

LOS DIHIDROFLAVONOLES COMO MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS VARIEDADES BLANCAS DE VID CULTIVADAS EN GALICIA (ESPAÑA).

A. Masa ; F. Pomar

Misión Biológica de Galicia (CSIC)

Aptdo. 28, 36080-Pontevedra (Galicia, España)

amasa@mbg.cesga.es

Resumen

Para tratar de desarrollar un método bioquímico que permita diferenciar entre cultivares blancos de vid, se ha estudiado la composición fenólica de las principales variedades blancas de vid cultivadas en Galicia que se encuentran recogidas en la colección de germoplasma existente en la “Misión Biológica de Galicia”. Los extractos fenólicos obtenidos de las pieles de uva de cada una de estas variedades, se han analizado mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD), lo que ha permitido identificar (total o parcialmente) diversos compuestos de naturaleza fenólica, entre los que debemos destacar los llamados “dihidroflavonoles”, que se han mostrado como verdaderos marcadores específicos para diferenciar entre las variedades estudiadas.

The dihydroflavonols as biochemical markers of the genetical diversity of white grape Galician cultivars.

In order to develop a biochemical method that allows to distinguish between white grape cultivars, the phenolic composition of the main white cultivars from the “Misión Biológica de Galicia” germplasm collection were studied. The extracts obtained from peels of the selected cultivars were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC with diode array detector) and several phenolic compounds were totally or partly identified. Some of these compounds, especially the called “dihydroflavonols”, have been proved to be of great value as phenolic markers for grape cultivar recognition.

Les dihydroflavonols comme des marqueurs biochimiques de la diversité génétique des variétés blanches de vigne cultivées en Galice (Espagne).

Pour essayer de développer une méthode biochimique qui permette la différenciation des cépages blancs de vigne, on a étudié la composition phénolique des principales variétés blanches de vigne cultivées en Galice, qui ont été recueillies dans la collection de germoplasme qui existe à la Misión Biológica de Galicia. Les extraits phénoliques obtenus des peaux du raisin de chaque variété ont été analysés par chromatographie liquide (HPLC-DAD), ce qui a permis d'identifier (de manière totale ou partielle) de divers composants à

nature phénolique, parmi lesquels on doit détacher les soi-disants "dihydroflavonols", qui se sont montrés comme de véritables marqueurs spécifiques pour faire une différenciation dans les variétés étudiées.

Introducción

Los compuestos fenólicos, y de forma particular los flavonoides, juegan un importante papel en el mundo vegetal, no solo por su importante significación en la fisiología de las plantas, sino también por su responsabilidad en las características organolépticas de sus flores y frutos y de los productos que de ellos se derivan e incluso por sus propiedades medicinales, como agentes protectores frente a ataques de insectos, hongos y bacterias, y, en general, por su participación en los mecanismos de defensa de los vegetales (1,2,4,5). Todos estos aspectos se podrían concretar en el mundo de la vid y el vino, en el que los compuestos de naturaleza fenólica juegan un papel fundamental. Pero, además, su contribución al mundo de la taxonomía química o fitoquímica, ha sido realmente importante, hasta tal punto que todavía hoy resulta difícil de entender el enorme desarrollo de esta rama de la taxonomía como algo ajeno al mundo de los polifenoles.

Si bien es cierto que en la actualidad se vienen utilizando con éxito un amplio abanico de marcadores bioquímicos y/o moleculares (DNA, enzimas y diversos compuestos metabólicos) para la caracterización y clasificación de bancos de germoplasma en vid, tradicionalmente, los principales criterios para la diferenciación de cultivares de vid se han basado en características morfológicas y/o agronómicas, algunas de las cuales están fuertemente influenciadas por las condiciones ambientales y, por tanto, en cierta medida invalidadas para este objetivo.

En nuestro laboratorio venimos trabajando en la identificación de compuestos de naturaleza fenólica en vid mediante HPLC, lo que nos ha permitido establecer las diferencias varietales de 50 variedades tintas de vid en base a sus perfiles antociánicos (8); pretendemos ahora llegar a establecer un método que –de forma similar- nos permita definir las “huellas dactilares” de los cultivares blancos de origen gallego en base a su composición fenólica.

Así pues, el objetivo fundamental de esta comunicación es el desarrollar un método cromatográfico que nos permita identificar y clasificar los 10 cultivares blancos seleccionados de entre los existentes en el banco de germoplasma de la Misión Biológica de Galicia en base a su composición en dihidroflavonoles, y que en el futuro pueda ser utilizado de forma general en la identificación de las variedades blancas de vid. El que sean realmente escasos los trabajos realizados en vid con esta familia de componentes fenólicos, y el hecho de que se le atribuyan a estos compuestos numerosas propiedades (entre otras las de aportar resistencia frente al ataque de distintos patógenos) nos ha animado a enfocar nuestro estudio en esta dirección.

Material y métodos

El material vegetal, bayas en estado de madurez comercial, fué recogido en la colección de germoplasma de vid existente en la Misión Biológica de Galicia (CSIC), y se ha congelado inmediatamente a -23° C hasta el momento de su utilización; para esta comunicación, hemos seleccionado 10 variedades blancas cultivadas en Galicia: Albariño, Caiño blanco, Dona Blanca, Godello, Lado, Loureiro, Ratiño, Torrontés, Treixadura y Xerez. Con el objetivo de determinar la estabilidad de la composición fenólica de cada variedad a lo largo del tiempo, y de forma particular aquella que atañe a los dihidroflavonoles (en adelante DHF), se han analizado, para cada una de ellas, muestras correspondientes a las vendimias de los años 2003, 2004 y 2005.

Todos los solventes utilizados han sido de calidad HPLC de Merck (Darmstadt, Alemania), y el resto de los reactivos químicos (de calidad analítica) han sido Merck, Scharlau (Barcelona, España) o Panreac (Barcelona, España). Los patrones comerciales utilizados han sido Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), y el agua, de calidad HPLC, fué obtenida de un equipo Milli-Q System (Millipore, Bedford, MA, USA).

En el momento de la extracción, las pieles (100 gr de peso fresco) se separan manualmente de la pulpa y se trituran en 100 mL de agua con la ayuda de un homogenizador Ultraturrax T-25 (IKA) hasta obtener una mezcla homogénea de la que, una vez centrifugada (20 min, 20.000 g y 5° C) en una centrífuga refrigerada Centrikon H-401 (Kontron) y filtrada a través de papel de filtro Whatman nº 4, se obtiene un extracto acuoso bruto del que se extraerán los compuestos fenólicos de interés; previamente, se eliminan aquellos compuestos que pudieran interferir en alguna de las fases posteriores del proceso de separación e identificación; así, en primer lugar, se precipitan las proteínas mediante adición al extracto acuoso de un volumen doble de etanol, un proceso que se ve favorecido si se realiza a baja temperatura; se filtra el extracto, se reduce el volumen en rotavapor a vacío (Büchi, Flawil, Suiza) para retirar el alcohol, y se eliminan los compuestos de naturaleza lipofílica mediante extracción con n-hexano (3 veces v/v) en embudo de decantación; a partir de la fase acuosa así obtenida, se procede a la extracción de los compuestos fenólicos en embudo de decantación con acetato de etilo (5 veces v/v), se eliminan las posibles trazas de agua mediante adición de Na₂SO₄, se filtra, se concentra a sequedad en rotavapor, y se redissuelve en volumen mínimo de metanol/agua (v/v).

Los extractos metanólicos resultantes fueron utilizados para la separación cromatográfica en HPLC analítica en fase inversa en un equipo Waters (Milford, MA, USA) provisto de un módulo de separaciones 2690 y un detector de diodos modelo 996. Todas las muestras fueron filtradas a través de un filtro Millex-HV (Millipore) de 45 µm y el volumen de muestra inyectada de 20 µL. La columna utilizada fué una Kromasil C18 (Scharlau) de 4.6 x 300 mm y 5 µm de diámetro de partícula, protegida con una precolumna C 18 Guard-Pak (Waters) y la temperatura del horno se fijó en 30° C. El flujo constante a lo largo de todo el análisis fué de 0.8 mL/min y la fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo/acético/agua (30:2:68) como solvente A y ácido acético 2% como solvente B. El gradiente fué desde 25% de A en el minuto 0 hasta 100% de A en el minuto 65, volviendo a las condiciones iniciales en los 5 últimos minutos de desarrollo. Los datos cromatográficos fueron tratados con el software Millennium³² de Waters, los cromatogramas adquiridos a 280 nm y los espectros de fotodiodos realizados entre 240 y 460 nm.

Paralelamente a los análisis de HPLC, los extractos metanólicos fueron cromatografiados en sucesivas cromatografías preparativas descendentes en papel (Whatman 3MM) utilizando agua como desarrollante; las fracciones cromatográficas obtenidas fueron eluidas con metanol y los eluatos concentrados a sequedad en rotavapor y recromatografiados en capa fina preparativa (celulosa Merck, 0.1 mm) utilizando como desarrollante la fase superior de BAW (n-butanol/acético/agua, 4:1:5) y en HPLC analítica en las condiciones previamente descritas. La inyección en HPLC analítica de los distintos eluatos, nos ha permitido establecer la correspondencia entre los DHF presentes en cada uno de ellos, con los previamente separados en los cromatogramas de los extractos fenólicos de cada variedad, y recoger (tras sucesivas inyecciones) suficiente cantidad de cada compuesto separado para la realización de análisis espectrofotométricos e hidrólisis.

Para la identificación de los distintos compuestos separados cromatográficamente se han tenido en cuenta los tiempos de retención en HPLC, su comportamiento cromatográfico frente a patrones comerciales en HPLC, PC (papel Whatman 1M) y TLC en placas de celulosa, su

comportamiento frente a diferentes colorantes específicos, los espectros realizados con el detector de diodos durante el desarrollo cromatográfico en HPLC, y sus propiedades espectrales en UV/vis (entre 240 y 460 nm) en metanol y tras la adición de diferentes agentes modificadores del espectro (AlCl_3 , AlCl_3+HCl , NaOH ,...), análisis que se han realizado en un espectrofotómetro DU-640 de Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA). La evidencia última de la estructura de los distintos compuestos fenólicos separados se obtuvo a partir del análisis de los productos obtenidos tras sus hidrólisis ácidas y enzimáticas, que fueron realizadas siguiendo la metodología propuesta por Markham (6). Las agliconas fueron identificadas por co-cromatografía frente a patrones comerciales y por su comportamiento espectrofotométrico en UV/vis, mientras que los azúcares fueron identificados por cromatografía frente a patrones comerciales en papel Whatman 3MM utilizando BBPW (n-butanol/benceno/piridina/agua, 5:1:3:3) como solvente y utilizando el reactivo de Partridge como revelador (6).

Con los datos obtenidos mediante HPLC se ha realizado un análisis de varianza para cada pico cromatográfico correspondiente a los dihidroflavonoles y un análisis de componentes principales usando el programa SAS 2000 (NC, USA). Las representaciones gráficas se realizaron utilizando el programa Sigmaplot 2001 para Windows (SPSS, USA).

Resultados y conclusiones

El orden de elución de los distintos compuestos fenólicos en HPLC en fase inversa (en la fig.1 se presenta el cromatograma correspondiente al Albariño, extraído a 280 nm) en la que los compuestos más polares eluyen antes que los menos polares, así como los espectros realizados en DAD durante el propio desarrollo cromatográfico (con un máximo muy patente entre 270 y 295 nm y un punto de inflexión alrededor de los 340 nm), se han utilizado para identificar, de entre el total de compuestos fenólicos separados, aquellos que pertenecen al grupo de los DHF, 12 en el conjunto de las muestras estudiadas.

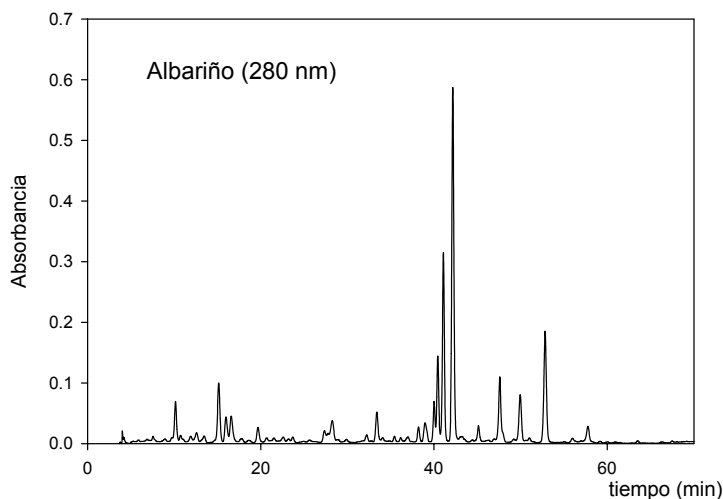


Fig. 1.- Cromatograma de HPLC para la variedad Albariño.

Por otro lado, los cromatogramas preparativos en papel, han permitido detectar una banda de R_f 0.41-0.46, absorbente a la luz UV que no cambia cuando se expone a la acción de vapores amoniacales y con el espectro en MeOH característico de los DHF. Recromatografiada esta banda en TLC preparativa, dio lugar a 4 nuevas bandas (de R_{fs} 0.32-0.35, 0.60-0.66, 0.72-0.81 y 0.84-0.91) con similar comportamiento frente a la luz UV y características espectrales que la banda de la que provienen. Mediante cromatografía analítica de los eluatos de estas bandas en TLC, se han podido separar distintos compuestos que dieron coloración violeta o rojiza

con Zn/HCl, reactivo específico de los DHF que permite diferenciarlos de las flavanonas y de las dihidrochalconas, compuestos fenólicos muy similares a los DHF en lo que respecta a su comportamiento espectrofotométrico pero que no dan coloración con este reactivo; del mismo modo, todos ellos han dado resultados negativos con el reactivo NaBH₄/HCl (específico de las flavanonas) y con NaBH₄/DDQ, específico de las dihidrochalconas, que dan coloraciones violetas con este reactivo (3). Su comportamiento cromatográfico en H₂O y BAW hace pensar que estamos en presencia de derivados monoglicosilados, y su característico color oscuro, absorbente, que no cambia frente a vapores de amoníaco, sugiere estructuras substituidas en posición 3, aspecto que se ve confirmado por su comportamiento espectrofotométrico frente a reactivos modificadores del espectro metanólico; en efecto, cuando se realiza el espectro en presencia de NaOAc, se produce un desplazamiento batocrómico de 36-38 nm, que sugiere la existencia de un OH libre en posición 7 mientras que el inducido al añadir AlCl₃ y AlCl₃ + HCl (de unos 24 nm) indica que también ha de existir un OH libre en posición 5, conclusión que se ve reforzada por el hecho de que estos compuestos (a diferencia de lo que ocurre con los substituidos en posición 5) no dan coloración azul-verdosa cuando se exponen a la luz UV en presencia de vapores de amoníaco (7).

Las hidrólisis ácidas y enzimáticas realizadas para cada uno de los compuestos separados, han permitido identificar los aglicones, en todos los casos dihidroquercetina y dihidrokaempferol (respectivamente conocidos como Taxifolín y Aromadendrin), y los azúcares Galactosa, Glucosa y Rhamnosa. En la tabla 1 se presentan los diferentes compuestos identificados (total o parcialmente) junto con sus características espectrales.

Pico número	t _R (min)	λ_{\max} (nm) UV/vis MeOH	λ_{\max} (nm) DAD	Identificación
1	25.5		292.3; 340	Taxifolin-3-glicósido
2	27.4	290; 340	291.1; 340	Taxifolin-3-glicósido
3	30.1		292.3; 335	¿?
4	33.4	290; 340	289.9; 340	Taxifolin-3-galactósido
5	35.4	289.9; 338	287.6; 338	Taxifolin-3-glucósido
6	36.2		292.3; 340	Aromadendrin-3-glicósido
7	42.1	290; 340	289.9; 340	Taxifolin-3-rhamnósido
8	42.9		286.6; 342	Aromadendrin-3-glucósido
9	47.2		287.6; 338	¿?
10	49.8	291.1; 340	292.3; 340	Aromadendrin-3-rhamnósido
11	50.6	293; 338	292.3; 338	¿?
12	51.4		289.7; 340	Aromadendrin?

Tabla 1.- Tiempos de retención y características espectrales de los dihidroflavonoles separados por HPLC. En negrilla se presentan los valores correspondientes a los puntos de inflexión de los espectros.

En algunos casos, la escasa cantidad de producto obtenida nos ha impedido obtener resultados definitivos, bien por lo que respecta a la identificación del azúcar (es el caso de los picos 1, 2 y 6 que figuran en la tabla bajo la denominación genérica de “glicósidos”) bien a la totalidad del compuesto (picos 3, 9 y 11). El compuesto 12, que no presenta características de “glicósido”, ha sido identificado en principio como Aromadendrin por su color verde en UV tras ser revelado con difenilbórico, coloración típica de los derivados del Kaempferol. Conviene destacar que hasta el momento actual no se habían identificado en vid más que dos DHF, el Taxifolín-3-rhamnósido (Astilbín) y el Aromadendrin-3-rhamnósido (Engeletín) identificados por primera vez en el año 1983 (9).

Una vez identificados los distintos DHF, y a partir de los cromatogramas de HPLC obtenidos para cada variedad, se han elaborado los correspondientes diagramas esquemáticos para estos compuestos en base a los valores relativos del área para cada pico (en la fig. 2 se presenta el obtenido para la variedad Albariño).

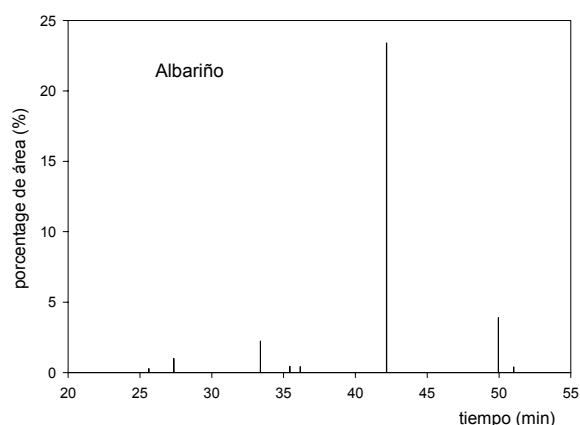


Fig.2.-Diagrama esquemático del contenido en DHF de la variedad Albariño.

Por su parte, la tabla 2 muestra, para cada variedad, los contenidos medios (en % de área de pico) y sus diferencias significativas mínimas, para los distintos DHF obtenidos e identificados tras el análisis de las muestras correspondientes a los tres años de estudio; de dicha tabla se puede deducir que existen diferencias altamente significativas para todas y cada una de las 10 variedades estudiadas por lo que respecta a su contenido en dihidroflavonoles, y, por tanto, que estos componentes de naturaleza fenólica podrían ser de utilidad en la diferenciación de variedades blancas de vid.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total DHF
Albariño	0.27	0.98	-	2.25	0.45	0.43	23.02	-	-	3.88	-	0.43	31.21
Caiño branco	0.65	-	-	-	0.76	-	2.19	-	-	-	-	0.06	3.66
Dona Branca	-	-	-	-	0.41	-	0.42	-	-	-	-	-	0.83
Godello	0.18	-	-	-	0.29	-	3.34	-	-	-	-	-	3.81
Lado	-	0.78	-	1.39	-	0.41	20.89	-	0.23	-	4.90	0.13	28.73
Loureiro	0.24	-	-	0.60	0.39	-	10.09	-	-	-	0.70	0.20	12.22
Ratiño	0.15	-	-	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	0.90
Torrentés	0.41	-	-	-	0.24	-	0.69	0.42	-	-	-	-	1.76
Treixadura	0.47	-	0.09	-	-	-	6.52	-	-	0.25	-	-	7.33
Xerez	0.55	-	-	-	0.30	-	6.14	-	-	0.44	0.19	-	7.62
MSD	0.057	0.035	0.014	0.148	0.058	0.031	0.974	0.024	0.005	0.055	0.165	0.033	

Tabla 2.- Valores medios de los DHF (en % de área de pico) y diferencia significativa mínima para las 10 variedades estudiadas (n=3).

Estos resultados se han visto confirmados tras el análisis de componentes principales, en el que los cuatro primeros componentes principales explican el 89.4% de la varianza acumulada.

PICO	PESO DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES			
	I	II	III	IV
1	-0.175235	0.310843	0.231867	0.252146
2	0.403237	0.050020	0.024898	0.109324
3	-0.081849	-0.072040	0.816794	0.039745
4	0.388604	0.109541	0.016059	0.020523
5	-0.048402	0.444677	-0.411257	-0.199969
6	0.404473	-0.008022	0,011624	0.106218
7	0.392202	0.033331	0.138832	0.012841
8	-0.106228	-0.011024	-0.205056	0.927268
9	0.255595	-0.449446	-0.094601	0.040844
10	0.273300	0.424609	0.161701	0.096946
11	0.255310	-0.444504	-0.111855	0.008347
12	0.335749	0.323687	-0.003251	-0.008525

Tabla 3.- Peso de los primeros 4 componentes principales.

De la observación de la tabla 3, que muestra el peso de cada uno de los cuatro primeros componentes principales, se puede deducir que el primero de ellos depende principalmente de la contribución de los picos 6, 2 y 7; el segundo, de los picos 9, 5 y 11; el tercero, de los picos 3 y 5, y por último, el cuarto, en el que son los picos 8 y 1 los que mayor peso aportan.

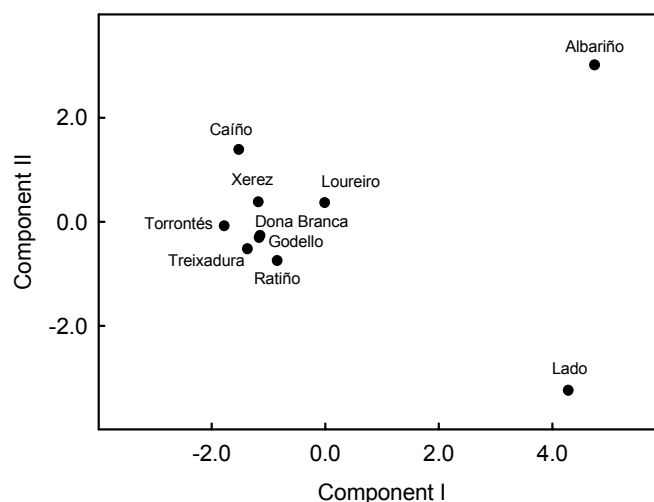


Fig. 3.- Distribución de las variedades estudiadas en función de los dos primeros componentes principales.

En la fig. 3 se muestra la distribución de las 10 variedades blancas estudiadas, en función de los dos primeros componentes principales, que explican un 70.1% de la varianza acumulada. Se debe destacar que tanto el Albariño como el Lado aparecen claramente separadas del resto, y que tan solo Dona Branca y Godello no se diferencian de forma precisa utilizando este análisis, diferenciación que se consigue con la ayuda del tercer componente principal, que incrementa la varianza acumulada hasta el 81.1%. De los análisis estadísticos realizados, se puede concluir que el contenido relativo de cada uno de los DHF estudiados depende de la variedad.

Como conclusión, y de igual modo que se ha establecido previamente para los antocianos en el caso de variedades tintas (8), se puede confirmar la validez del método cromatográfico propuesto en la identificación de variedades blancas de vid y, por tanto, para la diferenciación entre ellas.

Referencias bibliográficas

- “Bohm B.A., 1998. Introduction to flavonoids. Harwood academic publishers (Canada).”
- “Friend, J., 1985. Phenolic substances and plant disease, Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 25, 367-392.”
- “Grayer, R.J., 1989. Flavanoids, Methods in Plant Biochemistry, 1, 283-323.”
- “Harborne, J.B., 1985. Phenolics and plant defence, Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 25, 393-408.”
- “Huang, J-S., 2001. Plant Pathogenesis and Resistance. Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions. Kluwer Academic Publishers (Holanda).”
- “Markham, K.R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press (Londres).”
- “Markham, K.R., Weeby, R.F., Vilain, C., 1984. 7-O-Methyl-(2R:3R)- dihydroquercetin 5-O- β -D-glucoside and other flavonoids from *Podocarpus nivalis*, Phytochemistry, 23, 2049-2052.”
- “Pomar, F., Novo, M., Masa, A., 2005. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1094, 34-41.”
- “Trousdale, E.K., Singleton, V.L., 1983. Astilbin and Engeletin in grapes and wine, Phytochemistry, 22, 619-620.”