



Sociedad
Española
de **Ciencias
Hortícolas**

86

**OCTUBRE
2021**

ACTAS DE HORTICULTURA

**Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de
Ciencias Hortícolas**

**XVI Congreso Nacional de
Ciencias Hortícolas**

**Córdoba
17-21 de octubre de 2021**

Identificación e importancia relativa de compuestos fenólicos en injertos de albaricoquero de (in)-compatibilidad conocida

P. Irisarri^{1,2}, J. González^{1,2}, P. Errea^{1,2} y A. Pina^{1,2}

¹ Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España

² Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, España

Autor para correspondencia: pirisarri@cita-aragon.es

Palabras clave: compatibilidad de injerto, perfiles fenólicos, *Prunus armeniaca* L., TIMS-TOF, UHPLC

Resumen

La relación existente entre la acumulación de compuestos fenólicos y la respuesta de incompatibilidad de injerto es un área de interés en la búsqueda de un mecanismo de detección precoz. El objetivo de este estudio fue caracterizar el perfil de compuestos fenólicos en combinaciones de injerto con distinto grado de compatibilidad, tanto en el patrón como en la variedad, para evaluar su implicación en la formación de uniones incompatibles. Los compuestos fenólicos se analizaron en tejidos de hoja y corteza de heteroinjertos compatibles ('Paviot' sobre 'Mariana 2624') e incompatibles ('Moniquí' sobre 'Mariana 2624') un mes después del injerto, utilizando un sistema de cromatografía líquida UHPLC Elute acoplado a un espectrómetro de masas TIMS-TOF. El análisis de los compuestos fenólicos mayoritarios y minoritarios de las distintas muestras en disolución permitió su identificación a partir de su masa molecular. Los resultados obtenidos mostraron diferencias en el perfil de compuestos fenólicos entre diferentes tejidos, combinaciones de injerto y zonas estudiadas. Las diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en el contenido fenólico de estas combinaciones podrían estar implicadas en los mecanismos metabólicos que intervienen en la formación del injerto y condicionar el desarrollo de uniones compatibles o incompatibles.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han identificado importantes rutas metabólicas implicadas en la respuesta de incompatibilidad de injerto en frutales, entre las que destaca la ruta fenilpropanoide (Pina et al., 2017). Esta ruta desempeña un papel fundamental en la formación de la unión de injerto, pero cuando se producen reacciones de incompatibilidad se observa una acumulación de estos compuestos que afectan a los procesos de diferenciación celular y falta de lignificación en la unión (Assunção et al., 2021; Pina et al., 2017). Asimismo, investigaciones recientes han puesto de manifiesto un aumento en la expresión de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) en uniones incompatibles que refleja una falta de adaptación entre las dos partes que forman la unión y se ha correlacionado con una mayor presencia de compuestos fenólicos en el interior de vacuolas y pared celular (Irisarri et al., 2021; Loupit and Cookson, 2020). La relación existente entre las acumulaciones de estos compuestos con los problemas de incompatibilidad ha sido estudiada en distintas especies: albaricoquero, peral, cerezo, vid (Loupit and Cookson, 2020; Pina et al., 2017). Sin embargo, existe un gran desconocimiento sobre los perfiles fenólicos implicados en la reacción de incompatibilidad patrón-variedad no sólo en la zona de unión sino en otros tejidos de plantas injertadas. El objetivo de este estudio fue caracterizar el perfil de compuestos fenólicos que se acumulan en

la zona de unión, las zonas adyacentes del injerto (tanto en el patrón como en la variedad) y hojas de la variedad, para evaluar su implicación en la formación de uniones incompatibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Se establecieron heteroinjertos de los cultivares de albaricoquero de tendencia compatible 'Pavot' e incompatible 'Moniquí' injertados sobre el patrón 'Mariana 2624'. El material sin injertar y homoinjertos del patrón (Mn/Mn) se utilizaron como controles. Los injertos fueron realizados en umbráculo sobre patrones de un año de edad con un diámetro entre 7-10 mm utilizando el método de injerto 'chip' (Howard, 1977), en primavera de 2018. Se realizaron entre 12-30 injertos por combinación y se recolectaron muestras de 5 repeticiones biológicas de distintos tejidos 30 días después del injerto: de corteza (floema y cambium) en la zona de unión, 1 cm por debajo y 1 cm por encima del injerto, y en las hojas de la variedad (Fig. 1). Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80°C hasta su posterior liofilización. Para la determinación de los perfiles fenólicos, las muestras se liofilizaron en un liofilizador Virtis Genesis 25L (Huco Erlöss, SA/Thermo Fisher Scientific, Madrid, España).

Determinación de compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó tomando 0.050 g de material liofilizado y fue extraído en 3 ml de solución de extracción (80:20 metanol:agua), y 2mM NaF para prevenir la oxidación (reacción de la polifenoloxidasas) durante la extracción en un baño de ultrasonido (Bactosomic 14.2, Bandelin, Berlín, Alemania) con hielo durante 1 hora, siguiendo el procedimiento descrito por Tomás-Barberán et al. (2001) con modificaciones. A continuación, se centrifugaron las muestras a 9000 rpm durante 7 min a 5 °C y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de poliamida Chromafil Xtra PA-45/25 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Las muestras se guardaron a -20°C hasta ser utilizadas y se inyectaron en un sistema cromatografía líquida UHPLC Elute (Bruker, Bremen, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas TIMS-TOF, en el Servicio de Espectrometría de Masas ICMA, CSIC de la Universidad de Zaragoza. Por último, se procedió al análisis de elementos mayoritarios y minoritarios de muestras en disolución mediante el programa Metaboscape v.5. Esta técnica permite la caracterización de sustancias a partir de su masa molecular y la masa de iones obtenidos por la fragmentación molecular y puede ser utilizada tanto en análisis cualitativo como cuantitativo, con una alta sensibilidad que permite llegar a muy bajos límites de detección. Los reactivos químicos usados en el procedimiento se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) con grado de pureza HPLC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección de compuestos fenólicos en estados tempranos del desarrollo del injerto es un área de interés debido al bloqueo que pueden ejercer estos compuestos sobre el establecimiento de nuevas conexiones vasculares entre el patrón y la variedad, produciendo reacciones de incompatibilidad de injerto en diversas especies (Pina et al., 2017). En este estudio, el análisis de los compuestos fenólicos mayoritarios y minoritarios de las distintas muestras con distinto grado de compatibilidad de injerto, permitió su identificación a partir de su masa molecular, y los compuestos más destacados fueron: quercetina-3-o-glucósido, procianidina A1, procianidina B1, procianidina B2, catequina, epicatequina, ácido glucocafeico, ácido clorogénico, ácido isovainílico, quercetina-3-o-rutinósido, ácido ferúlico, aldehído protocatéquico, florizina y procianidina C1/C2. Entre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular sobresalen las catequinas, epicatequinas, aldehído protocatéquico y quercetina (Tabla 1). Los resultados obtenidos muestran una mayor o menor concentración

relativa de compuestos fenólicos específicos en hojas que en corteza. Asimismo, la concentración relativa de compuestos fenólicos varió dependiendo de la combinación y zona estudiada, con un mayor efecto del patrón sobre la variedad que de la variedad sobre el patrón, y una mayor acumulación de procianidina A1, procianidina B1, catequina, epicatequina, ácido glucocafeico y procianidina C1/C2 arriba de la unión incompatible respecto de la compatible, de acuerdo con lo observado en otros estudios (Canas et al., 2015; Hudina et al., 2014; Magnus et al., 2020). Estas diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en el contenido fenólico de estas combinaciones podrían resultar en disfunciones metabólicas que condicionarán el desarrollo de una unión compatible o incompatible. Futuros ensayos con diferentes variedades y patrones permitirán validar los perfiles fenólicos asociados a la reacción de incompatibilidad en albaricoquero y su estudio en nuevas selecciones de comportamiento desconocido al injerto.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyectos RTA2015-00046 y FP2015-00015, y por el grupo consolidado de investigación A12 del Gobierno de Aragón.

Referencias

- Assunção, M., Tedesco, S., Fevereiro, P., 2021. Molecular Aspects of Grafting in Woody Plants. *Annu. Plant Rev. online, Major Reference Works* 4, 87–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0751>
- Canas, S., Assunção, M., Brazão, J., Zanol, G., Eiras-Dias, J.E., 2015. Phenolic compounds involved in grafting incompatibility of vitis spp: Development and validation of an analytical method for their quantification. *Phytochem. Anal.* 26, 1–7. <https://doi.org/10.1002/pca.2526>
- Howard, B., 1977. Chip budding fruit and ornamental tree. *Proceedings Int. Plant Propag. Soc.* 27, 357–366.
- Hudina, M., Orazem, P., Jakopic, J., Stampar, F., 2014. The phenolic content and its involvement in the graft incompatibility process of various pear rootstocks (*Pyrus communis* L.). *J. Plant Physiol.* 171, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.022>
- Irisarri, P., Errea, P., Pina, A., 2021. Physiological and molecular characterization of new apricot cultivars grafted on different prunus rootstocks. *Agronomy* 11, 1–19. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081464>
- Loupit, G., Cookson, S.J., 2020. Identifying Molecular Markers of Successful Graft Union Formation and Compatibility. *Front. Plant Sci.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610352>
- Magnus, S., Gazdik, F., Anjum, N.A., Kadlecova, E., Lackova, Z., Cernei, N., Brtnicky, M., Kynicky, J., Klejdus, B., Necas, T., Zitka, O., 2020. Assessment of antioxidants in selected plant rootstocks. *Antioxidants* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox9030209>
- Pina, A., Cookson, S., Calatayud, A., Trinchera, A., Errea, P., 2017. Physiological and molecular mechanisms underlying graft compatibility, in: Colla, G., Perez-Alfocea, F., Schwarz, D. (Eds.), *Vegetable Grafting: Principles and Practices*. CABI Publishing, UK, pp. 132–154.
- Tomás-Barberán FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse Al, Hess-Pierce B and Kader AA, HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolics compounds in nectarines, peaches and plums. *J Agric Food Chem* 49: 4748-4760 (2001).

Tabla 1. Compuestos fenólicos mayoritarios y sus masas moleculares determinadas en combinaciones de injerto de albaricoquero sobre ciruelo 30 días después del injerto.