales del suelo en parada vegetativa no indicaron variaciones de los niveles de fósforo y potasio en ninguno de los tratamientos. En cuanto al material vegetal, tras procesar los sarmientos muestreados según el criterio CR1 (en base al análisis realizado en el capítulo IV, apartado 3.1), se procedió a su análisis, obteniéndose así el contenido medio de almidón de cada planta (Tabla 20). A continuación, se realizó un análisis de estos datos de partida para conocer sus estadísticos descriptivos (Tabla 21).

Tabla 20. Contenido medio de almidón de cada una de las plantas muestreadas (P2, P3, P4) de los diferentes tratamientos: difosfato amónico (DAP), cloruro potásico (KCl), y control (C); sus repeticiones (R1, R2, R3) y las diferentes dosis (D1, D2) planteadas.

	DAP		KCl		C	
	2016	2017	2016	2017	2016	2017
D1_R1_P2	4,69%	3,19%	5,85%	3,09%	3,12%	3,13%
D1_R1_P3	3,55%	2,99%	6,08%	2,60%	4,15%	3,22%
D1_R1_P4	4,39%	3,54%	5,81%	2,12%	4,83%	2,83%
D1_R2_P2	4,13%	3,50%	6,41%	2,18%	4,27%	3,09%
D1_R2_P3	5,37%	3,38%	6,56%	2,74%	4,68%	3,04%
D1_R2_P4	5,60%	2,93%	7,86%	3,22%	2,81%	2,78%
D1_R3_P2	6,17%	2,96%	4,04%	2,28%	4,37%	3,41%
D1_R3_P3	5,60%	2,29%	3,90%	3,65%	3,84%	3,26%
D1_R3_P4	4,93%	4,24%	4,05%	3,91%	5,47%	3,33%
D2_R1_P2	4,08%	1,41%	3,84%	2,15%		
D2_R1_P3	3,92%	2,70%	2,47%	3,57%		
D2_R1_P4	3,32%	2,39%	2,41%	4,04%		
D2_R2_P2	4,60%	2,98%	4,78%	2,80%		
D2_R2_P3	3,47%	1,76%	4,61%	3,70%		
D2_R2_P4	3,84%	2,93%	4,69%	4,03%		
D2_R3_P2	3,95%	2,54%	4,30%	2,82%		
D2_R3_P3	4,11%	2,93%	2,58%	3,45%		
D2_R3_P4	5,02%	2,67%	3,28%	4,32%		



De forma general, se observa cómo los valores de 2016 son claramente mayores a los de 2017, apreciándose en el último año más homogeneidad entre los valores de los diferentes tratamientos. Al analizar la diferencia entre los valores máximos, medios y mínimos registrados durante la duración del ensayo, se observa como los mayores descensos en el contenido de almidón se dieron en los tratamientos KCl1, DAP2 y DAP1, disminuyendo de media un 49%, 39% y 35%, respectivamente; el tratamiento control muestra un descenso medio del 25%. Con el tratamiento KCl2 se han obtenido resultados similares en ambas anualidades, siendo la diferencia media de un 6%. Además, sus valores máximos y mínimos también reflejan esta estabilidad, variando un 10% y un 11%, respectivamente (Tabla 22).

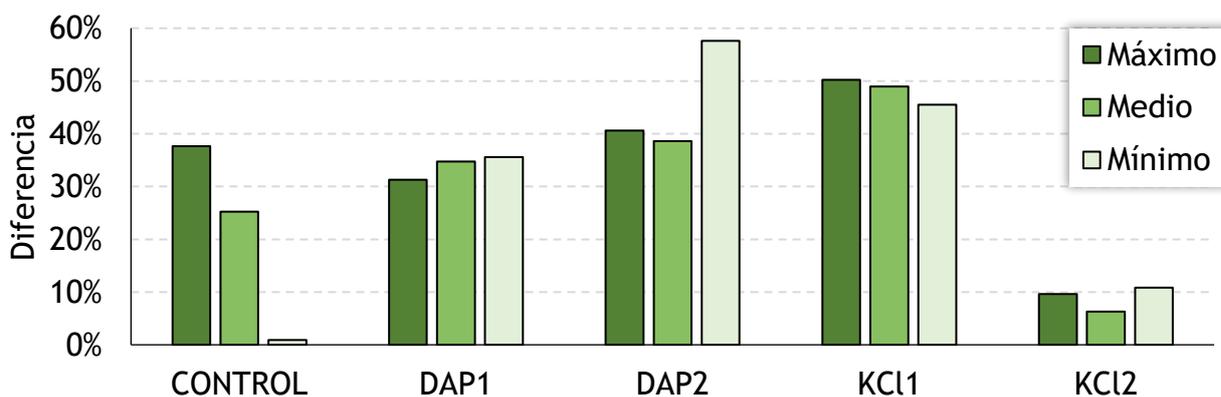
Tabla 21. Estadísticos descriptivos¹⁷ los valores medios de los tratamientos C, DAP1, DAP2, KCl1 y KCl2 durante los dos años de estudio: 2016 y 2017.

TRATAMIENTO		C_16	DAP1_16	DAP2_16	KCl1_16	KCl2_16
Nº de observaciones		9	9	9	9	9
TC	Media	4,17%	4,94%	4,03%	5,62%	3,66%
	E.E. de la media	0,28%	0,28%	0,17%	0,45%	0,33%
	Mediana	4,27%	4,93%	3,95%	5,85%	3,84%
	Moda	2,81%	5,60%	3,32%	3,90%	2,41%
	Suma	37,54%	44,43%	36,31%	50,56%	32,96%
DP	D.E.	0,83%	0,83%	0,52%	1,36%	1,00%
	Varianza	0,687	0,69	0,273	1,843	0,994
	Rango	2,66%	2,62%	1,70%	3,96%	2,37%
	Mínimo	2,81%	3,55%	3,32%	3,90%	2,41%
	Máximo	5,47%	6,17%	5,02%	7,86%	4,78%
DT	Asimetría	-0,311	-0,232	0,658	-0,008	-0,224
	E.E. de asimetría	0,717	0,717	0,717	0,717	0,717
	Curtosis	-0,164	-0,664	0,485	-0,83	-1,988
	E.E. de curtosis	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
TRATAMIENTO		C_17	DAP1_17	DAP2_17	KCl1_17	KCl2_17
Nº de observaciones		9	9	9	9	9
TC	Media	3,12%	3,22%	2,48%	2,87%	3,43%
	E.E. de la media	0,07%	0,18%	0,18%	0,22%	0,24%
	Mediana	3,13%	3,19%	2,67%	2,74%	3,57%
	Moda	2,78%	2,29%	2,93%	2,12%	2,15%
	Suma	28,09%	29,02%	22,31%	25,79%	30,88%
DP	D.E.	0,21%	0,54%	0,55%	0,65%	0,71%
	Varianza	0,046	0,29	0,302	0,417	0,503
	Rango	0,63%	1,95%	1,57%	1,79%	2,17%
	Mínimo	2,78%	2,29%	1,41%	2,12%	2,15%
	Máximo	3,41%	4,24%	2,98%	3,91%	4,32%
DT	Asimetría	-0,463	0,238	-1,227	0,429	-0,638
	E.E. de asimetría	0,717	0,717	0,717	0,717	0,717
	Curtosis	-0,696	1,361	0,493	-1,124	-0,456
	E.E. de curtosis	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

¹⁷ Agrupados en 3 bloques: tendencia central (TC), dispersión (DP) y distribución (DT).
(D.E.: Desviación estándar. E.E.: Error estándar).

Tabla 22. Diferencia entre los valores máximos, medios y mínimos de almidón registrados para cada uno de los tratamientos, durante los años 2016 y 2017.

	C			DAP1			DAP2			KCl1			KCl2		
	MAX	MED	MIN												
2016	5,47%	4,17%	2,81%	6,17%	4,94%	3,55%	5,02%	4,04%	3,32%	7,86%	5,62%	3,90%	4,78%	3,66%	2,41%
2017	3,41%	3,12%	2,78%	4,24%	3,22%	2,29%	2,98%	2,48%	1,41%	3,91%	2,87%	2,12%	4,32%	3,43%	2,15%
Dif.	38%	25%	1%	31%	35%	36%	41%	39%	58%	50%	49%	45%	10%	6%	11%



Tomando como referencia los valores medios del tratamiento C, se observa que, para ambas anualidades, los tratamientos DAP1 y DAP2 registraron valores medios superiores e inferiores, respectivamente. En el caso del tratamiento KCl1, se observa como el valor medio de almidón en 2016 fue muy superior al del tratamiento C, mientras que en 2017 fue inferior; por otro lado, los valores medios de almidón del tratamiento KCl2 en 2016 y 2017 se sitúan dentro del intervalo que forman los valores medios del tratamiento control.

Se realizó un análisis de la normalidad de los valores medios (Tabla 23) y una comprobación para conocer si las diferencias observadas entre ambos años eran significativas.

Tabla 23. Valores p resultantes del análisis de la normalidad de los valores medios de cada tratamiento en cada año de estudio.

Variable\Prueba	Shapiro-Wilk	Anderson-Darling	Lilliefors	Jarque-Bera
DAP1_A16	0,951	0,915	0,856	0,822
DAP1_A17	0,776	0,536	0,537	0,969
DAP2_A16	0,616	0,483	0,236	0,784
DAP2_A17	0,061	0,070	0,278	0,454
KCl1_A16	0,248	0,188	0,221	0,818
KCl1_A17	0,497	0,619	0,802	0,698
KCl2_A16	0,095	0,146	0,420	0,587
KCl2_A17	0,562	0,513	0,571	0,712
C_A16	0,885	0,802	0,758	0,871
C_A17	0,697	0,749	0,903	0,753

Para la interpretación de las diferentes pruebas de normalidad se plantean las siguientes hipótesis:

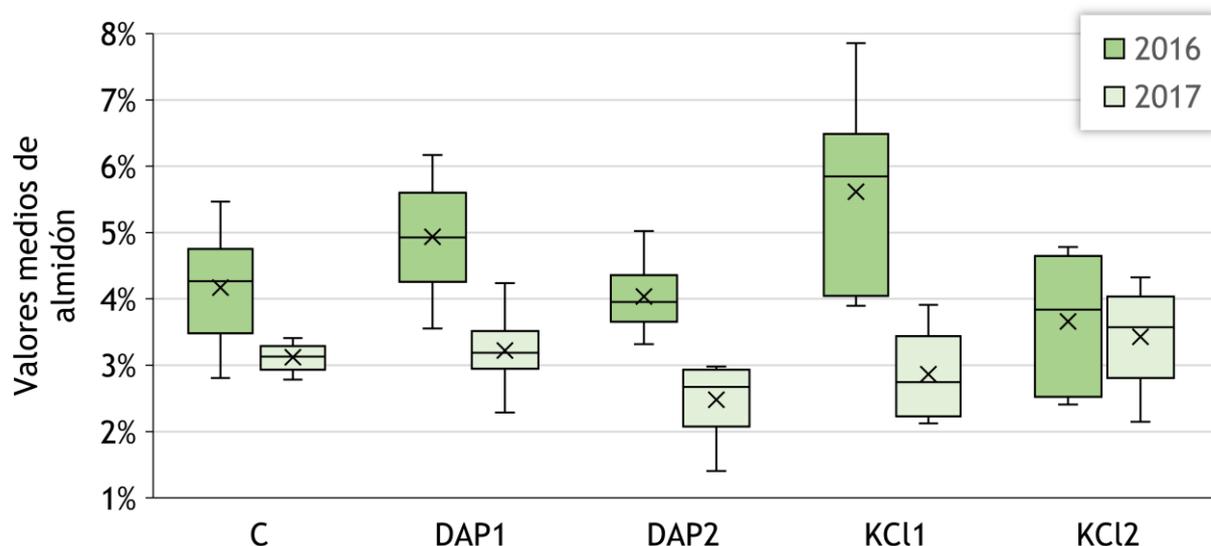
- H0: la variable de la cual se extrajo la muestra sigue una distribución Normal;
- Ha: la variable de la cual se extrajo la muestra no sigue una distribución Normal.

Dado que los valores p son superiores al nivel de significancia (alfa = 0,05), la hipótesis nula no se puede rechazar. Por lo tanto, los valores medios del contenido de almidón siguen una distribución Normal en todos los casos observados.

En base al resultado de las pruebas de normalidad, se aplicó la prueba de t de Student para determinar si existe una diferencia significativa entre los valores obtenidos para cada tratamiento durante los dos años de estudio (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados de la prueba de t de Student para determinar si la diferencia interanual de los valores medios de almidón de cada tratamiento es significativa. En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).

	C	DAP1	DAP2	KCl1	KCl2
Diferencia	0,011	0,017	0,016	0,028	0,002
t (Valor observado)	4,040	4,566	7,641	4,938	0,499
t (Valor crítico)	2,306	2,306	2,306	2,306	2,306
GL	8	8	8	8	8
valor-p (bilateral)	0,004	0,002	< 0,0001	0,001	0,631



En base a los resultados obtenidos, existen diferencias significativas entre los valores medios de almidón de todos los tratamientos, exceptuando el tratamiento KCl2. Estos resultados apuntan a que el tratamiento KCl2 puede aportar un nivel de almidón adecuado de forma más estable en el tiempo, sin que se aprecie una alteración en la cantidad almacenada por causas externas.

IV.6. RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ALMIDÓN EN PORTAINJERTOS Y LA MORTALIDAD EN PLANTA INJERTADA

El estudio comparativo se ha realizado durante 4 años (2014-2017). Se han utilizado los datos de 616 portainjertos, correspondientes a las variedades 110 R, 1103 P, 140 Ru y 41B M, procedentes de 13 zonas de cultivo diferentes (Z01-Z13). El total de datos se agrupa en 49 bloques (variedad de portainjerto + zona de procedencia), ya que para cada uno de ellos se dispone de la información relativa al porcentaje de mortalidad de planta injertada, como se recoge en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Datos de partida de las diferentes variedades de portainjertos, agrupados por zona de cultivo y año. Se muestra el valor medio del contenido de almidón (ALM) y porcentaje de mortalidad (MORT) al final del ciclo productivo.

BLOQUE	ALM	MORT	BLOQUE	ALM	MORT
41B M_Z03_14	7,89%	16%	110 R_Z10_15	2,73%	56%
41B M_Z05_15	4,14%	67%	110 R_Z01_16	4,46%	36%
41B M_Z07_15	1,84%	59%	110 R_Z03_16	5,80%	18%
41B M_Z01_16	3,48%	56%	110 R_Z04_16	4,94%	30%
41B M_Z03_16	4,55%	59%	110 R_Z07_16	5,27%	17%
41B M_Z07_16	5,94%	54%	110 R_Z09_16	5,57%	10%
41B M_Z08_16	4,34%	78%	110 R_Z11_16	3,20%	32%
41B M_Z12_16	3,59%	31%	110 R_Z12_16	4,60%	22%
41B M_Z13_16	3,72%	51%	110 R_Z13_16	5,42%	30%
41B M_Z03_17	4,04%	53%	110 R_Z03_17	4,08%	25%
1103 P_Z02_14	5,84%	8%	110 R_Z07_17	3,23%	30%
1103 P_Z07_15	4,33%	39%	110 R_Z09_17	4,30%	19%
1103 P_Z13_15	5,64%	33%	140 Ru_Z07_14	3,68%	46%
1103 P_Z13_16	5,94%	34%	140 Ru_Z09_14	7,90%	37%
1103 P_Z07_17	4,72%	55%	140 Ru_Z10_14	4,80%	47%
110 R_Z03_14	6,78%	26%	140 Ru_Z03_15	7,48%	26%
110 R_Z06_14	3,67%	21%	140 Ru_Z07_15	5,34%	24%
110 R_Z09_14	7,64%	31%	140 Ru_Z10_15	4,27%	47%
110 R_Z10_14	3,23%	44%	140 Ru_Z12_15	3,47%	39%
110 R_Z12_14	3,23%	26%	140 Ru_Z07_16	5,49%	17%
110 R_Z01_15	4,28%	41%	140 Ru_Z10_16	4,74%	52%
110 R_Z03_15	8,11%	21%	140 Ru_Z12_16	4,57%	32%
110 R_Z06_15	3,68%	34%	140 Ru_Z03_17	4,11%	29%
110 R_Z07_15	5,67%	30%	140 Ru_Z07_17	3,75%	36%
110 R_Z09_15	7,33%	23%			

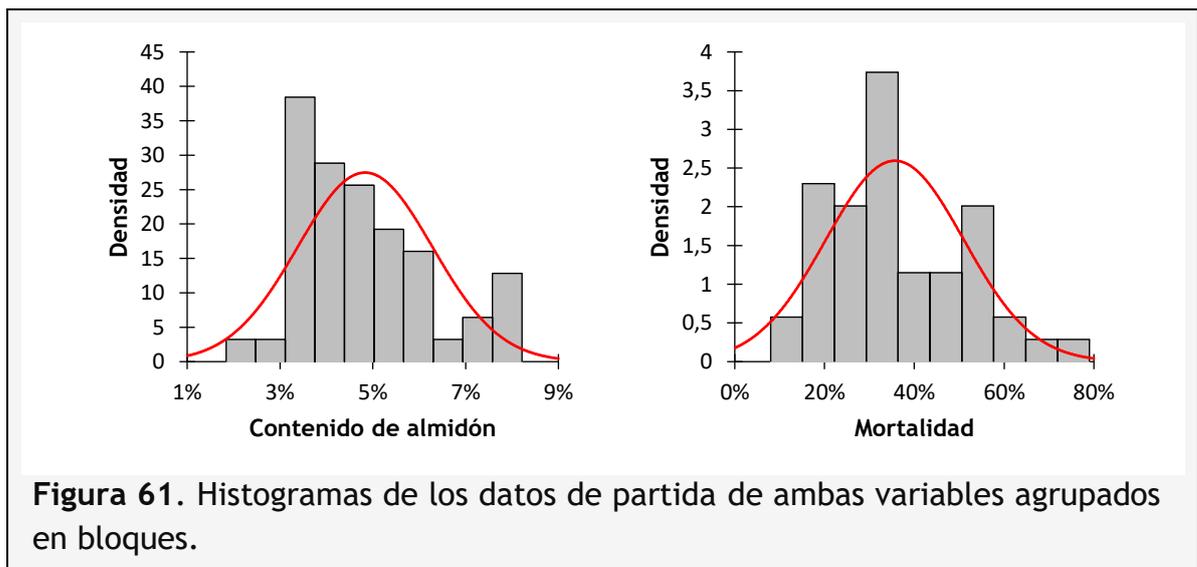
Se ha realizado un análisis de los datos de partida para conocer los estadísticos descriptivos (Tabla 26).

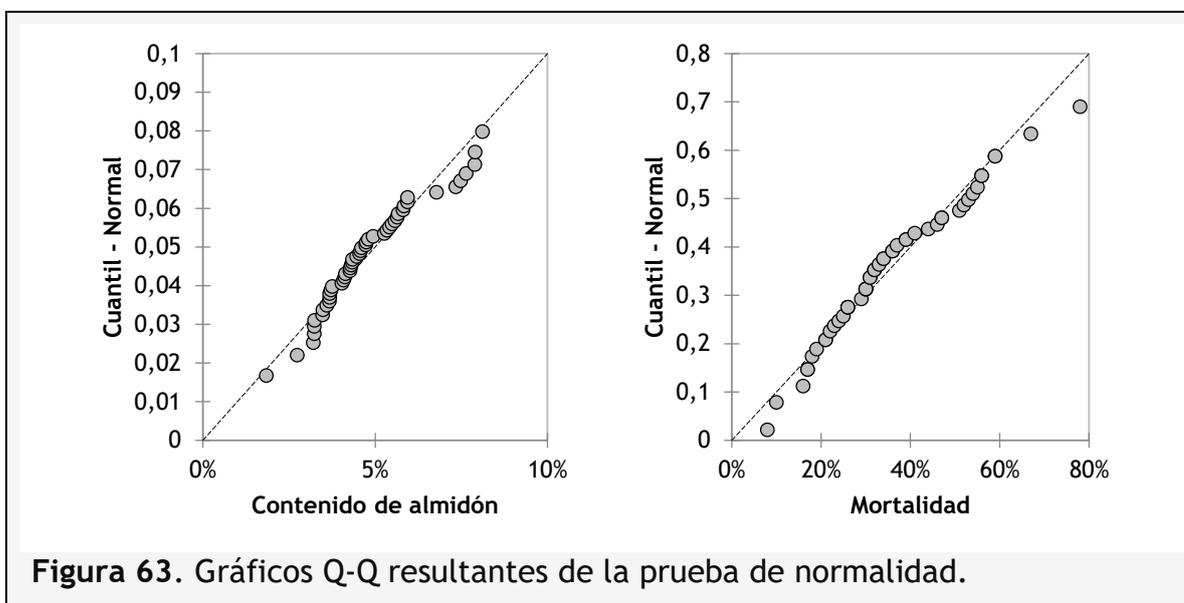
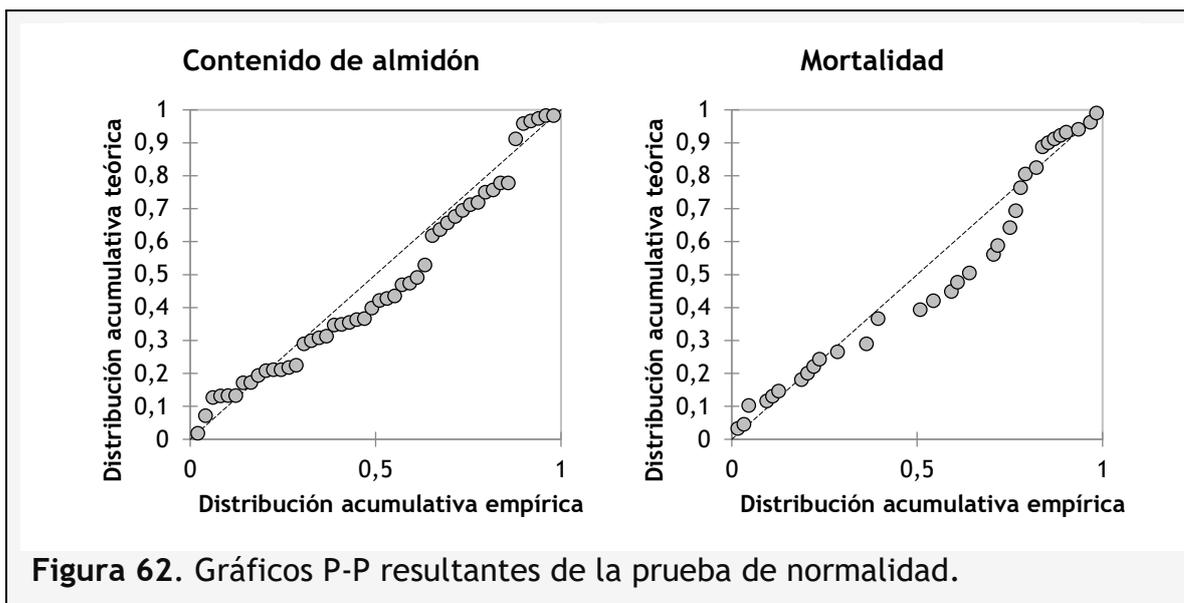
Tabla 26. Estadísticos descriptivos de los datos de partida: contenido de almidón y porcentaje de mortalidad.

		ALMIDÓN	MORTALIDAD
Número de observaciones		49	49
Tendencia central	Media	4,83 %	35,65 %
	Error estándar de la media	0,21	2,20
	Mediana	4,55 %	32,00 %
	Moda	1,84 %	30,00 %
	Suma	236,82 %	1747,00 %
Dispersión	Desviación estándar	1,45	15,38
	Varianza	2,11	236,44
	Rango	6,27	70,00
	Mínimo	1,84 %	8,00 %
	Máximo	8,11 %	78,00 %
Distribución	Asimetría	0,66	0,56
	Error estándar de asimetría	0,34	0,34
	Curtosis	0,03	-0,06
	Error estándar de curtosis	0,67	0,67

La comprobación del ajuste de los datos a una distribución Normal se ha realizado de dos formas: gráfica y numérica.

- **Comprobación gráfica**, mediante la elaboración de histogramas (Figura 61), gráficos de distribución normal P-P (Figura 62) y Q-Q (Figura 63).





En los histogramas se puede observar que los datos de ambas variables se concentran en la zona central, pero de forma asimétrica con una mayor acumulación en la parte izquierda. Por otro lado, los gráficos de normalidad P-P y Q-Q muestran como las observaciones se alinean de forma muy próxima a la diagonal con la que se identifica si los datos siguen una distribución Normal. Por lo tanto, el resultado del análisis gráfico de los datos, junto con el hecho de que el valor del estadístico “asimetría” es mayor a cero (Minitab, 2019), indica que los valores se ajustan a una distribución Normal, sesgada a la derecha.

- **Comprobación numérica**, mediante la aplicación de las pruebas de normalidad propuestas (Tabla 27) sobre los valores medios de los 49 bloques (contenido de almidón y porcentaje de mortalidad).

Tabla 27. Resultados de las pruebas de normalidad (valor p) para las variables contenido de almidón (ALM) y porcentaje de mortalidad (MORT). En azul: resultados inferiores al nivel de significancia (alfa = 0,05).

VARIABLE\PRUEBA	SHAPIRO-WILK	ANDERSON-DARLING	LILLIEFORS	JARQUE-BERA
ALM	0,019	0,011	0,072	0,183
MORT	0,181	0,111	0,113	0,289

Ambas pruebas de normalidad consideran las siguientes hipótesis:

- H0: La variable de la cual se extrajo la muestra sigue una distribución Normal.
- Ha: La variable de la cual se extrajo la muestra no sigue una distribución Normal.

Puesto que en la mayoría de los casos el valor p calculado es mayor que el nivel de significación, no pudiéndose rechazar la hipótesis nula H0, se considera que ambas variables siguen una distribución Normal. Dado que los datos siguen una distribución Normal, se ha realizado la prueba de correlación de Pearson para calcular la relación existente entre las dos variables, tanto para cada variedad de portainjertos (**Tabla 28**), como para todo el conjunto de datos (**Figura 64**).

Tabla 28. Correlación entre ambas variables para cada variedad de portainjerto.

	110 R	1103 P	140 Ru	41B M
Coef. de correlación:	-0,449	-0,642	-0,354	-0,518
Coef. de determinación (R ²):	0,201	0,412	0,125	0,268

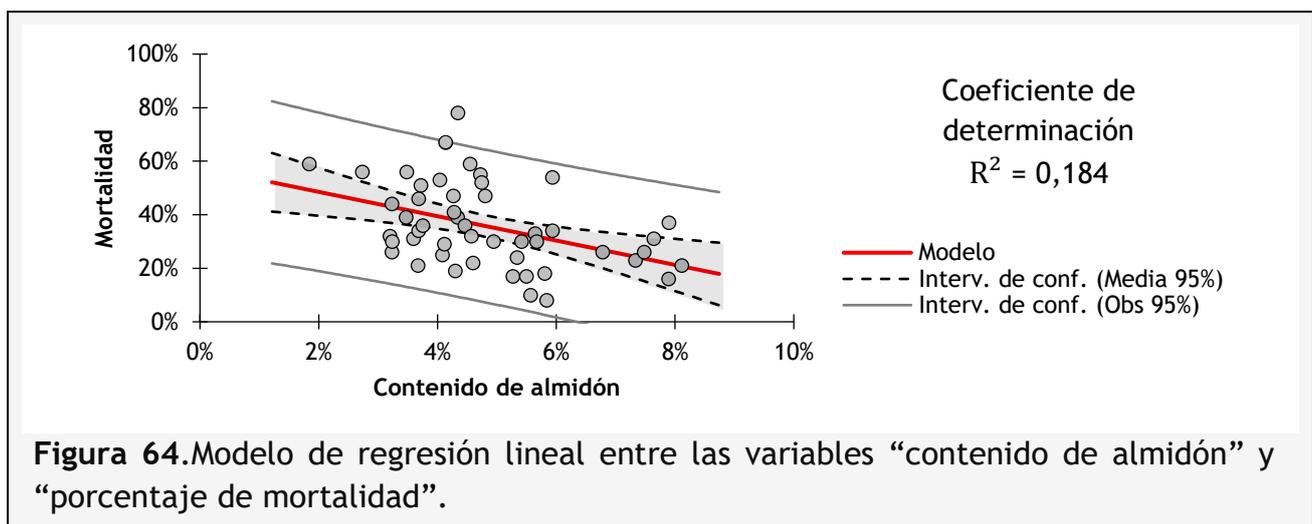


Figura 64. Modelo de regresión lineal entre las variables “contenido de almidón” y “porcentaje de mortalidad”.

El coeficiente de correlación de Pearson, para las 49 observaciones, es de -0,429, con un valor p igual a 0,002 y un coeficiente de determinación (R²) de 0,184. Por lo tanto, la variable “contenido de almidón” explica únicamente un 18,4 % de la variabilidad de la variable “porcentaje de mortalidad”.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

La mortalidad de injertos de vid una vez establecido el vivero en tierra es uno de los problemas más graves al que tienen que enfrentarse los viveros de plantas de vid a nivel mundial.

Se trata de un problema que lastra de manera muy importante el rendimiento económico de los viveros, puesto que la inversión y el coste económico de establecer en el suelo un injerto que va a fallar y el de otro que va a llegar a buen término es exactamente el mismo.

A pesar de la gravedad del problema el conocimiento que se tiene de las posibles causas que influyen en la alta mortalidad de injertos es escaso, más allá de tratar de apuntar o identificar algunas de las posibles causas entre las que se han apuntado las siguientes (Gramaje y Armengol, 2011):

- Causas de tipo biológico, sobre todo debidas al ataque de diferentes patógenos como nematodos, bacterias o hongos de madera de vid. En este sentido recientemente se ha visto que la aplicación de actinobacterias endofíticas y rizosféricas seleccionadas a los injertos en un paso previo a su establecimiento en tierra ha permitido en el caso de algunas cepas (cepa endofítica *Streptomyces* sp. VV/E1 y cepa rizosférica *Streptomyces* sp. VV/R4) lograr una significativa reducción en el número de hongos causantes de enfermedades de madera de vid que infectan la planta a través del aparato radicular.

Esta importante reducción en el número de hongos patógenos iba ligada a una notable disminución de los niveles de mortalidad, de tal forma que las posibilidades de supervivencia de los injertos inoculados con las cepas VV/E1 y VV/R4 eran 1,68 y 1,84 veces superiores respectivamente por comparación con plantas control no inoculadas (Álvarez-Pérez *et al.*, 2017). Estos datos sugieren que la infección de injertos por hongos causantes de enfermedades de madera de vid es un factor que tiene cierta influencia en los niveles de mortalidad observados.

- Causas debidas al manejo incorrecto del injerto, como inadecuada preparación del suelo, plantación incorrecta, irrigación inapropiada, y defectos o excesos de tipo nutricional, fallos en la realización física del injerto, etc.
- Por último, podemos reflejar la existencia de otras posibles causas intrínsecas al propio material vegetal como la existencia de incompatibilidades variedad-portainjerto o una posible deficiencia en los niveles de carbohidratos (almidón) presentes en el portainjerto.

Precisamente, esta Tesis Doctoral se plantea para tratar de determinar la posible influencia de los niveles de almidón almacenado en el portainjerto sobre el nivel de mortalidad de injertos en vivero.

A continuación, abordaremos la discusión de los diferentes aspectos abordados en este estudio con esta finalidad:

OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ENZIMÁTICO

Como hemos explicado anteriormente, y tomando como punto de partida el método descrito por Chow y Landhauser (2004) para la determinación de almidón en tejidos vegetales, se realizaron una serie de analíticas previas siguiendo ese protocolo al pie de la letra. Desafortunadamente los resultados eran siempre negativos, no detectándose almidón, o en niveles insignificantes en todas las muestras analizadas, lo cual era materialmente imposible.

En este sentido se realizó un considerable esfuerzo en adaptar el protocolo de partida a unas nuevas condiciones de ensayo que nos permitieran obtener resultados fiables.

La adaptación del método analítico de partida basado en la degradación enzimática de almidón tuvo como resultado una serie de mejoras que, en su conjunto, aumentaron la efectividad y fiabilidad del método en varios aspectos:

1. En la parte final de la fase de procesado del material vegetal se redujo drásticamente el tiempo necesario para procesar cada muestra, ya que éste se disminuyó en un 75% con respecto al modo de procesado utilizado inicialmente y, además, se disminuyó la granulometría en un 36%, mejorando las reacciones químicas y la utilización del material triturado en otros métodos analíticos.
2. La realización de 3 extracciones con KOH resultó ser el modo óptimo de asegurar la extracción de prácticamente la totalidad del almidón presente en el material vegetal, al alcanzarse una media de extracción del 99% de la cantidad de almidón presente en la muestra, como se indica en la **Tabla 10**.
3. Por último, se trabajó de manera considerable en el proceso de digestión enzimática del almidón extraído mediante KOH, realizándose básicamente dos tipos de modificaciones:
 - ~ se utilizó la enzima α -amilasa procedente de páncreas porcino por ser similar a α -amilasa procedente de *Bacillus licheniformis* y, al mismo tiempo, resulta más económica que la inicial;
 - ~ se desdobló el ensayo enzimático realizándose las digestiones con α -amilasa y amiloglucosidasa de forma secuencial, adaptando los parámetros de digestión a las condiciones óptimas para cada enzima.

Como resultado final se obtuvo un método analítico que, por un lado, se considera fiable ya que se mantienen las principales fases y procesos ya contrastados por Chow y Landhäuser (2004) y, por otro lado, el método obtenido fue adaptado tanto a las particularidades del material vegetal a analizar, como a las características específicas necesarias para desarrollar el método de análisis de almidón mediante FTIR.

En la práctica, el método descrito puede ser utilizado como una herramienta fiable para conocer el contenido de almidón presente en los portainjertos a injertar y, de esta forma, disponer de más información para realizar una toma de decisiones más fundamentada.

DESARROLLO DEL MÉTODO PREDICTIVO DEL CONTENIDO DE ALMIDÓN MEDIANTE FTIR Y PLS

El trabajo realizado en este caso tenía como principal objetivo disponer de un número elevado de muestras, analizadas previamente mediante el método enzimático, para poder integrar su valor del nivel de almidón con la información espectral y generar así una base de datos de partida que permitiese obtener una base de datos final robusta y válida para utilizarla en la calibración del método predictivo mediante la utilización de un análisis PLS.

Tomando como referencia para la validación del método el RMSEP, de las diferentes calibraciones generadas se llegó a obtener una con un RMSEP = 0,322, cuyo coeficiente de correlación fue de 0,9840, como se indica en la **Tabla 11**. Estos valores son similares a los observados en las modelizaciones realizadas por Lohumi *et al.* (2014) y considerablemente mejores a los obtenidos por Schmidtke *et al.*, (2012) y Sacithraa *et al.* (2013) en la validación de sus respectivos modelos de predicción.

Los resultados indican que, una vez elaborada una base de datos válida y usando el análisis estadístico PLS para la cuantificación, el método predictivo resultante proporciona la posibilidad de obtener información realista y rápida del nivel de almidón presente en los portainjertos. Dado que el método se apoya en una base de datos compuesta por muestras con características muy concretas, es adecuado verificar que el material a analizar es similar a la base de datos utilizada en la cuantificación.

En caso de que el material a analizar difiera considerablemente del utilizado para elaborar la base de datos, es recomendable realizar los ajustes necesarios en la base de datos de partida: adición de nuevas muestras o bien, la realización de una base de datos nueva que se adecúe a la naturaleza y particularidades de la muestra a analizar.

Además, cabe recordar que el material vegetal en el que se realizan las lecturas es tremendamente complejo, por lo que existe la posibilidad de optimizar el método desarrollado, por ejemplo, aplicando técnicas de deconvolución del espectro infrarrojo

(Pourfarzad *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016) de cada muestra, con el objetivo de obtener valores más precisos y reproducibles.

COMPARATIVA ENTRE AMBOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Tras los numerosos análisis realizados, tanto por el método enzimático optimizado, como por el método de espectroscopía infrarroja una vez desarrollado y validado, se observó cómo, en la mayoría de los casos, los valores medios de almidón obtenidos mediante el análisis por FTIR eran más elevados que los obtenidos por la vía enzimática, como muestra la **Figura 52**.

A nivel global, el estudio muestra la existencia de una tendencia similar en los resultados obtenidos durante el periodo que ha durado la investigación, independientemente del método analítico utilizado, como se puede observar en la **Figura 53**.

Esto sugiere la validez y la complementariedad de ambos métodos, así como la posibilidad de utilizar el método FTIR como sustituto del método enzimático, tal y como indican Saliba y Ferreira (2010), siempre y cuando se elaboren bases de datos representativas del material vegetal a analizar.

Cabe mencionar que, a nivel varietal, los resultados obtenidos para cada una de las variedades de portainjerto, recogidos en la **Figura 53**, muestran unas tendencias diferentes entre sí: siendo éstas similares a la tendencia global en la mayoría de los casos, pero mostrando claras discrepancias en otros. Por este motivo, sería adecuado obtener más información a nivel varietal para poder verificar los resultados obtenidos y disponer de un perfil más detallado de cada uno de los portainjertos estudiados.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE MAGNESIO FOLIAR SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN

Durante el desarrollo del ensayo se observó que era necesario plantear un criterio de muestreo del material vegetal con el que poder obtener información realista sin analizar la totalidad del sarmiento. El análisis de los datos, cuyos resultados se recogen en la **Tabla 15**, indicó que la forma de optimizar esta tarea de muestreo consistió en dividir el sarmiento en 3 zonas proporcionales formadas de segmentos de 40 cm, analizando únicamente los segmentos de los extremos de cada zona.

En cuanto al nivel de almidón almacenado en el sarmiento en función del tratamiento de magnesio foliar aplicado, se observaron indicios de su posible efecto positivo sobre un aumento del contenido de almidón, pero estadísticamente no se puede establecer una relación, como indica la **Tabla 19**. Dado que únicamente se han obtenido datos durante dos años, sería adecuado ampliar la duración del ensayo y el número de

repeticiones, con el fin de evitar pérdida de información, por ejemplo, a causa de condiciones meteorológicas adversas u otras causas de mortandad.

Cabe mencionar que los niveles medios de almidón siempre se mantuvieron en valores considerados como adecuados ya que fueron similares a los observados por Smith y Holzapfel (2014) en plantas sanas de vid, por lo que se consideraron como niveles aptos para el correcto desarrollo del injerto. Sería interesante plantear diferentes ensayos con los que poder identificar el nivel mínimo de almidón almacenado para que un portainjerto garantizase un injerto viable.

Por otro lado, los lotes de plantas tratadas con magnesio foliar mostraron un porcentaje de viabilidad superior, observándose una correlación considerable ($R^2 = 0,777$). Esto sugiere que la aplicación de magnesio foliar sobre las plantas madre puede ocasionar un beneficio a largo plazo, observable al final del ciclo productivo en forma de un aumento del porcentaje de planta viable disponible para su implantación en campo. Dado que los datos provienen únicamente de dos anualidades, sería conveniente continuar el estudio para validar los datos obtenidos y ampliar el diseño experimental con más variedades de portainjertos.

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE FERTILIZANTES EN EL SUELO SOBRE EL NIVEL DE ALMIDÓN

Tal y como se indica en los resultados recogidos en la **Tabla 22** y en la **Tabla 24**, tan solo la dosis de 250 kg/ha de cloruro potásico ha mantenido una tendencia significativamente similar durante los dos años de estudio, es decir, ha permitido que los niveles de almidón almacenados se situasen en valores adecuados, sin que existan evidencias de que estos valores se hayan visto alterados por otras variables como, por ejemplo, las condiciones climáticas adversas. Por el contrario, el resto de los tratamientos muestran una gran diferencia entre los valores medios de almidón registrados en ambos años de estudio. Esto puede sugerir que las dosis ensayadas no son las adecuadas para promover el almacenamiento de la cantidad adecuada de almidón.

Estos resultados concuerdan en cierta medida con los resultados obtenidos por Radulov *et al.* (2012), en los que indican que altas dosis de potasio y fósforo incrementan el contenido de almidón del maíz, cuando se realiza una fertilización nitrogenada leve. Además, las observaciones de Licina y Markovic (2002), en las que se indica que una dosis de fertilizante de 150 kg/ha de K_2O mostró efectos visibles en el nivel de potasio disponible en el suelo y fácilmente asimilable por las plantas. Por lo tanto, la fertilización con una dosis elevada de KCl puede cubrir la alta cantidad de potasio (Ganeshamurthy y Patil, 2011) demandada por la planta de vid, necesaria para llevar a cabo la síntesis de almidón (Shabala *et al.*, 2017), entre otros muchos procesos.

Este indicio podría resultar de gran utilidad para diseñar un plan de fertilización del cultivo con el que asegurar que los sarmientos de plantas madre produzcan y almacenen la mayor cantidad de almidón posible, aumentando así las garantías de viabilidad de las futuras plantas injertadas. Para verificar estos resultados y optimizar la dosis idónea, sería adecuado recabar más información al respecto.

RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE ALMIDÓN EN PORTAINJERTOS Y LA MORTALIDAD EN PLANTA INJERTADA

Los resultados del estudio detallado de los datos de contenido de almidón y porcentaje de mortalidad de 4 variedades diferentes de portainjertos durante 4 años, recogidos en la **Tabla 28** y en la **Figura 64**, muestran una correlación media en el caso de las variedades 1103 P y 41B M, y una correlación débil para las variedades 110 R y 140 Ru. A nivel global, la correlación entre el contenido de almidón y el porcentaje de mortalidad es débil ($R^2 = -0,184$).

Por un lado, la existencia de una correlación indirecta valida la hipótesis inicial, en la que se planteaba que la presencia de una mayor cantidad de almidón en el portainjerto produciría una disminución del porcentaje de mortalidad; y, por otro lado, el hecho de que la correlación existente sea débil sugiere la existencia de múltiples condicionantes que afectan de forma directa sobre la viabilidad de la planta final, independientemente de la cantidad de almidón almacenada inicialmente.

Sería necesario estudiar de forma pormenorizada cada una de las fases del proceso de producción para determinar los puntos críticos del mismo como, por ejemplo, la formación de una unión duradera durante la callogénesis en función de la variedad a injertar (Köse *et al.*, 2015), o el correcto desarrollo radicular de la planta injertada en su primera implantación en campo.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

A continuación, se detallan las conclusiones extraídas de los diferentes trabajos de investigación realizados durante la duración de la tesis.

OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS ENZIMÁTICO

1. A fin de optimizar la extracción y extraer la mayor cantidad de almidón presente en las muestras vegetales analizadas es necesario realizar 3 extracciones sucesivas con KOH.
2. El método enzimático desarrollado ofrece una alta fiabilidad y repetitividad en detrimento de la rapidez: un lote de 30 muestras requiere un periodo de una semana para su procesado.

DESARROLLO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS MEDIANTE FTIR-ATR

3. La fase de triturado del material vegetal y su homogeneización es vital para obtener información espectral válida para la cuantificación.
4. Mediante el análisis PLS de la información espectral sin alterar, se obtiene una predicción realista del contenido de almidón.
5. Tras generar una base de datos robusta, la cuantificación de nuevas muestras se realiza el doble de rápido, en comparación con el método enzimático: 3 días para el procesado del material vegetal y 5 minutos, de media, para la lectura y cuantificación.

COMPARATIVA ENTRE AMBOS MÉTODOS ANALÍTICOS

6. Generalmente, el método de análisis por FTIR predijo un porcentaje medio de almidón mayor al valor medio de almidón obtenido mediante el método enzimático.
7. A nivel global, se observó cierta similitud entre los valores obtenidos por ambos métodos analíticos, durante los 5 años de estudio.

ENSAYOS PARA EL AUMENTO DE LA CANTIDAD DE ALMIDÓN

Fertilización edáfica

8. La dosis de 250 kg/ha de cloruro potásico, al contrario que el resto de los tratamientos ha mantenido el contenido de almidón en valores similares durante la duración del ensayo.

Fertilización foliar

9. Ninguno de los tratamientos ha promovido un claro aumento de la cantidad de almidón.

RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE ALMIDÓN Y EL PORCENTAJE DE MORTALIDAD

Fertilización foliar y planta injertada

10. El porcentaje de plantas viables ha sido más elevado en los lotes tratados con magnesio foliar.
11. La correlación entre las plantas viables y el contenido de almidón es considerable.

Proceso real de producción de planta injertada

12. El análisis de la correlación entre el nivel de almidón y la mortalidad para cada una de las variedades estudiadas es medio-débil.
13. En su conjunto, el porcentaje de almidón llega a explicar únicamente el 18% del porcentaje de mortalidad, siendo su correlación indirecta.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi, H. y Molin, P. (2007) "Lilliefors/Van Soest's test of normality", en Salkind, N. (ed.) *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Thousand Oaks (CA): Sage, pp. 540-544.
- Addinsoft (2019) *XLSTAT statistical and data analysis solution (Versión 2019.2.1) [Programa de ordenador]*. Disponible en: <https://www.xlstat.com> (Accedido: 28 de junio de 2019).
- Alonso-Simón, A., Encina, A. E., García-Angulo, P., Álvarez, J. M. y Acebes, J. L. (2004) "FTIR spectroscopy monitoring of cell wall modifications during the habituation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) callus cultures to dichlobenil", *Plant Science*, 167(6), pp. 1273-1281.
- Alonso-Simón, A., García-Angulo, P., Mérida, H., Encina, A., Álvarez, J. M. y Acebes, J. L. (2011) "The use of FTIR spectroscopy to monitor modifications in plant cell wall architecture caused by cellulose biosynthesis inhibitors", *Plant signaling & behavior*, 6(8), pp. 1104-1110.
- Álvarez-Pérez, J. M., González-García, S., Cobos, R., Olego, M. Á., Ibañez, A., Díez-Galán, A., Garzón-Jimeno, E. y Coque, J. J. R. (2017) "Use of endophytic and rhizosphere actinobacteria from grapevine plants to reduce nursery fungal graft infections that lead to young grapevine decline", *Applied and Environmental Microbiology*, 83(24), pp. e01564-17.
- Amat Rodrigo, J. (2016) *T-test: Comparación de medias poblacionales independientes*. Disponible en: https://www.cienciadedatos.net/documentos/12_t-test (Accedido: 20 de agosto de 2019).
- Amat Rodrigo, J. (2017) *Test de Wilcoxon-Mann-Whitney como alternativa al t-test*. Disponible en: https://www.cienciadedatos.net/documentos/17_mann-whitney_u_test (Accedido: 20 de agosto de 2019).
- Amir, R. M., Anjum, F. M., Khan, M. I., Khan, M. R., Pasha, I. y Nadeem, M. (2013) "Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties", *Journal of Food Science and Technology*, 50(5), pp. 1018-1023.
- Arnon, D. I. y Stout, P. R. (1939) "The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper", *Plant Physiology*, 14(2), pp. 371-375.
- Avigad, G. y Dey, P. M. (1997) "Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates", en Dey, P. M. y Harborne, J. B. (eds.) *Plant Biochemistry*. Londres: Academic Press, pp. 143-204.

- Barceló Coll, J., Nicolás Rodrigo, G., Sabater García, B. y Sánchez Tamés, R. (2001) *Fisiología vegetal*. Madrid: Ediciones Pirámide.
- Barón López, F. J. (2019) *Diferencias que presenta una variable numérica entre dos grupos*. Disponible en: <https://www.bioestadistica.uma.es/apuntesMaster/diferencias-que-presenta-una-variable-numerica-entre-dos-grupos.html> (Accedido: 21 de agosto de 2019).
- Barrio Castro, T. del, Clar López, M. y Suriñach Caralt, J. (2013) *Incumplimiento de las hipótesis básicas en el término de error*. Módulo didáctico. Universidad Abierta de Cataluña.
- Basha, S. M. (1992) "Soluble sugar composition of peanut seed", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(5), pp. 780-783.
- BBCH (2001) *Growth stages of mono-and dicotyledonous plants*. 2.^a ed. Editado por U. Meier. Berlin: Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry.
- Bellasio, C., Fini, A. y Ferrini, F. (2014) "Evaluation of a High Throughput Starch Analysis Optimised for Wood", *PLOS ONE*, 9(2), p. e86645.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. (2008) *Bioquímica*. 6.^a ed. Barcelona: Editorial Reverté.
- Bobadilla, J., Gómez, P. y Bernal, J. (1999) "La transformada de Fourier. Una visión pedagógica", *Estudios de fonética experimental*, 10, pp. 41-74.
- Bonilla, I. (2000) "Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales", en Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 83-98.
- Bowyer, J. R. y Leegood, R. C. (1997) "Photosynthesis", en Dey, P. M. y Harborne, J. B. (eds.) *Plant Biochemistry*. Londres: Academic Press, pp. 49-110.
- Buysse, J. y Merckx, R. (1993) "An Improved Colorimetric Method to Quantify Sugar Content of Plant Tissue", *Journal of Experimental Botany*, 44(10), pp. 1627-1629.
- Capron, I., Robert, P., Colonna, P., Brogly, M. y Planchot, V. (2007) "Starch in rubbery and glassy states by FTIR spectroscopy", *Carbohydrate Polymers*, 68(2), pp. 249-259.
- Chen, H., Ferrari, C., Angiuli, M., Yao, J., Raspi, C. y Bramanti, E. (2010) "Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis", *Carbohydrate Polymers*, 82(3), pp. 772-778.
- Chomé Fuster, P. M., Sotés Ruiz, V., Benayas y Sainz de Rozas, F., Cayuela González, M., Hernández Sánchez, M., Cabello Sáenz de Santa María, F., Ortiz Marcide, J., Rodríguez Torres, I. y Chaves Rabanal, J. (2006) *Varietades de vid: registro de variedades comerciales*. 2.^a ed. Madrid: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

- Chow, P. S. y Landhäusser, S. M. (2004) "A method for routine measurements of total sugar and starch content in woody plant tissues", *Tree Physiology*, 24(10), pp. 1129-1136.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H. y Tang, M. C. (2009) "Form and functionality of starch", *Food Hydrocolloids*, 23(6), pp. 1527-1534.
- Dickson, R. E. (1979) "Analytical Procedures for the Sequential Extraction of ¹⁴C-Labeled Constituents from Leaves, Bark and Wood of Cottonwood Plants", *Physiologia Plantarum*, 45(4), pp. 480-488.
- Dry, P. R. y Coombe, B. G. (2005) *Viticulture. Volume 1: Resources*. 2.^a ed. Adelaide: Winetitles.
- Elster, A. D. (2018) *Questions and Answers in Magnetic Resonance Imaging. Fourier Transform*. Disponible en: <http://mriquestions.com/fourier-transform-ft.html> (Accedido: 25 de febrero de 2019).
- Engels, C. y Marschner, H. (1995) "Plant Uptake and Utilization of Nitrogen", en Bacon, P. E. (ed.) *Nitrogen Fertilization in the Environment*. Sydney: Woodlots & Wetlands, pp. 41-82.
- España (2003) "Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino", *Boletín Oficial del Estado*, 11 de julio de 2003, (165), pp. 27165-27179.
- España (2018) "Real Decreto 1338/2018, de 29 de octubre, por el que se regula el potencial de producción vitícola", *Boletín Oficial del Estado*, 30 de octubre de 2018, (262), pp. 104825-104885.
- Ganeshamurthy, A. N. y Patil, P. (2011) "Potassium nutrition on yield and quality of fruit crops with special emphasis on banana and grapes", *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 24(1), pp. 29-38.
- Gárate, A. y Bonilla, I. (2000) "Nutrición mineral y producción vegetal", en Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 113-130.
- García Luis, A. y Guardiola, J. L. (2000) "Transporte en el floema", en Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 65-82.
- Gomez, L., Rubio, E. y Augé, M. (2002) "A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(4), pp. 360-369.
- Gott, B., Barton, H., Samuel, D. y Torrence, R. (2006) "Biology of starch", en Torrence, R. y Barton, H. (eds.) *Ancient starch research*. Walnut Creek, CA: Left Coast Press, pp. 35-45.

- Gramaje, D. y Armengol, J. (2011) "Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies", *Plant Disease*, 95(9), pp. 1040-1055.
- Guraya, H. S. y Toledo, R. T. (1993) "Determining Gelatinized Starch in a Dry Starchy Product", *Journal of Food Science*, 58(4), pp. 888-889.
- Henrique, C. M., Teófilo, R. F., Sabino, L., Ferreira, M. M. C. y Cereda, M. P. (2007) "Classification of Cassava Starch Films by Physicochemical Properties and Water Vapor Permeability Quantification by FTIR and PLS", *Journal of Food Science*, 72(4), pp. 184-189.
- Hermans, C., Hammond, J. P., White, P. J. y Verbruggen, N. (2006) "How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation?", *Trends in Plant Science*, 11(12), pp. 610-617.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C. y del Pilar Baptista Lucio, M. (2010) *Metodología de la investigación*. 5.^a ed. México: McGraw-Hill Interamericana editores.
- Holder, B. H. (2012) *Characterization of Starch by Vibrational Spectroscopy, Dissertations, Theses, & Student Research in Food Science and Technology*. Tesis doctoral. University of Nebraska.
- Holzappel, B. P., Smith, J. P., Field, S. K. y Hardie, W. J. (2010) "Dynamics of Carbohydrate Reserves in Cultivated Grapevines", en Janick, J. (ed.) *Horticultural Reviews*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, pp. 143-211.
- IBM (2014) *Valores atípicos*, IBM Knowledge Center. Disponible en: https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/es/SS3RA7_sub/modeler_mainhelp_client_ddita/components/dt/ts_outliers_overview.html (Accedido: 20 de junio de 2019).
- IBM (2016) *IBM SPSS Statistics (Versión 24.0.0.1) [Programa de ordenador]*. Armonk: IBM.
- Institute for Genomics and Bioinformatics - Graz University of Technology (2006) *Cross-Validation Explained*. Disponible en: <http://genome.tugraz.at/proclassify/help/pages/XV.html> (Accedido: 19 de junio de 2019).
- Jääskeläinen, A.-S., Nuopponen, M., Axelsson, P., Tenhunen, M., Löija, M. y Vuorinen, T. (2003) "Determination of lignin distribution in pulps by FTIR ATR spectroscopy", *Journal of Pulp and Paper Science*, 29(10), pp. 328-331.
- Jenkins, P. J. y Donald, A. M. (1995) "The influence of amylose on starch granule structure", *International Journal of Biological Macromolecules*, 17(6), pp. 315-321.
- Keller, M. (2015) *The Science of Grapevines. Anatomy and Physiology*. 2.^a ed. Londres: Academic Press.

- Khan Academy (2019) *El ciclo de Calvin*. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/photosynthesis-in-plants/the-calvin-cycle-reactions/a/calvin-cycle> (Accedido: 25 de abril de 2019).
- Kizil, R., Irudayaraj, J. y Seetharaman, K. (2002) "Characterization of Irradiated Starches by Using FT-Raman and FTIR Spectroscopy", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), pp. 3912-3918.
- Köse, B., Çelik, H. y Karabulut, B. (2015) "Determination of callusing performance and vine sapling characteristics on different rootstocks of 'Merzifon Karası' grape variety (*Vitis vinifera* L.)", *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, 30(2), p. 87-94.
- Lacointe, A., Kajji, A., Daudet, F.-A., Archer, P., Frossard, J.-S., Saint-Joanis, B. y Vandame, M. (1993) "Mobilization of carbon reserves in young walnut trees", *Acta Botanica Gallica*, 140(4), pp. 435-441.
- Largo-Gosens, A., Hernández-Altamirano, M., García-Calvo, L., Alonso-Simón, A., Álvarez, J. y Acebes, J. L. (2014) "Fourier transform mid infrared spectroscopy applications for monitoring the structural plasticity of plant cell walls", *Frontiers in Plant Science*, 5(303), pp. 1-15.
- Larrea, A. (1950) *Vides americanas portainjertos*. Editado por Ministerio de Agricultura y Sindicato Nacional de la Vid Cervezas y Bebidas. Madrid: Ministerio de Agricultura.
- Lee, E. Y. C. y Whelan, W. J. (1971) "7 Glycogen and Starch Debranching Enzymes", en Boyer, P. D. (ed.) *The Enzymes*. Burlington: Elsevier, pp. 191-234.
- Licina, V. y Markovic, N. (2002) "Effect of potassium fertilization on its available and fixed content in vineyard soil", *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 47(1), pp. 37-44.
- Leroux, O. (2012) "Collenchyma: a versatile mechanical tissue with dynamic cell walls", *Annals of Botany*, 110(6), pp. 1083-1098.
- Lohumi, S., Lee, S., Lee, W.-H., Kim, M. S., Mo, C., Bae, H. y Cho, B.-K. (2014) "Detection of Starch Adulteration in Onion Powder by FT-NIR and FT-IR Spectroscopy", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(38), pp. 9246-9251.
- Lopez, F. B. y Barclay, G. F. (2017) "Plant Anatomy and Physiology", en Badal, S. y Delgoda, R. (eds.) *Pharmacognosy. Fundamentals, Applications and Strategies*. San Diego, CA: Elsevier Science, pp. 45-60.
- Macy, R. (1976) *Química orgánica simplificada*. Barcelona: Editorial Reverté.
- McDonald, A. (2005a) *Amylo-a-1,6-glucosidase*, *ExplorEnz - The Enzyme Database*. Disponible en: <http://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.33> (Accedido: 2 de febrero de 2019).

- McDonald, A. (2005b) *a-amylase*, *ExplorEnz - The Enzyme Database*. Disponible en: <http://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.1> (Accedido: 2 de febrero de 2019).
- McDonald, A. G., Boyce, S. y Tipton, K. F. (2009) "ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list", *Nucleic Acids Research*, 37(1), pp. 593-597.
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. A. (2016) *Tejidos vegetales. Protección*, *Atlas de Histología Animal y Vegetal*. Disponible en: http://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guiana_v_proteccion.php (Accedido: 30 de mayo de 2019).
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. A. (2018) *Tejidos vegetales. Parénquima*, *Atlas de Histología Animal y Vegetal*. Disponible en: https://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guiana_v_parenquima.php (Accedido: 16 de enero de 2019).
- Megías, M., Molist, P. y Pombal, M. A. (2019) *Tejidos vegetales. Meristemas. Cámbium vascular*, *Atlas de Histología Animal y Vegetal*. Disponible en: https://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/v-imagenes-grandes/cambium_vascular.php (Accedido: 20 de marzo de 2019).
- MERCK (2019) *Enzymatic Assay of Amyloglucosidase (EC 3.2.1.3)*. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/enzymatic-assay-of-amyloglucosidase.html> (Accedido: 16 de octubre de 2019).
- Microsoft (2019) *Microsoft Excel 2019 (Versión 1908) [Programa de ordenador]*. Redmond: Microsoft.
- Minitab (2019) *Cómo la asimetría y la curtosis afectan la distribución. Soporte Minitab 18*. Disponible en: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/data-concepts/how-skewness-and-kurtosis-affect-your-distribution/> (Accedido: 3 de julio de 2019).
- Mohd Razali, N. y Bee Wah, Y. (2011) "Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests", *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), pp. 21-33.
- National Center for Biotechnology Information (2019a) *PubChem Compound Database. Fructose-6-phosphate, CID=69507*. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/69507> (Accedido: 30 de enero de 2019).
- National Center for Biotechnology Information (2019b) *PubChem Compound Database. Sucrose, CID=5988*. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5988> (Accedido: 30 de enero de 2019).
- National Center for Biotechnology Information (2019c) *PubChem Database. Amylopectin, CID=439207*. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439207> (Accedido: 31 de enero de 2019).

National Center for Biotechnology Information (2019d) *PubChem Database. Amylose*, CID=192826. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/192826> (Accedido: 31 de enero de 2019).

National Center for Biotechnology Information (2019e) *PubChem Database. Glucose-6-phosphate*, CID=439958. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439958> (Accedido: 31 de enero de 2019).

NIST/SEMATECH (2013a) *Anderson-Darling and Shapiro-Wilk tests. e-Handbook of Statistical Methods*. Disponible en: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/prc/section2/prc213.htm> (Accedido: 21 de agosto de 2019).

NIST/SEMATECH (2013b) *Anderson-Darling Test. e-Handbook of Statistical Methods*. Disponible en: <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35e.htm> (Accedido: 20 de agosto de 2019).

Olego, M. A., Coque, J. J. R. y Garzón Jimeno, E. (2014) "Application of sugar foam to vineyard acid soils under Mediterranean conditions", *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), pp. 178-184.

OpenStax (2019) *Using Light Energy to Make Organic Molecules*. Disponible en: <https://cnx.org/contents/NrNGneVh@8/Using-Light-Energy-to-Make-Organic-Molecules> (Accedido: 30 de mayo de 2019).

Pedrosa, I., Juarros-Basterretxea, J., Robles-Fernández, A., Basteiro, J. y García-Cueto, E. (2015) "Pruebas de bondad de ajuste en distribuciones simétricas, ¿qué estadístico utilizar?", *Universitas Psychologica*, 14(1), pp. 245-254.

PIKE Technologies (2018) *ATR - Theory and Applications*. Dossier técnico.

Piqueras Haba, J. (2005) "La filoxera en España y su difusión espacial: 1878-1926", *Cuadernos de Geografía*, 77, pp. 101-136.

Pourfarzad, A., Habibi Najafi, M. B., Haddad Khodaparast, M. H. y Khayyat, M. H. (2015) "Serish inulin and wheat biopolymers interactions in model systems as a basis for understanding the impact of inulin on bread properties: a FTIR investigation", *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), pp. 7964-7973.

Radulov, I., Berbecea, A., Crista, F., Lato, A. y Sala, F. (2012) "Mineral Fertilization Effect on Soil Potassium and Corn Quality and Yield", *Research Journal of Agricultural Science*, 44(3), pp. 108-114.

Ramírez-Alan, O. (2017) *RPubs. Correlación y Regresión Lineal*. Disponible en: <https://rpubs.com/osoramirez/316691> (Accedido: 15 de julio de 2019).

Rasmussen, T. S. y Henry, R. J. (1990) "Starch determination in horticultural plant material by an enzymic-colorimetric procedure", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52(2), pp. 159-170.

- Refaeilzadeh, P., Tang, L. y Liu, H. (2009) "Cross-Validation", en Liu, L. y Özsu, M. T. (eds.) *Encyclopedia of Database Systems*. Nueva York: Springer US, pp. 532-538.
- Revilla, G. y Zarra, I. (2000) "La fisiología vegetal y su impacto social. La célula vegetal", en Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 1-16.
- Reynier, A. (2005) *Manual de viticultura*. 6.^a ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Rumbou, A. y Rumbos, I. (2001) "Fungi Associated with Esca and Young Grapevine Decline in Greece", *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), pp. 330-335.
- Sacithraa, R., Madhanmohan, M. y Vijayachitra, S. (2013) "Quantitative Analysis of Tapioca Starch using FT-IR Spectroscopy and Partial Least Squares", *International Journal of Computer Applications. Proceedings on International Conference on Innovations In Intelligent Instrumentation, Optimization and Electrical Sciences*, ICIIIOES(1), pp. 29-33.
- Saliba, J. S. y Ferreira, L. R. (2010) "Quantification and Determination of Starch in Diets Using Different Methodologies: Infrared Spectroscopy with Fourier Transformer, Laser Diffraction and Enzymatic Analysis", *American Journal of Analytical Chemistry*, 8, pp. 151-157.
- Sánchez-Díaz, M. y Aguirreolea, J. (2000) "Transporte de agua y balance hídrico en la planta", en Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, pp. 45-64.
- Schmidtke, L. M., Smith, J. P., Müller, M. C. y Holzapfel, B. P. (2012) "Rapid monitoring of grapevine reserves using ATR-FT-IR and chemometrics", *Analytica Chimica Acta*, 732, pp. 16-25.
- Schoch, T. J. (1961) "Starches and Amylases", *Proceedings. Annual meeting - American Society of Brewing Chemists*, 19(1), pp. 83-92.
- Shabala, S., Delrot, S., Rogiers, S. Y., Coetzee, Z. A., Walker, R. R., Deloire, A. y Tyerman, S. D. (2017) "Potassium in the Grape (*Vitis vinifera* L.) Berry: Transport and Function", *Frontiers in Plant Science*, 8(1629).
- Sigma-Aldrich (2018a) *Product Information. α -Amylase from *Bacillus licheniformis* (*Bacillus globigii*)*. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a4551pis.pdf (Accedido: 17 de febrero de 2019).
- Sigma-Aldrich (2018b) *Product information. α -Amylase from porcine pancreas*. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a3176pis.pdf (Accedido: 7 de febrero de 2019).

- Sigma-Aldrich (2018c) *Product information. PGO enzyme preparation*. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/p7119bul.pdf> (Accedido: 7 de febrero de 2019).
- Skinner, P. W. y Matthews, M. A. (1990) "A novel interaction of magnesium translocation with the supply of phosphorus to roots of grapevine (*Vitis vinifera* L.)", *Plant, Cell and Environment*, 13, pp. 821-826.
- Skoog, D. A. y Leary, J. J. (1993) *Principios de análisis instrumental*. 4.^a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Smith, J. y Holzapfel, B. (2014) *Post-harvest care of grapevines: Irrigation and nutrition*. Ficha informativa. Grape and Wine Research and Development Corporation.
- Soest, J. J. G. van, Tournois, H., de Wit, D. y Vliegthart, J. F. G. (1995) "Short-range structure in (partially) crystalline potato starch determined with attenuated total reflectance Fourier-transform IR spectroscopy", *Carbohydrate Research*, 279, pp. 201-214.
- Tang, M., Wen, S. y Tong, X. (2017) "Caustic-digested starch and its adsorption on hematite", *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 53(1), pp. 69-81.
- Tetlow, I. J., Morell, M. K. y Emes, M. J. (2004) "Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants", *Journal of Experimental Botany*, 55(406), pp. 2131-2145.
- Thermo Fisher Scientific (2009) *Product Overview. TQ Analyst Software Chemometric Algorithms*. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/brochures/D13081~.pdf> (Accedido: 9 de mayo de 2019).
- Thermo Fisher Scientific (2012) *OMNIC (Versión 9.3.32) [Programa de ordenador]*. Waltham: Thermo Fisher Scientific.
- Thermo Fisher Scientific (2014a) *Capabilities and Performance of the iD7 ATR Accessory*. Disponible en: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Warranties/TN52527_E 0214M iD7_web.pdf (Accedido: 9 de mayo de 2019).
- Thermo Fisher Scientific (2014b) *TQ ANALYST (Versión 9.4.45) [Programa de ordenador]*. Waltham: Thermo Fisher Scientific.
- Thermo Fisher Scientific (2014c) *TQ Analyst 9.4.45. [Programa de ordenador]. Thermo Scientific TQ Analyst Help*. Waltham: Thermo Fisher Scientific.
- Thermo Fisher Scientific (2017) *Conceptos básicos de FTIR*. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html> (Accedido: 12 de febrero de 2019).

- Tobias, R. D. (1995) "An Introduction to Partial Least Squares Regression", en *Proceedings of the twentieth annual SAS users group international conference*. Cary, CN: SAS Institute Inc., pp. 1250-1257.
- UMT Géno-Vigne (2011) *Pl@ntGrape, the catalogue of vines grown in France*. Disponible en: <http://plantgrape.plantnet-project.org/en/porte-greffes> (Accedido: 27 de febrero de 2019).
- University of Wisconsin (2018) *Cross Section of Tilia Stem at End of First Year. Plant teaching collection*. Disponible en: https://botit.botany.wisc.edu/botany_130/anatomy/secondary_growth/one_year_lab.html (Accedido: 13 de octubre de 2019).
- USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System (2019) *Taxon: Vitis acerifolia Raf. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy)*. Disponible en: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=101059> (Accedido: 27 de febrero de 2019).
- USDA, Agricultural Research Service National, Plant Germplasm System (2019) *Taxon: Vitis cinerea (Engelm.) Millardet var. helleri (L. H. Bailey) M. O. Moore. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy)*. Disponible en: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=316288> (Accedido: 27 de febrero de 2019).
- Van Den, T., Biermann, C. J. y Marlett, J. A. (1986) "Simple sugars, oligosaccharides and starch concentrations in raw and cooked sweet potato", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(3), pp. 421-425.
- Viveros Villanueva Vides (2009) *La plantación del vivero*. Disponible en: https://youtu.be/C3iLb_yXrxE (Accedido: 25 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2010a) *La recogida en campo de la planta de vid americana*. Disponible en: <https://youtu.be/YCowEqTVb2U> (Accedido: 3 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2010b) *Selección de plantones de vid*. Disponible en: https://youtu.be/BJhfhabWi_A (Accedido: 26 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2011a) *Despunte y tratamiento fitosanitario de plantones de vid*. Disponible en: <https://youtu.be/NxQpnnw8NEc> (Accedido: 25 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2011b) *Desyemado de las estacas de vid americana*. Disponible en: <https://youtu.be/GbhoA8kGf9k> (Accedido: 3 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2011c) *El injerto de vid en taller*. Disponible en: <https://youtu.be/wenuWVtVjLY> (Accedido: 4 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2011d) *Parafinado de injertos antes de plantar*. Disponible en: https://youtu.be/2_0DEsl0AKA (Accedido: 26 de febrero de 2019).

- Viveros Villanueva Vides (2011e) *Preparando las yemas para injertar vides*. España. Disponible en: https://youtu.be/cNx3l-Y9Q_E (Accedido: 3 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2013) *La recogida de yemas*. Disponible en: <https://youtu.be/wF7H54RwxSM> (Accedido: 3 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2014a) *El callo en el injerto de vid*. Disponible en: <https://youtu.be/m6AFS-NAM1g> (Accedido: 23 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2014b) *Preparando la vid americana para injertar*. Disponible en: https://youtu.be/X71mn_ac93c (Accedido: 3 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2015) *Limpieza de brotes de vid americana*. Disponible en: <https://youtu.be/zU4zrOaHvdM> (Accedido: 25 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2017a) *La recolección de los injertos de vid*. Disponible en: <https://youtu.be/QfneADERi2k> (Accedido: 25 de febrero de 2019).
- Viveros Villanueva Vides (2017b) *Sistema radicular y callo de un injerto de vid*. Disponible en: <https://youtu.be/RUwyYxAvg3Y> (Accedido: 25 de febrero de 2019).
- Vos-Scheperkeuter, G. H., de Boer, W., Visser, R. G., Feenstra, W. J. y Witholt, B. (1986) "Identification of Granule-Bound Starch Synthase in Potato Tubers", *Plant Physiology*, 82(2), pp. 411-416.
- Waite, H., Whitelaw-Weckert, M. y Torley, P. (2015) "Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material", *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43(2), pp. 144-161.
- Warren, F. J., Gidley, M. J. y Flanagan, B. M. (2016) "Infrared spectroscopy as a tool to characterise starch ordered structure-a joint FTIR-ATR, NMR, XRD and DSC study", *Carbohydrate Polymers*, 139, pp. 35-42.
- Weisstein, E. W. (2006) *Correlation Coefficient*, *MathWorld - A Wolfram Web Resource*. Disponible en: <http://mathworld.wolfram.com/CorrelationCoefficient.html> (Accedido: 15 de julio de 2019).
- Yang, Z., Swedlund, P., Gu, Q., Hemar, Y. y Chaieb, S. (2016) "Retrogradation of maize starch after high hydrostatic pressure gelation: Effect of amylose content and depressurization rate", *PLoS ONE*, 11(5), p. e0156061.
- Zapata, C., Deléens, E., Chaillou, S. y Magné, C. (2004) "Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.)", *Journal of Plant Physiology*, 161(9), pp. 1031-1040.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J. y Smith, A. M. (2010) "Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants", *Annual Review of Plant Biology*, 61, pp. 209-234.

Zhao, D., Reddy, K. R., Kakani, V. G. y Reddy, V. R. (2005) "Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum", *European Journal of Agronomy*, 22(4), pp. 391-403.

Zhao, N., Wu, Z., Zhang, Q., Shi, X., Ma, Q. y Qiao, Y. (2015) "Optimization of Parameter Selection for Partial Least Squares Model Development", *Scientific Reports*, 5(11647).