

DOCUMENTO
TECNICO

¹Urska Vrhovsek
¹Giulia Malacarne
¹Domenico Masuero
²Luca Zulini
Graziano Guella
¹Marco Stefanini
¹Riccardo Velasco
¹Fulvio Mattivi

¹Fondazione Edmund Mach, Centro
 Ricerca ed Innovazione -
 San Michele all'Adige (TN)

²Laboratorio di Chimica Bio-organica,
 Dipartimento di Fisica,
 Università di Trento



U. Vrhovsek

QUANTIFICAZIONE DI RESVERATROLO, PICEIDE, PTEROSTILBENE E 11 VINIFERINE INDOTTE DA *P. VITICOLA* IN FOGLIE DI VITI RESISTENTI

Questo è il primo articolo che riporta una analisi metabolica dettagliata, con identificazione e quantificazione, delle principali viniferine presenti in foglie di vite dopo infezione con *Plasmopara viticola*, mediante uso degli standard corrispondenti. L'analisi è stata condotta mediante LC-MS, utilizzando una colonna a fase inversa.

Introduzione

Gli stilbenoidi sono fenoli derivanti dalla via metabolica dei fenilpropanoidi e dell'acetato-malonato, che è presente in molte famiglie di piante. All'interno delle Vitaceae, gli stilbenoidi costituiscono un gruppo relativamente ristretto di molecole che derivano dalla struttura del *trans*-resveratrolo e rappresentano le principali fitoalessine note. La sintesi di stilbeni nell'uva può

essere costitutiva (Pezet e Pont 1988, Korhammer et al. 1995, Mattivi et al. 1995) o indotta in risposta a stress biotici ed abiotici (Langcake e Pryce 1976, Langcake e Pryce 1977, Adrian et al. 1996, Sarig et al. 1997, Douillet-Breuil et al. 1999, Cantos et al. 2001) o da elicitori (Bru et al. 2006, Zamboni et al. 2006).

Gli stilbeni hanno suscitato grande interesse a causa delle loro proprietà antifungine (Hoos e Blaich 1990, Adrian

et al. 1997), in particolare Langcake e Pryce (1977) hanno caratterizzato una serie di fitoalessine con attività antifungina in diverse specie del genere *Vitis*. Inoltre è stato dimostrato che la presenza di resveratrolo è strettamente correlata alla resistenza alle malattie in molte specie di vite (Dercks e Creasy 1989, Adrian et al. 1997). Oltre al resveratrolo, anche altri stilbenoidi derivanti dalla sua dimerizzazione ossidativa, sono

Parole chiave: stilbenoidi, viniferine, HPLC-DAD-MS, Vitaceae, *Plasmopara viticola*

Tab. 1 - Valore medio determinato sperimentalmente del coefficiente di estinzione molare e picco di assorbanza degli oligomeri usati come standard esterni per la quantificazione

peak N°	name	Maximal absorbance (nm)	Average molar extinction coefficient at maximal absorbance
1	<i>trans</i> -caffeic acid and (+)-catechin condensation product	281	7340
3	ampelopsin D + quadrangularin A	314	24570
4	isohopeaphenol	281	10930
5	<i>Z</i> - ϵ -viniferin	280	9920
6	ampelopsin H	281	12710
7	vaticanol C-like	281	14830
8	(+)- <i>E</i> - ϵ -viniferin	319	30630
9	<i>Z</i> -miyabenol C	282	14030
11	<i>Z+E</i> - ω -viniferin	295	13950
12	α -viniferin	283	6270
13	<i>E-cis</i> -miyabenol C	321	11100a

Tab. 2 - Soglia di rilevabilità (LOD) e soglia di quantificazione (LOQ) per la misura in UV-Vis (i valori sono espressi in mg/g fw)

	LOD (S/N > 3)	LOQ (S/N > 10)
<i>trans</i> -piceid	0.02	0.08
<i>trans</i> -resveratrol	0.01	0.05
pallidol (as Ampelopsin H)	0.15	0.51
ampelopsin D+ quadrangularin A (1:1)	0.05	0.15
isohopeaphenol	0.20	0.67
ampelopsin H	0.23	0.78
vaticanol C isomer (as Ampelopsin H)	0.15	0.51
(+)- <i>E</i> - ϵ -viniferin	0.08	0.26
<i>Z</i> -miyabenol C	0.03	0.09
<i>E</i> -miyabenol C	0.05	0.15
<i>Z</i> - ω -viniferin	0.29	0.97
<i>E</i> - ω -viniferin	0.15	0.49
α -viniferin	0.41	1.36

attivi contro vari patogeni funghi della vite (Jeandet 2002).

La variabilità nella produzione di stilbeni è anche influenzata dal genotipo e dallo stadio di sviluppo della vite (Barlass et al. 1987, Dercks e Creasy 1989, Sbaghi et al. 1995, Gatto et al. 2008) o dall'età della foglia (Stein et al. 1985). In particolare, le foglie molto vecchie e le foglie più giovani sembrano sintetizzare meno stilbeni rispetto alle altre a causa della maggior chiusura stomatica che limita l'entrata del patogeno e, indirettamente, la sintesi

di stilbene (Stein et al. 1985). La tossicità di questi composti è risultata essere correlata alla loro struttura chimica. In particolare si è constatato che δ -viniferina, un dimero di ossidazione del resveratrolo, e pterostilbene, e l'analogo 3,5-dimetossi del resveratrolo, sono gli stilbeni più tossici in termini di mobilità e sviluppo della malattia causata dall'oomicete *Plasmopara viticola* (Pezet et al 2004a, 2004b, Schmidlin et al. 2008).

In letteratura si trovano diversi metodi analitici per l'analisi delle viniferine, il più

utilizzato è il sistema di separazione HPLC, accoppiato con diversi tipi di rivelatori come DAD (Jeandet et al. 1997, Vitrac et al. 2005), fluorescenza (Jeandet et al. 1997) e più recentemente spettrometri di massa (Pezet et al 2003, Jean-Denis et al 2007, Jerkovic et al 2007, Godard et al 2009). La maggiore difficoltà nell'analisi delle viniferine è la mancanza di standard disponibili in commercio. Questo articolo descrive lo sviluppo di un nuovo metodo per la separazione cromatografica e quantificazione accurata delle viniferine. A nostra conoscenza è il primo lavoro che descrive un'analisi capace di identificare e quantificare con accuratezza le principali viniferine accumulate in foglie di vite in seguito ad infezione con *Plasmopara viticola* grazie all'utilizzo dei rispettivi standard precedentemente isolati e caratterizzati nel nostro laboratorio (Mattivi et al., 2011).

Materiali e metodi

È stata utilizzata una popolazione F1 derivante dall'incrocio interspecifico tra Merzling (M) (un ibrido complesso di *V. vinifera* derivante da *Vitis rupestris* e *Vitis linccumii*) e la cultivar di *V. vinifera* Teroldego (T), che sono rispettivamente parzialmente resistente e suscettibile a *Plasmopara viticola*. Nel primo anno, Merzling e gli individui F1 21/122 e 21/103 sono stati selezionati e utilizzati per ottimizzare un metodo per l'analisi del contenuto di stilbeni nelle foglie dopo inoculazione con *P. viticola*.

I genotipi selezionati sono stati replicati mediante talee innestate sul portinnesto Kober 5BB, che sono state mantenute in una camera di crescita in vasi da 1 litro piene di terriccio:sabbia:tor-ba:vermiculite (3:1:3:3). Per F1 21/103 sono state eseguite due ripetizioni, mentre per F1 21/22 e Merzling sono state eseguite tre ripetizioni. Gli individui F1 21/74 e F1 21/103 sono stati campionati

anche nelle due annate seguenti per studiare la riproducibilità in tre annate diverse.

Inoculo fungino ed infezioni delle piante.

Sporangi di *P. viticola* (Berk. e Curt) Berl. et De Toni sono stati raccolti da foglie infette di *V. vinifera* cv Pinot Gris. Le macchie bianche di sporulazione presenti sulla pagina inferiore delle foglie sono state spazzolate con acqua bidistillata per ottenere una sospensione di conidi di $10^4/10^5$ spore/ml.

L'inoculazione delle piante è stata ottenuta spruzzando la sospensione di conidi sulla superficie inferiore di tutte le foglie completamente espanse in una camera climatica a 24 ° C con 80% di umidità relativa.

L'esperimento di infezione è stato eseguito in tre repliche. Le foglie di ogni replica sono state raccolte a 0 ore, 2 giorni e 6 giorni dopo l'infezione (dpi) con *P. viticola*. Tutte le foglie raccolte sono state conservate a -20 ° C fino all'analisi.

Reagenti chimici.

Acetonitrile, metanolo ed acido acetico per HPLC sono stati acquistati da Carlo Erba (Italia), acetato di etile da BDH e acido fosforico da Merck. Il *trans-resveratrolo* è stato acquistato da Sigma, il *trans-4-hydroxystilbene* da Aldrich, il *cis-resveratrolo* è stato preparato dal *trans-resveratrolo* standard tramite fotoisomerizzazione (Mattivi et al., 1995), il *trans-piceide* (*trans-resveratrolo-3-O-β-D-glucopiranoside*) è stato isolato dalle radici di *Polygonum cuspidatum*. La purezza di ciascuno stilbenoide è stata controllata mediante HPLC e l'identità è stata confermata in accordo con Mattivi et al. (1995).

I composti (+)-*E-ε-viniferina*, *Z-* ed *E-ω-viniferina*, pallidolo, ampelopsina D, quadrangularina A, *Z-miyabenolo C* ed *E-cis-miyabenolo C*, *α-viniferina*, isohopeaphenolo, ampelopsina H e l'isomero vaticanol -C-simile sono stati isolati da foglie infette di vite in un precedente studio e

Tab. 3 - Accumulo di viniferine nelle foglie di 3 genotipi a diversi tempi dall'infezione con *P. viticola*. I valori sono espressi in ug/ g fw (n=3)

	0		2 dpi		6 dpi	
F1 genotype 21/122	average	sd	average	sd	average	sd
<i>trans-piceid</i>	nd	nd	0.8	1.4	5.3	0.8
<i>trans-resveratrol</i>	0.2	0.4	1.7	3.0	8.1	1.1
pallidol (ampelopsin H)	nd	nd	nd	nd	19.24	10.70
ampelopsin D+ quadrangularin A (1:1)	nd	nd	1.6	1.5	11.1	6.4
isohopeaphenol	nd	nd	12.2	8.8	118.1	97.5
ampelopsin H + vaticanol C isomer (ampelopsin H)	nd	nd	3.1	2.9	57.2	23.1
(+)- <i>E-ε-viniferin</i>	nd	nd	11.1	10.8	34.5	3.4
<i>Z+E-miyabenol C</i> (Zmiyabenol C)	nd	nd	10.6	10.5	51.2	29.4
<i>Z+E-ω-viniferin</i> (<i>E-ω-viniferin</i>)	nd	nd	8.6	9.0	47.9	24.8
<i>α-viniferin</i>	nd	nd	2.8	3.6	68.5	78.1
<i>E-cis-miyabenol C</i>	nd	nd	3.9	3.4	49.4	46.9
<i>trans-pterostilbene</i> (<i>trans-resveratrol</i>)	nd	nd	0.9	1.0	8.0	6.0
F1 genotype 21/103						
<i>trans-piceid</i>	nd	nd	nd	nd	8.8	8.0
<i>trans-resveratrol</i>	nd	nd	nd	nd	21.1	13.6
pallidol (ampelopsin H)	nd	nd	nd	nd	53.42	11.16
ampelopsin D+ quadrangularin A (1:1)	nd	nd	nd	nd	67.6	17.5
isohopeaphenol	nd	nd	nd	nd	1311.7	81.5
ampelopsin H + vaticanol C isomer (ampelopsin H)	nd	nd	nd	nd	453.6	83.2
(+)- <i>E-ε-viniferin</i>	nd	nd	nd	nd	98.2	28.6
<i>Z+E-miyabenol C</i> (Zmiyabenol C)	nd	nd	nd	nd	121.3	26.4
<i>Z+E-ω-viniferin</i> (<i>E-ω-viniferin</i>)	nd	nd	nd	nd	127.1	40.2
<i>α-viniferin</i>	nd	nd	nd	nd	120.3	6.8
<i>E-cis-miyabenol C</i>	nd	nd	nd	nd	148.6	38.5
<i>trans-pterostilbene</i> (<i>trans-resveratrol</i>)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Merzling						
<i>trans-piceid</i>	nd	nd	nd	nd	2.7	0.4
<i>trans-resveratrol</i>	nd	nd	nd	nd	5.7	3.6
pallidol (ampelopsin H)	nd	nd	nd	nd	30.22	16.04
ampelopsin D+ quadrangularin A (1:1)	nd	nd	nd	nd	8.0	4.2
isohopeaphenol	nd	nd	nd	nd	147.0	70.6
ampelopsin H + vaticanol C isomer (ampelopsin H)	nd	nd	nd	nd	35.80	19.4
(+)- <i>E-ε-viniferin</i>	nd	nd	nd	nd	13.1	6.9
<i>Z+E-miyabenol C</i> (Zmiyabenol C)	nd	nd	nd	nd	10.5	2.9
<i>Z+E-ω-viniferin</i> (<i>E-ω-viniferin</i>)	nd	nd	nd	nd	9.5	2.7
<i>α-viniferin</i>	nd	nd	nd	nd	15.5	7.0
<i>E-cis-miyabenol C</i>	nd	nd	nd	nd	16.9	20.4
<i>trans-pterostilbene</i> (<i>trans-resveratrol</i>)	nd	nd	nd	nd	6.0	4.0

Tab. 4 - Riproducibilità fra piante. Concentrazione media (ug/g fw), Deviazione standard (Sd) e Coefficiente di variazione (cv) sono stati ottenuti considerando la seconda e terza foglia di tre repliche per genotipo. Le misure sono state effettuate a 6 dpi dopo infezione con *P.viticola*

	<i>trans-piceid</i>	<i>trans-resveratrol</i>	pallidol	ampelopsin D+quadragularin A (1:1)	isohopeaphenol	Ampelopsin H + vaticanol C isomer	(+)- <i>E-ε-viniferin</i>	<i>Z+E-miyabenol C</i>	<i>Z+E-ω-viniferin</i>	<i>α-viniferin</i>	<i>E-cis-miyabenol C</i>	<i>trans-pterostilbene</i>
21/122												
Average	4.9	7.2	16.40	9.0	107.4	49.6	31.8	41.2	40.9	51.8	42.1	8.1
Sd	1.3	1.0	4.22	2.4	34.3	13.3	6.8	12.4	10.3	36.2	19.1	0.8
cv (%)	25.6	14.6	25.8	27.0	31.9	26.8	21.5	30.2	25.3	69.9	45.3	10.0
Merzling												
Averag	1.3	4.7	25.79	5.6	135.5	32.1	12.8	9.1	7.9	11.8	15.1	5.2
Sd	0.2	2.4	15.86	2.5	67.1	18.1	7.3	4.6	0.9	7.3	14.6	2.3
cv (%)	15.2	51.6	61.5	44.9	49.6	56.5	57.4	50.1	11.3	61.5	97.1	44.2

la loro caratterizzazione strutturale è riportata in Mattivi et al. (2011).

Preparazione del campione.

Campioni rappresentativi di foglie sono stati pesati (0.2-0.3 g) e ad essi sono stati aggiunti 40 ml di metanolo e 50 ml di standard interno (4-hydroxystilbene, 200 mg/l). Ogni campione è stato omogenizzato in un frullatore alimentare per 30 s e poi centrifugato a 3300xg per 7 min. Il surnatante è stato filtrato (0.45 mm, Sartorius, Germania) e concentrato ad un volume finale di 0.5 ml mediante un rotavapor (Büchi, Germania) a 38 °C, trasferito in una siringa da 50 ml a cui erano stati precedentemente aggiunti 40 ml di H₂O. La siringa è stata posta su una cartuccia SPE Bakerbond, SDB (ISOLUTE ENV +) 100 mg/3 ml (JT Baker, Deventer, Olanda), che era stata precedentemente condizionata con 2 ml di metanolo seguiti da 5 ml di H₂O, e ciascun campione è stato caricato sulla cartuccia pre-condizionata. La cartuccia è stata quindi lavata con 5 ml di H₂O e gli stilbeni sono stati eluiti mediante 2 ml di acetato di etile.

La frazione di acetato di etile è stata quindi portata a secco a 38 °C. Il residuo è stato immediatamente ridisciolti in 0.5 ml di 50% (v/v) metanolo in H₂O. Il campione

è stato filtrato con un filtro di PVDF 0.22 mm (Millipore, Bedford, MA) in una fiala HPLC e poi analizzato mediante HPLC.

Metodo HPLC-DAD-MS.

L'analisi è stata effettuata con un sistema LC-MS ZQ Micromass (Micromass, Manchester, UK), dotato di un sistema Waters 2690 HPLC, un rivelatore DAD 996 Waters (Waters Corp., Milford, MA) e Empower Software (Waters Corp.). La separazione è stata eseguita utilizzando una colonna Zorbax SB-Aq (5 mm, 2.1x150 mm) e una pre-colonna Zorbax SB-Aq (5 mm, 2.1x12.5 mm) precolonna (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Le fasi mobili utilizzate consistevano di 0,1% (v/v) di acido acetico in H₂O (A) e acetonitrile (B). La separazione è stata condotta a 40 °C in 27 min, alle seguenti condizioni: gradiente lineare da 5% B a 70% B in 25 min, a 95% B in 0,1 min, 95% B per 2 minuti e ritorno a 5% B in 0,1 minuti. La colonna è stata equilibrata per 7 minuti prima di ogni analisi. Il flusso è stato di 0,25 ml/min e il volume di iniezione 6 ml. Gli spettri UV-VIS sono stati registrati nell'intervallo 220-400 nm, la rilevazione a 310 nm.

La tensione applicata nel capillare è stata di 3000 V, la tensione di cono di 40 V, la tensione di estrazione di 6 V, la temperatura della sorgente

di 105 °C, la temperatura di desolvatazione 200 °C, il flusso di gas (N₂) nel cono 30 l/h, il flusso del gas di desolvatazione (N₂) 450 l/ora. L'uscita del sistema di HPLC è stata suddivisa (9:1) verso l'interfaccia ESI dell'analizzatore di massa. Spettri di massa elettrospray con valori m/z da 100 a 1500 sono stati acquisiti in modo positivo con un tempo di permanenza di 0,1.

Alla fine dei 27 min di corsa acquisiti in modalità positiva sono stati acquisiti anche spettri di massa in modalità negativa per 1 min. La tensione di cono (CV) è stata impostata in modalità di scansione ad un valore di 40 V per l'identificazione del picco basato sull'aglicone ed a 25 V per l'identificazione sulla base sia del frammento aglicone sia dello ione molecolare. I seguenti ioni singoli (m/z) sono stati monitorati per l'identificazione: 229,1 (CV 25 V) per *trans-* e *cis-resveratrol*, 229,1 (CV 40 V) per i derivati *trans-trans-* e *cis-piceide*, 455,2 (CV 60 V) per i dimeri stilbenoidi, 681,2 (CV 70 V) per i trimeri stilbenoidi, 907,2 (CV 80 V) per i tetrameri stilbenoidi.

Ciascun composto è stato identificato sulla base dei seguenti parametri: 1) tempo di ritenzione, 2) spettri UV-VIS 3) frammento base corrispondente all'aglicone 4) ione molecolare. I campioni sono stati quantificati con rileva-

zione UV-VIS a 280 nm per le forme *Z* e 310 nm per le forme *E* con il metodo dello standard esterno. I monomeri di *trans-resveratrol*, *trans-piceide* e IS (*trans-4-hydroxystilbene*) sono stati quantificati con rilevazione a 310 nm in UV-VIS. I dimeri (+)-*E-ε-viniferina*, *Z-e-ω-viniferina*, ampelopsina D + quadragularina A), i trimeri (*Z-miyabenol C* ed *E-cis-miyabenol C* e *α-viniferina*) e i tetrameri (*isohopeaphenol*, ampelopsina H e l' isomero vaticanol-C-simile) sono stati quantificati utilizzando le curve di calibrazione dei singoli composti isolati.

Il loro coefficiente di estinzione molecolare è riportato in Tabella 1. Il pallidolo è stato espresso come equivalenti di ampelopsina H, il *trans-pterostilbene* come equivalenti di *trans-resveratrol*, e i valori espressi in mg/kg di peso fresco (fw). A causa della coeluzione dell'isomero vaticanol-C-simile con l'ampelopsina H, la somma di entrambi i composti è stata espressa come equivalenti di ampelopsina H. A causa della coeluzione di *Z + E-miyabenol C* la somma di entrambi i composti è stata espressa come equivalenti di *Z miyabenol-C* e similmente la somma di *Z + E-ω-viniferina* è stata espressa come equivalenti di *E-ω-viniferina*. Le strutture di tutti i composti sono riportate in Figura 1.

Tab. 5 - Riproducibilità fra annate. Concentrazione media (ug/g fw), Deviazione standard (Sd) e Coefficiente di variazione (cv) sono stati ottenuti considerando la seconda e terza foglia di ciascun genotipo in tre annate successive a 6 dpi dopo infezione con *P. viticola*

	<i>trans-piceid</i>	<i>trans-resveratrol</i>	<i>pallidol</i>	<i>ampelopsin D+ quadragularin A (1:1)</i>	<i>isohopeaphenol</i>	<i>Ampelopsin H + vaticano 1 C isomer</i>	<i>(+)-E-ε-viniferin</i>	<i>Z+E-miyabeanol C</i>	<i>Z+E-ω-viniferin</i>	<i>α-viniferin</i>	<i>E-cis-miyabeanol C</i>	<i>trans-pterostilbene</i>
21/103												
average	5.2	11.0	22.52	21.4	1214.8	143.6	32.3	42.5	40.2	44.0	45.5	nd
Sd	2.5	4.1	19.82	20.9	1948.5	150.6	30.7	41.9	40.9	48.1	43.4	nd
cv (%)	47.9	37.4	88.1	97.8	160.4	104.9	95.0	98.5	101.6	109.4	95.5	
21/74												
average	5.1	11.7	24.71	192.5	112.2	33.3	15.6	21.5	22.5	12.8	27.0	nd
Sd	1.4	8.9	29.75	329.5	139.7	41.7	20.8	25.8	32.7	14.9	35.8	nd
cv (%)	26.6	75.8	123.4	171.2	124.6	125.1	133.8	119.9	145.7	116.7	133.0	

Risultati e discussione

Validazione del metodo.

La soglia di rilevabilità (LOD) e la soglia di quantificazione (LOQ) per ogni singolo composto sono stati stimati sperimentalmente a tre e dieci volte il rapporto segnale-rumore (S/N) rispettivamente. I valori ottenuti nelle misure UV-Vis sono indicate nella Tabella 2. Le curve di calibrazione sono lineari a concentrazioni comprese tra 0,1 - 20 mg/L. Il coefficiente R² era ≥ 0,9981. La ripetibilità strumentale è stata misurata ripetendo 14 iniezioni consecutive della miscela standard (*trans-piceide*, *trans-resveratrolo*, *isohopeaphenolo* e *α-viniferina*). I coefficienti di variazione del segnale DAD sono stati i seguenti: *trans-piceide* CV (%) 0,3, *trans-resveratrolo* 0,2, *isohopeaphenolo* 1,5 e *α-viniferin* 2,7. Tali valori sono nel range tipico osservato fra ripetizioni tecniche. Questo aspetto non è stato indagato ulteriormente, poiché è principalmente la variabilità biologica che deve essere considerata essendo molto più elevata, come riportato più avanti in questo articolo.

Analisi dell'accumulo di viniferine nelle foglie in diversi momenti dopo l'infezione con *P. viticola*.

Al fine di misurare la sintesi di stilbenoidi nel tempo, la terza foglia di ciascuna pianta è stata analizzata a tempi diversi dopo l'infezione (0, 2, 6 giorni post-infezione). La terza foglia è stata scelta perché secondo la letteratura le foglie molto giovani e molto vecchie non sintetizzano elevate concentrazioni di stilbeni (Stein et al. 1985, Dercks e Creasy 1989). Nelle foglie dei tre genotipi raccolte al tempo 0, non è stata trovata alcuna viniferina, con l'eccezione di *trans-resveratrolo* nel genotipo 21/122 (Tabella 3). Durante i primi due giorni post-infezione non sono state evidenziate differenze nei sintomi di infezione. A 2 dpi solo il genotipo 21/122 aveva sintetizzato tutti i composti, ad eccezione del *pallidolo*, mentre nel genotipo 21/103 e in Merzling non è stata rilevata alcuna viniferina. Tuttavia a 6 dpi tutti i genotipi (incluso il 21/122) mostravano la massima concentrazione con un profilo complesso di stilbeni (Figura 2) caratterizzato dalla presenza di *trans-piceide*, *trans-resveratrolo*, (+)-E-ε-viniferina, e anche Z + E-ω-viniferina e pterostilbene, composto precedentemente segnalato come mediatore di resistenza nelle uve (Pezet et al. 2004b). Oltre a questi composti noti, siamo stati in grado di rilevare e quantificare ulteriori 7 stilbenoidi, che sono stati caratterizzati recen-

temente (Mattivi et al., 2011). In questo lavoro per la prima volta la maggior parte di essi viene incluso in un metodo analitico e quantificato. Con l'eccezione del *trans-pterostilbene* nel genotipo 21/103, tutti gli altri stilbeni sono stati trovati in tutti i campioni analizzati. Inoltre, abbiamo osservato la formazione di un dimero fenolico (picco 1 in Figura 2) derivato dalla condensazione di (+)-catechina e acido caffeico, già caratterizzato in una parte dello studio precedente (Mattivi et al., 2011), e non ulteriormente indagato.

Lavorando con una popolazione di vite diversa, Pezet et al (2004b) hanno riportato un precoce aumento fino a 2 dpi e successiva riduzione delle viniferine nelle foglie infettate con *P. viticola*. Nel nostro esperimento, l'accumulo di viniferine nelle foglie è risultato ritardato rispetto agli esperimenti di Pezet et al. (2004b). Nel caso della nostra popolazione di vite, un tempo di induzione di 6 dpi sembrava il momento più appropriato per saggiare la produzione di fitoalessine.

Una volta selezionato un genotipo con una elevata risposta sarebbe anche interessante dal punto di vista pratico studiare la presenza di differenti cinetiche di risposta, come osservato nel caso di 21/122 (Tabella 3).

Per una caratterizzazione

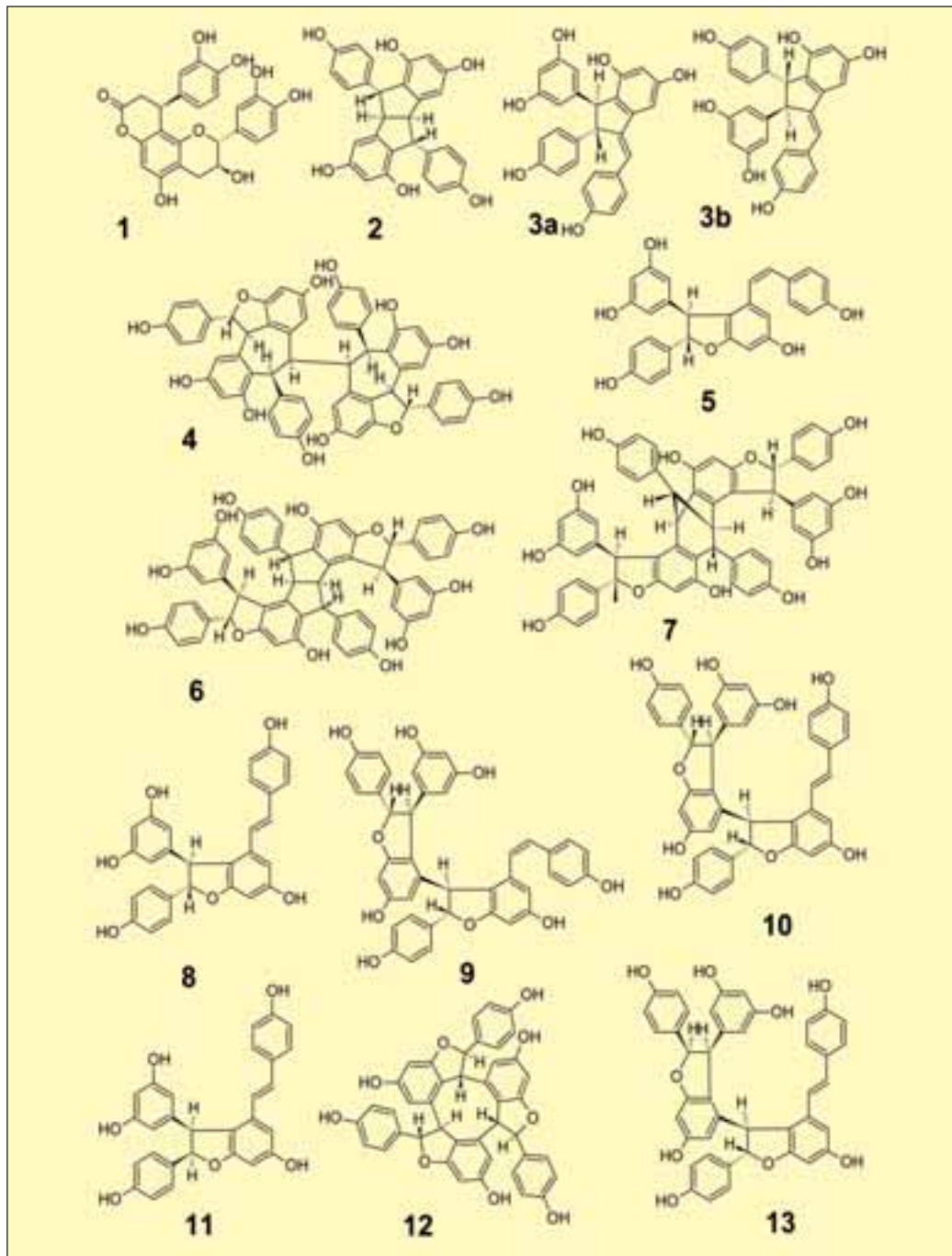
dettagliata di un genotipo resistente andrà considerato anche il tempo di induzione delle fitoalessine, dato che per viti infettate con *Botrytis cinerea* è stato suggerito che non solo la quantità, ma anche la velocità di produzione di stilbenoidi correlavano con la loro resistenza alla crescita del micelio di *Botrytis* (Stein e Blaich 1985).

Accumulo di viniferine in foglie diverse dopo l'infezione con *P. viticola*.

La sintesi di stilbenoidi è anche strettamente dipendente dalle condizioni ambientali e dalla fase di sviluppo della pianta, in quanto esse possono influenzare il processo di infezione. È stato infatti riportato che le foglie molto giovani e molto vecchie non sintetizzano livelli elevati di stilbeni, probabilmente a causa dello sviluppo incompleto degli stomi (Stein et al. 1985, Dercks e Creasy 1989).

Tutte le foglie di ogni replica state analizzate a 6 dpi, al fine di verificare la variabilità nell'accumulo di stilbeni tra foglie diverse. È stato evidenziato che l'accumulo di viniferine nelle diverse foglie non era la stessa sia nei due individui F1 che in Merzling (Figura 3). Nel genotipo 21/103 le concentrazioni più elevate sono state riscontrate nelle foglie 2 e 3 e il più basso nella foglia apicale. Il contenuto di viniferine era

Fig. 1 - Strutture delle viniferine accumulate nelle foglie degli ibridi di *Vitis vinifera* (Merzling x Teroldego) in seguito ad infezione con *Plasmopara viticola*



altamente variabile e generalmente più alto nelle seconde, terze e quarte foglie (Figura 3). La seconda e quinta foglia hanno mostrato il più alto contenuto di viniferine nel genotipo 21/122, mentre nel Merzling è stata osservata una diversa distribuzione, infatti la concentrazione più alta è stata trovata nell'ottava foglia e il secondo più alto nella quarta foglia. I nostri risultati non sono in completo

accordo con la letteratura, in particolare per il campione Merzling, in quanto è stato riportato che le foglie molto giovani e molto vecchie non sintetizzano elevate concentrazioni di stilbeni (Dercks e Creasy, 1989). Tuttavia altri autori hanno suggerito che le foglie giovani campionate in giugno-luglio nelle posizioni comprese fra la 4^a e la 7^a del germoglio sono le più adatte per studiare gli stilbeni indotti

da *Botrytis* (Stein e Blaich, 1985). Nel nostro caso si può concludere che l'intensità di induzione di stilbeni non mostra una correlazione chiara e omogenea con la posizione delle foglie sul germoglio.

Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo quindi deciso di effettuare l'analisi delle viniferine nell'incrocio Merzling x Teroldego (Malacarne et al., 2011) raggruppando le seconde e terze foglie.

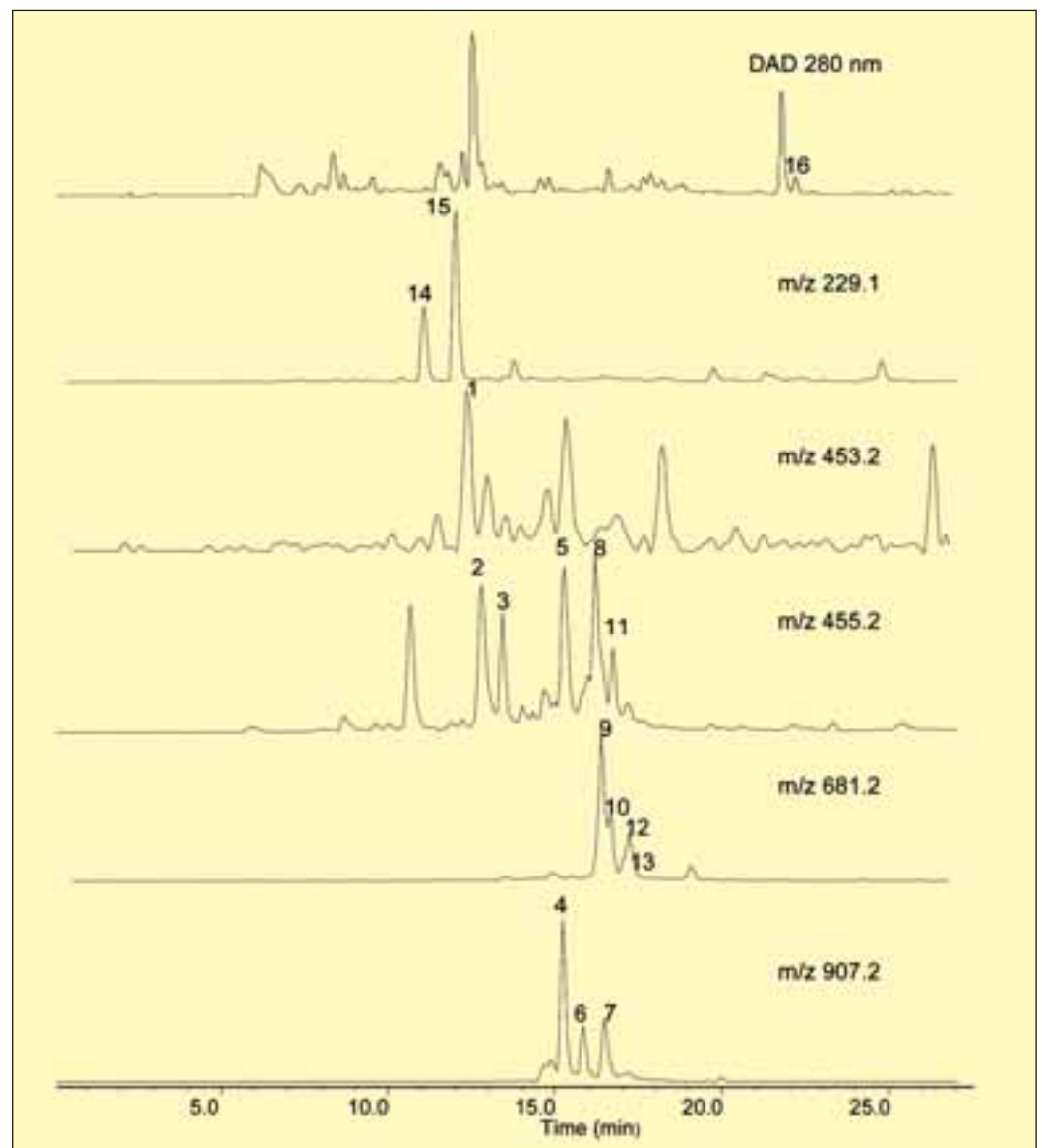
L'accumulo di viniferine dopo l'infezione con *P. viticola*: riproducibilità tra le piante.

Per questa prova sono stati scelti i genotipi 21/122 e Merzling. Per valutare la riproducibilità sono state considerate come ripetizioni la seconda e terza foglia infetta di piante differenti. La deviazione standard più alta in entrambi i campioni è stata misurata per l' α -viniferina (Tabella 4).

Nel genotipo 21/122, la variabilità tra le piante è stata più bassa per *trans*-resveratrollo (14,6%) e *trans*-pterostilbene (10%), e la più alta per α -viniferina (69,9%) e E-miyabenol C (45,3%). La situazione era diversa per Merzling, la variabilità minima è stata trovata per *trans*-piceide (15,2%) e Z + E- ω -viniferina (11,2%), mentre E-miyabenolo C e pallidolo hanno mostrato la variabilità maggiore tra piante diverse, 97,1 % e 61,5% rispettivamente. In generale, ci si aspetterebbe che la variabilità dipenda fortemente dalla via biosintetica del composto, poiché alcuni composti, come i monomeri, devono accumularsi inizialmente e quindi diminuire per generare gli oligomeri minori, che nel tempo vengono poi convertiti in oligomeri superiori mediante meccanismi ossidativi. Purtroppo ad oggi, non è però disponibile un modello meccanicistico dettagliato.

In conclusione, i dati delle infezioni *in vivo* hanno mostrato una notevole variabilità di tutti i composti e i risultati sperimentali ci hanno dato una stima dell'ordine di grandezza di variabilità biologica. La presenza di tale forte variabilità suggerisce l'opportunità di

Fig. 2 - Cromatogramma del profilo di viniferine nel genotipo 21/122 144 ore dopo l'infezione con *P. viticola* (modalità SIM e traccia DAD)



Legenda: 1 prodotto di condensazione fra *trans*-caffaic acid e (+)-catechin; 2 pallidol, 3 ampelopsin D + quadrangularin A; 4 isohopeaphenol; 5 *Z*- ϵ -viniferin; 6 ampelopsin H; 7 vaticanol C-like; 8 (+)-*E*- ϵ -viniferin; 9 *Z*-miyabenol C; 10 *E*-miyabenol C; 11 *Z*+*E*- ω -viniferin; 12 α -viniferin; 13 *E*-cismiyabenol C; 14 *trans*-piceid; 15 *trans*-resveratrol; 16 *trans*-pterostilbene.

includere un certo numero di repliche biologiche (piuttosto che tecniche) nel disegno sperimentale.

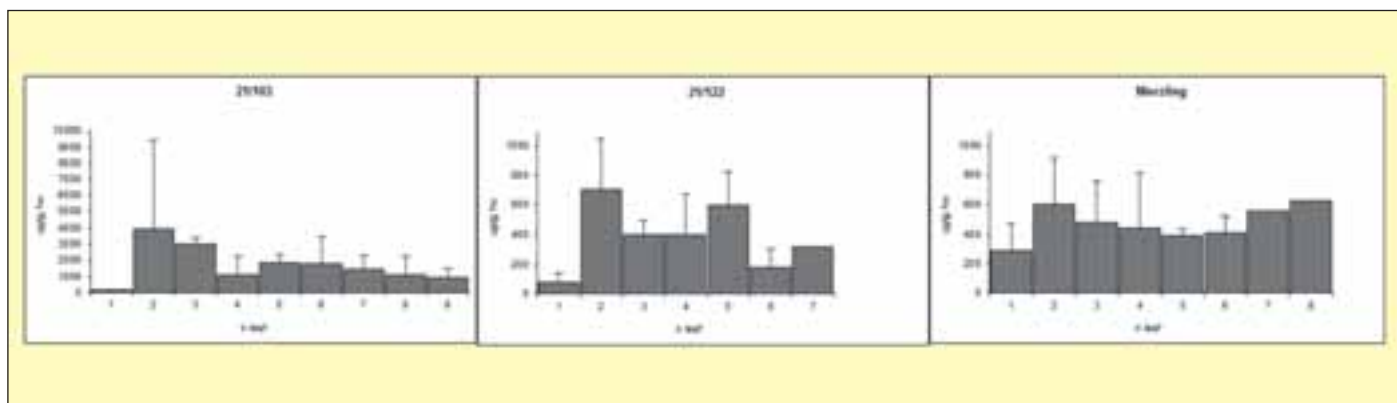
L'accumulo di viniferine dopo l'infezione: riproducibilità tra annate

La suscettibilità di una pianta all'infezione va spesso verificata in diverse annate. Una sola osservazione non può essere conclusiva, ed è possibile perdere piante o ripetizioni quando si lavora mediante infezione *in vivo* di una barbatella. Per la prova di riproducibilità tra gli anni è stato analizzato il contenuto di

stilbeni dei genotipi 21/103 e 21/74 per tre anni consecutivi. Le seconde e terze foglie sono state raccolte a 6 dpi da tre piante diverse per ogni genotipo. I risultati di questo esperimento sono riportati in Tabella 5. Le variazioni tra gli anni erano molto più elevate rispetto alle variazioni tra piante dello stesso anno (Tabella 4). Nel caso del genotipo 21/103 solo *trans*-piceide e *trans*-resveratrolo erano inferiori al 50% coefficiente di variazione (CV), mentre nel caso di Merzling solo *trans*-piced aveva un CV relativamente basso (26,6%).

Tutti gli altri composti mostravano CV superiori al 50%, e come caso estremo per ampelopsina D + quadrangularina A è stato registrato un CV di 171,2%. Tali valori di variabilità biologica non erano inaspettati in quanto le barbatelle e la raccolta dell'inoculo naturale di *P. viticola* sono stati preparati nelle diverse stagioni e sono quindi fattori di variabilità aggiuntiva. Tuttavia, anche nei casi di estrema variabilità crediamo che ci si possa aspettare che l'ordine di grandezza della concentrazione assoluta di stilbeni prodotta in annate diverse sia conserva-

Fig. 3 - Valore medio della concentrazione di viniferine totali (ug/g fw) nelle diverse foglie a 6 giorni dall'infezione con *P. viticola*. La deviazione standard è riportata nei casi in cui erano disponibili 2 o 3 foglie



to ed utilizzabile per evidenziare i genotipi con risposta più elevata. Alla luce di questi dati è consigliabile analizzare i genotipi di vite in più stagioni prima di trarre qualsiasi conclusione così da rendere veritiera la caratterizzazione chimica.

Considerazioni conclusive

È stato sviluppato e validato su un periodo di 3 anni un nuovo metodo di analisi degli stilbeni che può essere applicato in numerosi studi. Il metodo che combina HPLC-DAD e MS è stato validato per l'analisi dell'intera classe degli stilbeni trovati in foglie di vite dopo l'infezione con *P. viticola*.

Il processo di infezione di questo oomicete è strettamente dipendente dalle condizioni ambientali e dalle fasi di sviluppo della pianta che si riflettono sul processo di infezione (Stein et al. 1985, Dercks Creasy e 1989). Quindi due fattori cruciali sono stati valutati, il tempo di campionamento dopo l'infezione e il tipo di foglie più sensibili alle infezioni fungine, così come le principali fonti di variabilità biologica. Il metodo HPLC-DAD-MS descritto in questo lavoro fornisce la base per la misura in una sola analisi di resveratrolo, piceide, pterostilbene e l'intera classe di stilbenoidi in genotipi di vite infettati da *P. viticola*.

Ringraziamenti. Questo lavoro è stato supportato dal Progetto "Resveratrolo" e ADP 2009, entrambi finanziati dalla Provincia Autonoma di Trento.

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di un nuovo metodo di separazione cromatografica e quantificazione accurata delle viniferine presenti nelle foglie di vite dopo l'infezione con *Plasmopara viticola*. È stato condotto su una popolazione interspecifica F1, derivante dall'incrocio tra Merzling e Teroldego, il primo parzialmente resistente e il secondo suscettibile a *Plasmopara viticola*. L'analisi è stata condotta mediante uno ZQ Waters LC-MS, utilizzando una colonna a fase inversa. Il metodo è stato validato per l'analisi metabolica e permette l'accurata identificazione e quantificazione di *trans*-resveratrolo, *trans*-piceide, *trans*-pterostilbene, un prodotto di condensazione tra (+)-catechina e acido caffeico, e tutta la classe delle viniferine in foglie di vite infettate con *Plasmopara viticola*, grazie all'uso dei corrispondenti standard. Sei giorni dopo l'infezione è stato riscontrata la concentrazione massima di stilbenoidi in tutti i genotipi testati. Inoltre l'intensità di induzione di stilbeni non mostra una correlazione chiara con la posizione delle foglie nel germoglio.

A nostra conoscenza questo è il primo articolo che riporta una analisi metabolica dettagliata, con identificazione e quantificazione, delle principali viniferine presenti in foglie di vite dopo infezione con *Plasmopara viticola*, mediante uso degli standard corrispondenti.

Adattamento italiano del manoscritto dal titolo "Profiling and accurate quantification of trans-resveratrol, trans-piceid, trans-pterostilbene and 11 viniferins induced by Plasmopara viticola in partially resistant grapevine leaves" degli autori Vrhovsek U., Malacarne G., Masuero D., Zulini L., Guella G., Stefanini M., Velasco R. e Mattivi F. pubblicato dalla rivista Australian Journal of Grape and Wine Research e disponibile in versione integrale al sito <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0238.2011.00163.x/abstract>.

Bibliografia

Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R. and Joubert, J.M. (1996) Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 1979-1981.

Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A. and Bessis, R. (1997) Biological activity of resveratrol, a stil-

benic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* **23**, 1689-1702.

Barlass, M., Miller, R.M. and Douglas, T.J. (1987) Development of Methods for Screening Grapevines for Resistance to Infection by Downy Mildew.2. Resveratrol Production. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**, 65-68.

Bru, R., Selles, S., Casado-Vela, J., Belchi-Navarro, S. and Pedreno, M.A. (2006) Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 65-71.

Cantos, E., Espin, J.C. and Tomas-Barberan, F.A. (2001) Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: A new "functional" fruit? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 5052-5058.

Dercks, W. and Creasy, L.L. (1989) The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara Viticola* grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **34**, 189-202.

Douillet-Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M. and Bessis, N. (1999) Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4456-4461.

- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F. and Velasco, R. (2008) Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 11773-11785.
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O., Gindro, K. (2009) Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 827-837.
- Hoos, G. and Blaich, R. (1990) Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Journal of Phytopathology* **129**, 102-110.
- Jeandet, P., Breuil, A.C., Adrian, M., Weston, L.A., Debord, S., Meunier, P., Maume, G. and Bessis, R. (1997) HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Analytical Chemistry*, **69**, 5172-5177.
- Jeandet, P. (2002) Phytoalexins from the vitaceae: Current problems and future prospects. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **36**, 107-107.
- Jerkovic, V., Nguyen, F., Nizet, S. and Collin, S. (2007) Combinatorial synthesis, reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography elution data and liquid chromatography/positive atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectra of methoxylated and glycosylated resveratrol analogues. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**, 2456-2466.
- Korhammer, S., Reniero, F. and Mattivi, F. (1995) An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry* **38**, 1501-1504.
- Langcake, P. and Pryce, R.J. (1976) Production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Plant Physiology and Plant Pathology* **9**, 77-86.
- Langcake, P. and Pryce, R.J. (1977) Production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to UV Irradiation. *Phytochemistry* **16**, 1193-1196.
- Mattivi, F., Reniero, F. and Korhammer, S. (1995) Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1820-1823.
- Malacarne, G., Vrhovsek, U., Zulini, L., Cestaro, A., Stefanini, M., Mattivi, F., Delledonne, M., Velasco, R. and Moser, C. (2011) Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated to stilbenoids accumulation and to specific transcriptional responses. *BMC Plant Biology*, in press.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Malacarne, G., Masuero, D., Zulini, L., Stefanini, M., Moser, C., Velasco, R. and Guella, G. (2011) Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites accumulating in the leaves of hybrid *V. vinifera* (Merzling x Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 5364-5375.
- Pezet, R. and Pont, V. (1988) Identification of pterostilbene in grape berries of *Vitis Vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry* **26**, 603-607.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J.B., Tabacchi, R., Gindro, K. and Viret, O. (2003). delta-Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 5488-5492.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. and Richter, H. (2004a) Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis*, **43**, 145-148.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. and Spring, J.L. (2004b) Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**, 297-303.
- Sarig, P., Zutkhi, Y., Monjauze, A., Lisker, N. and Ben-Arie, R. (1997) Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **50**, 337-347.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Faivre, B., Bessis, R. and Fournioux, J.C. (1995) Development of methods, using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica* **86**, 41-47.
- Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D. and Huguency, P. (2008) A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiology* **148**, 1630-1639.
- Stein, U., Heintz, C. and Blaich, R. (1985) The *In vitro* examination of grapevines regarding resistance to powdery and downy mildew. *Journal of Plant Diseases and Protection* **92**, 355-369.
- Stein, U., Blaich, R. (1985) Studies on stilbene production and susceptibility to *Botrytis* in *Vitis* species. *Vitis* **24**, 75-87.
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.C., Merillon, J.M. and Teissedre, P.L. (2005) Determination of stilbenes (delta-viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 5664-5669.
- Zamboni, A., Gatto, P., Cestaro, A., Pilati, S., Viola, R., Mattivi, F., Moser, C. and Velasco, R. (2009) Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. *BMC Genomics*, **10**, 363.