

## L'analisi dei composti polifenolici come metodo predittivo per valutare la compatibilità di innesto di *Castanea* spp. su portinnesti clonali

Dario Donno<sup>1,2</sup>, Maria Gabriella Mellano<sup>1,2</sup>, Gabriele Loris Beccaro<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agriculture, Forestry and Food Science – DISAFA, University of Torino

<sup>2</sup>Chestnut R&D Center, Chiusa Pesio (CN)

### Introduzione

L'innesto, tecnica di propagazione antica, è come noto una pratica importante nella produzione vivaistica dell'albero da frutto per assicurare elevata efficienza della coltura, alta qualità dei frutti, buona adattabilità ambientale e bassa suscettibilità a parassiti e malattie. L'innesto è, però, un complesso processo biochimico e strutturale che inizia con una risposta iniziale della ferita, seguita da una formazione di callo e dalla creazione di un cambio continuo e di un sistema vascolare funzionale tra i due soggetti dell'innesto. Generalmente marza e portainnesto appartengono alla stessa specie botanica per evitare incompatibilità, ma è pratica comune anche l'uso di genotipi diversi appartenenti a specie differenti: questa pratica, però, non dà luogo sempre a compatibilità d'innesto (Bounous e Marinoni, 2005).

Il ruolo dei composti polifenolici nella compatibilità dell'innesto è stato ampiamente studiato in diverse specie come *Pyrus communis* L. e *Vitis* spp. (Assunção *et al.*, 2016, Hudina *et al.*, 2014), mentre non sono tuttora presenti studi su *Castanea* spp.: queste molecole svolgono un ruolo importante durante la fase *callusing*, dove si verificano un'intensa produzione e il conseguente accumulo di metaboliti secondari. Questo accumulo nei tessuti della ferita può causare effetti marcati sulla crescita e sul metabolismo dei germogli. Pertanto, un'analisi compositiva dettagliata e l'identificazione di specifici composti fenolici a livello dell'innesto e nelle zone circostanti (sopra e sotto al punto di innesto) è di grande importanza per valutare il loro ruolo come marcatori di compatibilità tra innesto e portainnesto (Canas *et al.*, 2015). Attraverso il confronto dei livelli dei singoli composti polifenolici all'altezza dell'innesto e delle zone immediatamente sopra e sotto il punto di innesto si possono identificare composti che agiscono come marcatori chimici per la diagnosi precoce della compatibilità (o incompatibilità) dell'innesto. La disponibilità di una tecnica predittiva è di grande interesse

perché consente, ad esempio, la selezione a priori di portinnesti compatibili con i genotipi di interesse.

In questo lavoro è stato studiato un protocollo di estrazione e analisi, attraverso cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), per la determinazione simultanea di acidi fenolici, catechine, tannini e flavonoli, al fine di comprendere il loro comportamento nel metabolismo del sistema innesto-portainnesto, utilizzando combinazioni compatibili e incompatibili di differenti cultivar e specie di *Castanea* spp.

### Materiali e metodi

Sono state utilizzate combinazioni di differenti cultivar (marze) di *Castanea sativa* e *C. mollissima* con nuove selezioni di portainnesti da seme e clonali derivanti da ibridi intraspecifici di *C. sativa*, *C. crenata*, *C. mollissima* e *C. pumila*. A tale scopo, estratti di tessuti di innesto raccolti sopra l'unione dell'innesto, al punto di unione e al di sotto dell'innesto, da ciascuna combinazione ed in fasi cruciali della fenologia dell'innesto (*callusing*, germogliamento e fine ciclo vegetativo), sono stati preparati e analizzati mediante HPLC. Sono stati considerati diversi marcatori chimici: 6 acidi fenolici, 5 flavonoli, 2 catechine e 2 tannini.

Le piante innestate ad hoc per la prova (3 piante per ogni combinazione innesto-portainnesto) sono state conservate per un giorno in cella frigorifera a 4°C e 95% U.R. Il giorno successivo, le piante di ciascuna combinazione sono state recise a 15 cm dall'estremità superiore e i campioni così ottenuti sono stati conservati a -80°C. Successivamente, i campioni sono stati tagliati in tre piccole sezioni (ciascuna di 3 cm di lunghezza): sopra l'innesto (corrispondente alla marza), al punto di innesto e sotto l'innesto (corrispondente al portainnesto). Ogni sezione è stata poi tagliata longitudinalmente per separare i tessuti interni (xilema, floema e cambio) dalla corteccia; le parti sono state macinate in un mortaio con azoto liquido e i tessuti di ogni sezione delle tre piante dello stesso gruppo sono stati poi immediatamente mescolati, pesati e conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione (Canas

\* gabriele.beccaro@unito.it

*et al.*, 2015).

Il materiale vegetale tritato è stato poi posto a macerare in un solvente costituito da metanolo, acqua e acido cloridrico concentrato (95:4.5:0.5, v:v:v) per una notte e poi estratto in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti prima di essere centrifugato a 4.000 giri al minuto per 10 minuti. Gli estratti sono stati filtrati in pre-iniezione mediante filtri circolari (0,45 µm, membrana di politetrafluoroetilene, PTFE) e quindi successivamente analizzato con sistema HPLC-DAD.

Sono stati utilizzati differenti metodi cromatografici per identificare e quantificare i principali composti bioattivi (acidi benzoici, acidi cinnamici, catechine, flavonoli e tannini) e per ottenere un profilo fitochimico specifico. Per le analisi cromatografiche è stato impiegato un HPLC Agilent Technologies (serie 1200) composto da pompa quaternaria, valvola d'iniezione manuale e sample loop di 20 µl, accoppiato ad un rivelatore UV-vis a serie di diodi. In tabella 1 sono descritti i metodi cromatografici utilizzati (Turrini *et al.*, 2019).

I composti polifenolici ricercati sono stati suddivisi in cinque classi: acidi benzoici (acido ellagico e acido gallico), acidi cinnamici (acido caffeico, acido clorogenico, acido cumarico e acido ferulico), catechine (catechina ed epicatechina), tannini (castalagina e vescalagina) e flavonoli (iperoside, isoquercitrina, quercitina, isoquercitina, quercitrina e rutina). I risultati sono stati espressi come mg/100 g di prodotto fresco (FW).

I risultati sono stati analizzati mediante SPSS 22.0 e sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) per il confronto delle medie con il test di confronto multiplo HSD Tukey (Tukey's Honest Significant Difference), al fine di identificare quali valori medi fossero significativamente differenti fra loro.

## Risultati e discussione

Questa ricerca mira ad indagare le differenze nel contenuto di polifenoli in tessuti di *Castanea* spp. di

marza e portinnesto e capire se possano essere usate come marcatori chimici di riconoscimento precoce della compatibilità dell'innesto. La velocità di preparazione dei campioni e l'uso di azoto liquido sono risultati aspetti cruciali per evitare l'ossidazione e l'idrolisi, fenomeni che possono modificare la composizione fenolica dei tessuti di *Castanea* spp.

I composti bioattivi appartenenti alle classi degli acidi cinnamici e dei flavonoli non sono risultati marker di interesse nel riconoscimento precoce della compatibilità dell'innesto. Al contrario acidi benzoici (acido gallico ed acido ellagico), catechine (catechina ed epicatechina) e tannini (castalagina e vescalagina) hanno permesso la definizione di profili specifici per la distinzione tra combinazioni marza-portinnesto compatibili e non compatibili (tab. 2).

In questo caso, nelle sezioni relative al punto di innesto in combinazioni marza-portinnesto incompatibili, acido gallico e catechina sono stati determinati in quantità quasi doppie (19.73±1.32 mg/100 g di prodotto fresco e 15.36±0.19 mg/100 g di prodotto fresco, rispettivamente) rispetto alle stesse sezioni nelle combinazioni compatibili (10.30±0.95 mg/100 g di prodotto fresco e 11.01±0.01 mg/100 g di prodotto fresco, rispettivamente), a sostegno dell'ipotesi che in caso di incompatibilità i bionti tendano a produrre specifici metaboliti secondari come sistema di difesa; acido ellagico ed epicatechina erano invece presenti in quantità simili nelle due combinazioni (fig. 1) come già osservato in altre specie (Assunção *et al.*, 2016, Hudina *et al.*, 2014).

Per quanto riguarda i tannini, invece, castalagina e vescalagina sono risultate maggiormente presenti nelle combinazioni compatibili, probabilmente perché le marze di *C. sativa* erano caratterizzate già in partenza da un maggiore contenuto rispetto a quelle di *C. mollissima*, come confermato dai risultati relativi alle sezioni sopra il punto di innesto.

I risultati ottenuti sono stati analizzati per verificare se il contenuto di specifici polifenoli fosse correlato al livello di compatibilità delle diverse combinazio-

Tab. 1 - Condizioni cromatografiche dei metodi usati per la caratterizzazione degli estratti.

Analisi di Acidi Cinnamici e Flavonoli	Analisi di Acidi Benzoici, Catechine e Tannini
<b>Fase Stazionaria:</b> colonna Kinetex C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Phenomenex)	<b>Fase Stazionaria:</b> colonna Kinetex C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Phenomenex)
<b>Fase mobile:</b> A - 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> B - CH <sub>3</sub> CN	<b>Fase mobile:</b> A - H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> OH / HCOOH (5:95:0,1 v/v/v) B - CH <sub>3</sub> OH / HCOOH (100:0,1 v/v)
<b>Tempo di analisi:</b> 20 minuti	<b>Tempo di analisi:</b> 25 minuti
<b>Flusso:</b> 1,5 mL min <sup>-1</sup> (5% B to 21% B in 17 min + 21% B in 3 min + 2 min conditioning time)	<b>Flusso:</b> 0,6 mL min <sup>-1</sup> (3% B to 85% B in 22 min + 85% B in 1 min + 2 min conditioning time)
<b>Lunghezza d'onda (DAD):</b> 330 nm	<b>Lunghezza d'onda (DAD):</b> 280 nm

Tab. 2 - Esempio di profilo di composti polifenolici selezionati come marker di riconoscimento precoce di compatibilità/incompatibilità tra innesto (*C. sativa* e *C. mollissima*) e portinnesto (ibrido *C. sativa* x *C. crenata*). p.f. = prodotto fresco

Campioni	ID	Acidi benzoici				Catechine				Tannini				
		acido ellagico (mg 100 g p.f.)		acido gallico (mg 100 g p.f.)		catechina (mg 100 g p.f.)		epicatechina (mg 100 g p.f.)		catechinina (mg 100 g p.f.)		vitechinina (mg 100 g p.f.)		
		media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	
Innesto compatibile <i>C. sativa</i> x PI ( <i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i> )	corfeccia marza	MSA1	66.37	1.02	62.62	3.84	n.d.		419.54	15.92	1035.72	32.65	1157.70	20.51
	interna marza	MSA2	2.40	0.11	2.85	0.79	8.02	0.59	n.d.		43.87	2.69	40.32	1.30
	corfeccia portinnesto ibrido	MSA3	17.77	2.90	16.71	2.83	124.88	12.88	418.94	12.88	1057.04	39.99	1331.84	20.59
	interna portinnesto ibrido	MSA4	7.48	0.95	1.39	0.08	9.71	0.14	10.51	0.05	57.05	2.57	41.13	2.26
	corfeccia punto di innesto	MSA5	59.26	1.14	18.96	1.63	n.d.		332.41	13.18	967.31	23.35	1298.63	10.41
	interna punto di innesto	MSA6	5.52	0.32	1.64	0.27	11.01	0.01	n.d.		47.37	1.83	40.73	2.90
Innesto non compatibile <i>C. sativa</i> x <i>C. mollissima</i> x PI ( <i>C. sativa</i> x <i>C. crenata</i> )	corfeccia marza	CH1	85.93	2.37	27.70	1.86	n.d.		184.34	10.23	748.98	23.03	260.01	11.29
	interna marza	CH2	12.23	0.86	4.33	0.64	12.85	0.09	n.d.		23.72	1.50	39.12	1.93
	corfeccia portinnesto ibrido	CH3	47.51	2.02	23.48	1.48	122.36	10.19	336.29	12.04	1048.18	19.42	1348.02	10.53
	interna portinnesto ibrido	CH4	7.06	0.97	8.09	0.03	8.69	0.94	10.59	0.95	43.62	1.18	31.90	1.99
	corfeccia punto di innesto	CH5	59.07	1.43	33.52	2.46	n.d.		320.36	10.95	720.42	11.91	973.60	15.48
	interna punto di innesto	CH6	4.57	0.02	3.94	0.18	15.36	0.19	n.d.		22.75	1.75	28.09	1.49

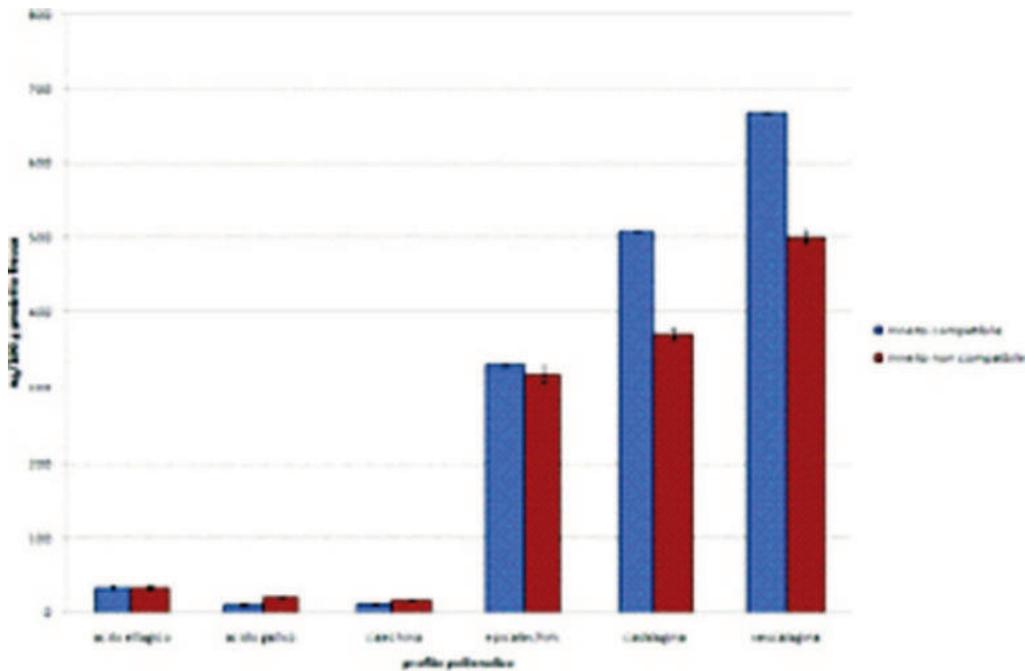


Fig. 1 - Confronto quali-quantitativo tra la composizione polifenolica al punto di innesto in caso di innesto compatibile e non compatibile. Il grafico riporta l'esempio di *C. sativa* e *C. mollissima* innestate su ibrido *C. sativa* x *C. crenata*.

ni di innesto. In particolare, acido gallico e catechina sono risultati i 2 composti maggiormente correlati al differente stato di compatibilità tra le diverse combinazioni di marza e portinnesto testate.

Questa è la prima ricerca in cui sia stato sviluppato un protocollo per la separazione e la quantificazione dei più importanti composti fenolici come marker per il riconoscimento precoce di compatibilità/incompatibilità dell'innesto in *Castanea* spp. L'analisi della composizione fenolica di differenti combinazioni di marze-portinnesti in tre diverse sezioni (sopra, sotto e al punto di innesto) ha evidenziato la potenziale applicabilità di questo metodo al fine di distinguere combinazioni compatibili e incompatibili di *Castanea* spp., ma si dovranno attendere i risultati delle prove in corso per validare ulteriormente il metodo.

**Bibliografia**

ASSUNÇÃO M., CANAS S., CRUZ S., BRAZÃO J., ZANOL, G.C. EIRAS-DIAS J.E. 2016. *Graft compatibility of Vitis spp.: the role of phenolic acids and flavanols*. Sci. Hortic. 207:140-145.

BOUNOUS, G. MARINONI, D.T. 2005. *Chestnut: botany, horticulture, and utilization*. Horticultural reviews 31, 291-347.

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*. Phytochemical Anal. 26, 1-7.

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.)*. Journal of Plant Physiology 171, 76-84.

TURRINI F., DONNO D., BOGGIA R., BECCARO G.L., ZUNIN P., LEARDI R. PITTALUGA A.M. 2019. *An innovative green extraction and re-use strategy to valorize food supplement by-products: Castanea sativa bud preparations as case study*. Food Research International 115, 276-282.