

Contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas

Resveratrol content in leaves of Mexican wild grapevines (*Vitis* spp.)

J. Refugio Tobar-Reyes^{1,2}
Omar Franco-Mora¹
Edgar Jesús Morales-Rosales¹
Juan Guillermo Cruz-Castillo³

Originales: Recepción: 06/06/2009 - Aceptación: 14/10/2009

RESUMEN

El resveratrol es considerado una fitoalexina pues es sintetizado como respuesta a patógenos (factores bióticos) y en condiciones climáticas adversas (factores abióticos). Actualmente existe mucho interés en él por su potencial uso en farmacología como antioxidante. Mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se determinó el contenido de resveratrol en hojas de 18 accesiones de vides nativas de Puebla, México, cuatro de ellas creciendo en cuatro condiciones ambientales diferentes. Las concentraciones fueron muy variables, estimándose 39,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco como valor máximo, mientras que en algunas accesiones no fue posible detectar resveratrol. Se observaron diferencias en el contenido de resveratrol para accesiones creciendo en localidades diferentes, lo que sugiere alta influencia de los factores ambientales sobre la expresión del genotipo en la inducción o inhibición de la biosíntesis de dicho metabolito secundario.

ABSTRACT

Resveratrol is considered a phytoalexin, because it is synthesized in response to pathogens (biotic factors) and adverse climatic conditions (abiotic factors). Nowadays there is great interest in this substance, due to its potential use in pharmacology as an antioxidant. Through high performance liquid chromatography (HPLC), resveratrol content was determined in leaves of 18 accessions of wild grapevines native to Puebla, Mexico; four of them growing in four different environmental conditions. There was high variability in the resveratrol contents, estimating 39.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weight as maximum value whereas in some accessions there was not detection. Differences in the content of resveratrol within the four environments for the different accessions were observed, suggesting high influence of the environment on the genotype, inducing or inhibiting the biosynthesis of that compound.

-
- 1 Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca. México. C. P. 50200. ofrancom@uaemex.mx
 - 2 Escuela de Ingeniería Agrohídrica. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Teziutlán. Puebla. México.
 - 3 Centro Regional Universitario Oriente. Universidad Autónoma Chapingo. Huatusco. Veracruz. México.

Palabras clave

antioxidantes • condiciones ambientales
• HPLC • vid silvestre

Keywords

antioxidants • environmental conditions
• HPLC • wild grapevine

INTRODUCCIÓN

El trans-resveratrol (RSVL; 3,4,5-trihidroxiestilbeno) es un polifenol que pertenece a la familia de los estilbenos (32) y desempeña un papel importante en la calidad de los vinos. Este compuesto fue aislado y reportado por primera vez en hojas de vid (*Vitis* spp.) infectadas con *Botrytis cinerea* (20). Dicho hongo, al infectar frutos de uva, desencadena la producción de resveratrol, aunque también las heridas en los frutos favorecen la producción de este metabolito (4). El resveratrol se encuentra en cacahuates comestibles (*Arachis hypogaea* L.), en algunas bayas de la especie *Vaccinium* (28, 29) y en vino (11, 31). Este metabolito es un compuesto fenólico: dichos compuestos en las plantas pueden inducir funciones de protección contra herbívoros (12, 37), estabilización de estructura celular por ser materia prima para la biosíntesis de lignina, protección contra rayos ultravioleta, intercambio de información con simbiontes, coloración de pétalos, así como efectos biocidas contra bacterias y hongos (12).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* han mostrado el potencial del resveratrol como inhibidor del inicio, promoción y desarrollo de células cancerígenas (1, 15, 16). En otros estudios, la adición de este compuesto al medio de cultivo o a la ingesta incrementó la esperanza de vida en *Saccharomyces cerevisiae* (13), en el pez vertebrado *N. furzeri* (36), así como en lombriz (*C. elegans*) y mosca de la fruta (*D. melanogaster*) (38).

En beneficio del ser humano, se indica que este polifenol posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antifungosas (33); además, muestra acción preventiva en enfermedades del corazón (21, 33). Por otro lado, se detectó que por acción de resveratrol, se inhibió la replicación del virus de la influenza tipo A en sistemas *in vitro* e *in vivo* (26), lo cual resulta interesante porque quizá la molécula ofrezca potencial en inmunología.

El género *Vitis*, el cual presenta una amplia dispersión y variabilidad en México, se ha aprovechado como alimento, en la agroindustria y empíricamente para el cuidado de la salud. La diversidad de vides silvestres tiene potencial para usarse en programas de mejoramiento genético regional (7) para prevenir o atenuar el ataque de plagas graves como la presentada en Europa en el siglo XIX por el insecto denominado filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch.) (5), o bien para seleccionar genotipos con tolerancia a enfermedades (27). La deforestación, con la consiguiente pérdida de la biodiversidad en el mundo, es preocupante; en diversos países, entre ellos México, existe el interés por preservar recursos fitogenéticos de esta especie. En Veracruz, Puebla y en el Estado de México se reportaron más de 200 accesiones, las cuales se encuentran en proceso de mantenimiento, caracterización bioquímica y morfológica e identificación taxonómica (6, 8, 9).

Objetivos

- Caracterizar 18 accesiones de vid silvestre de acuerdo con su contenido de resveratrol en hojas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Conocer si la extracción por infusión modifica el contenido del analito en relación con la extracción metanólica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

Se trabajó con 18 accesiones de vid silvestre (tabla 1) de Puebla y dos cultivares comerciales (*Vitis vinifera* L.) colectados en Saltillo, Coahuila y San Luis de la Paz, Guanajuato. Se cortaron estacas con cuatro yemas y se enraizaron. Los tratamientos bajo estudio fueron las combinaciones producto de las accesiones por las condiciones ambientales (C. A.) donde vegetaron (bancos de germoplasma y localidad de colecta). Los bancos se encuentran en San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla (Acateno: 19°58'31" Lat. N; 97°22'02" Long. O; 1656 msnm), el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México (Toluca: 19°17'30" Lat. N; 99°37'50" Long. O; 2638 msnm) y en Huatusco, Veracruz (Huatusco: 19°08'48" Lat. N; 96°57'00" Long. O; 1344 msnm).

Tabla 1. Origen de las accesiones evaluadas y sitios en donde se conserva el germoplasma.

Table 1. Origin of accessions evaluated and places where the germplasm is conserved.

Accesión	Localidad de origen	Municipio ^a	Colección de germoplasma			
			Huatusco	Acateno	Toluca	Origen
10	Chiautzingo	Atlixco	✓	✓	✓	✓
18	Aire Libre	Teziutlán	✓	✓	✓	✓
19	Aire Libre	Teziutlán	x	✓	✓	✓
22	Ixtlahuaca	Teziutlán	x	✓	✓	✓
23	Chapulco	Tehuacán	x	✓	✓	x
26	Chapulco	Tehuacán	x	✓	✓	✓
27	Chapulco	Tehuacán	✓	✓	✓	✓
29	Chapulco	Tehuacán	✓	✓	✓	✓
31	San Juan Tianguismanalco	Atlixco	✓	✓	✓	x
33	San Juan Tianguismanalco	Atlixco	✓	✓	✓	✓
35	San Juan Tianguismanalco	Atlixco	x	✓	✓	✓
36	Atlixco	Atlixco	✓	✓	✓	x
40	La minera	Teziutlán	x	x	✓	✓
50	Coxcatlán	Tehuacán	x	x	✓	x
53	San Antonio Cañada	Tehuacán	✓	✓	✓	x
64	Juan N. Méndez	Tehuacán	✓	✓	✓	x
65	Juan N. Méndez	Tehuacán	✓	✓	✓	x
99	Tlatlauquitepec	Teziutlán	✓	x	✓	✓
R1	Buenavista, Saltillo	Coahuila	x	✓	x	x
R2	San Luis de la Paz	Guanajuato	x	✓	x	x

^a Fuentes: Franco-Mora *et al.* (8, 9).

R1, R2 materiales de *V. vinifera* L. de huertos frutícolas comerciales.

La toma de muestras se efectuó durante la estación de crecimiento de verano de 2008, directamente en los bancos de germoplasma y en los sitios de origen de algunas accesiones. Las plantas en los bancos de germoplasma (implementados en invernáculos con cubierta plástica) crecieron en macetas de 18 L con una mezcla 1/2/1 de peatmoss/perlita/fibra de coco (v/v/v) como sustrato, que se mantenían a capacidad de campo regando con manguera. El diámetro del tronco al momento de extracción del material no superaba los 2 cm y las ramas secundarias presentaban consistencia leñosa. El tejido vegetal se obtuvo de plantas con cinco o más hojas desplegadas, lo que corresponde a la etapa fenológica número 15 de acuerdo con Lorenz *et al.* (22), seleccionando hojas maduras (14).

Extracción metanólica de resveratrol

El principio general de extracción del resveratrol (35) tuvo ligeras modificaciones y se describe a continuación: de cada planta se pesaron 10 g de hojas frescas (sin pecíolo) jóvenes, por triplicado, e inmediatamente se etiquetaron y colocaron en frascos de vidrio ámbar con 200 mL de etanol y éstos se ubicaron en una hielera hasta llegar al laboratorio, luego permanecieron a -5°C durante 4 días. Se maceró en mortero (modificación incorporada), se tomó un décimo del homogeneizado y se colocó durante una hora en un agitador rotatorio digital (Bigger Bill, Thermolyne) a 100 rpm protegidas de la luz; posteriormente se filtró por gravedad (en lugar de filtrar por vacío) con papel Whatman N° 5. Se tomaron 2 mL de filtrado, se agregaron 5 mL de acetato de etilo y 2,5 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 5% (p/v en agua destilada); se agitó la mezcla diez segundos evitando generar remolino y se evaporó en matraz de bola de 120 mL usando una mantilla de calentamiento. Se resuspendió con 600 µL de acetonitrilo y se filtró (modificación incorporada) con acrodiscos de membrana pvdf de 0,45 µm (Pall sciences) antes de ser inyectados al sistema HPLC.

Contenido de resveratrol en infusión

Se estudió como forma alternativa de extracción de resveratrol a partir de tejido fresco: la realizada mediante infusión de hojas sin pecíolo, para lo cual, en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada se hirvió durante tres minutos 1 g de hojas frescas de la accesión 31 Acateno. Posteriormente se llevó al agitador rotatorio (una hora a 100 rpm protegido de la luz), se filtró y se tomaron 2 mL, se agregaron 0,5 mL de acetato de etilo y 0,25 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 5% (p/v en agua destilada); se agitó la mezcla diez segundos evitando generar remolino y se evaporó en matraz de bola de 120 mL usando una mantilla de calentamiento. Se resuspendió con 60 µL de acetonitrilo, se filtró con acrodiscos y se inyectó al sistema HPLC. El ensayo constó de tres repeticiones por tratamiento y cada tratamiento se inyectó tres veces en el HPLC. Con los contenidos de resveratrol estimados en el HPLC se calcularon los promedios simples para ambos tratamientos y éstos fueron comparados.

Análisis de resveratrol

Se realizaron en un HPLC serie 200 (Perkin Elmer) equipado con un detector ultravioleta-visible (UV-VIS), bomba binaria, degasificador, interfase e inyector manual. Las muestras fueron analizadas a temperatura de laboratorio en una columna Spheryshorb fase reversa C18 5 µm x 250 x 4,6 mm (Brownlee, USA). El control del

equipo y el manejo de archivos se realizaron mediante la versión 6.2 del software TotalChrom Workstation. Como fase móvil se usaron dos soluciones acarreadoras: a) solución buffer de fosfato de potasio 0,02 M a pH 5,5; b) acetonitrilo grado HPLC. Se eluyó bajo las condiciones de un gradiente con duración total de 14 minutos (tabla 2). El nivel de flujo fue 1 mL min⁻¹ permitiendo cuatro minutos de estabilización entre cada inyección.

Tabla 2. Gradiente lineal usado para la separación de resveratrol mediante HPLC-RP.

Table 2. Lineal gradient for the separation of resveratrol by HPLC-RP.

Tiempo (min)	Solvente a (%)	Solvente b (%)
0	70	30
5,0	60	40
10,0	40	60
12,5	40	60
14,0	50	50

La caracterización de la molécula se hizo mediante un estándar interno, para lo cual se preparó una solución de resveratrol (SIGMA) en acetonitrilo (3 mg mL⁻¹) en vial de vidrio color ámbar; a partir de ésta se prepararon siete diluciones (0,3; 0,15; 0,075; 0,0375; 0,01875; 0,00937 y 0,00468 mg mL⁻¹) realizando inyecciones de 30 µL. El detector permaneció a una longitud de onda de 286 nm, el tiempo de retención fue 5,8 minutos.

Con las diluciones se construyó una curva de calibración para el estándar con un coeficiente de determinación (r²) igual a 0,996; con dicha linealidad fueron calculadas las concentraciones del analito en las muestras.

Grados día

Utilizando las temperaturas máximas y mínimas presentadas entre agosto y octubre de 2008 dentro de los invernáculos, se calcularon los grados día considerando como temperatura base 10°C (25).

Procedimiento estadístico

Los resultados fueron manejados de dos formas: en un primer proceso de la información se realizó un análisis de varianza bajo un diseño estadístico completamente al azar: se usó el software Statistical Analysis System (S.A.S.) versión 8.1 y se consideraron las combinaciones de accesiones y condiciones ambientales como tratamientos independientes; en un segundo proceso, se eligieron las accesiones que tuvieron datos en las cuatro condiciones ambientales (C. A.) y se practicó un análisis de varianza bifactorial (a = accesiones y b = C. A.) bajo un diseño estadístico completamente al azar usando el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 10.0.

En ambos procedimientos se realizaron pruebas de separación de medias por Tukey con p < 0,05 de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis individual

Los resultados exhibieron variabilidad (tabla 3) para el carácter bajo estudio encontrándose un contenido máximo de 39,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso fresco (PF).

Tabla 3. Contenido de resveratrol en hojas ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) de vides silvestres (*Vitis* spp.) de Puebla, México.

Table 3. Content of resveratrol in leaves ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW) of wild grapevines (*Vitis* spp.) of Puebla, México.

Tratamiento		Resveratrol	Tratamiento		Resveratrol
Accesión (a)	C. A. (b)	($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)	Accesión (a)	C. A. (b)	($\mu\text{g g}^{-1}$ PF)
18	O	39,51 a	65	T	23,38 b-f
35	O	22,49 b-h	26	T	21,79 b-j
33	O	13,94 d-o	29	T	21,32 b-k
22	O	5,40 m-o	23	T	20,57 b-m
40	O	0,65 o	18	T	11,75 e-o
19	O	0,47 o	40	T	8,10 g-o
29	O	0,07 o	64	T	7,79 h-o
27	O	n.d. o	31	T	7,76 h-o
26	O	n.d. o	19	T	6,63 i-l
99	O	n.d. o	50	T	5,84 l-o
33	A	30,45 a-c	10	T	4,76 n-o
R2	A	23,25 b-g	99	T	3,14 o
31	A	9,64 f-o	36	T	2,69 o
23	A	9,51 f-o	22	T	1,96 o
10	A	6,58 j-o	35	T	0,80 o
53	A	6,14 k-o	27	T	0,59 o
R1	A	5,13 n-o	33	T	n.d. o
65	A	2,92 o	29	H	28,44 a-d
22	A	1,84 o	99	H	26,58 a-e
19	A	1,30 o	65	H	21,85 b-i
36	A	1,15 o	53	H	21,01 b-l
35	A	0,47 o	33	H	18,59 c-n
18	A	0,40 o	27	H	11,32 f-o
64	A	0,26 o	64	H	8,92 f-o
26	A	0,11 o	18	H	5,61 m-o
27	A	0,06 o	36	H	3,93 n-o
29	A	0,04 o	31	H	1,98 o
53	T	34,39 ab	10	H	1,75 o

Los datos son las medias de tres repeticiones; valores con diferente letra son estadísticamente distintos según Tukey ($P \leq 0,05$) ($n = 3$).
n.d. = no detectado. Cero, para proceso estadístico.

En relación con el presente experimento, podría pensarse que la variabilidad encontrada para las accesiones dentro de condiciones ambientales estuvo dada por el factor genético. Además del factor genético (especie, cultivar, accesión, etc.), se podría creer que el mecanismo que induce resveratrol responde diferencialmente según los factores de inducción; por ejemplo, mediante la infección de hojas con *Botrytis cinerea* obtuvieron contenidos más altos que en los hallados en este experimento

(de 50 a 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF) en *Vitis vinifera* L. (20). Por otro lado, al inducir la síntesis de resveratrol en hojas de *Vitis vinifera* L. cv. Chasselas inoculándola con *Plasmopara viticola* se obtuvieron cantidades máximas de 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF (17).

En epidermis de uva de una variedad autóctona de España (cv. Bobal) detectaron 245 μg de resveratrol g^{-1} PF, siendo dicha cantidad el doble que en frutos de la variedad tradicional Cabernet Sauvignon (24). En el presente trabajo, seis tratamientos (18 O, 53 T, 33 A, 29 H, 99 H y 65 T) superaron en contenido de resveratrol a R2 (tabla 3, pág. 132). Las hojas de los materiales comerciales que fueron evaluadas crecieron en condiciones climáticas diferentes a donde fueron colectadas.

El consumo moderado de vinos de calidad permite la ingesta de resveratrol. En algunas investigaciones hechas en vinos rojos reportan concentraciones de hasta 660 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (31), en otras 2,97 mg L^{-1} (2), 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (3), mientras que en vinos blancos las concentraciones son generalmente inferiores en relación con vinos rojos, ya que mediante HPLC en vinos selectos detectaron 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (31) y se notifica rango entre 0,1 y 2,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para dicho constituyente (3). Elaborar té con hojas de vid silvestre que posean resveratrol significaría para las familias de bajo poder adquisitivo ingerir el antioxidante de fuente directa y a bajo costo, lo cual sería una alternativa a su obtención a partir de vino; apoyando esta idea, las infusiones con flores y tallos de orégano (*Origanum vulgare* L.), tomillo (*Thymus vulgare* L.) y tomillo serpol (*T. serpyllum* L.) son consideradas fuentes de antioxidantes naturales (19); además, las hojas de *Vitis* spp. son utilizadas para elaborar té en Tehuacán, Puebla (8), y en China (23) se emplean hojas y raíces de *Vitis thunbergii* como remedio para diversas enfermedades en bebidas y vinos medicinales.

Con la extracción de resveratrol en infusión se obtuvieron 6,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF, mientras que con extracción en metanol fueron 9,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF; por lo tanto, en el agua hirviendo se extrajo una menor cantidad de resveratrol, disminuyendo un 31,5%. Se podría considerar semi-eficiente la infusión para extraer resveratrol; sin embargo, trabajos de mayor precisión deben realizarse para verificar que la capacidad antioxidante sea mantenida. Si bien con infusiones de hojas de uva silvestre (accesión 31 Acateno) podría aprovecharse más de la mitad de resveratrol, estos preparados deben administrarse apropiadamente para evitar sobredosis y/o reacciones no deseadas debidas a sinergias o posible presencia de trazas de elementos pesados, como se han reportado en modalidades de té con *Camellia sinensis* (verde, negro y Oolong) (10).

Análisis bifactorial

El contenido de resveratrol de las accesiones en las diferentes condiciones ambientales indica que hubo diferencias significativas en las 3 fuentes de variación (a, b, y a * b), como se observa en la tabla 4 (pág. 134). La combinación con el valor máximo fue 18 origen con 39,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (tabla 5, pág. 134); sin embargo, la misma accesión al estar establecida en Acateno disminuyó notablemente su contenido (0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ PF). El mismo comportamiento ocurrió para las tres accesiones restantes aunque en diferentes condiciones ambientales. La mayor cantidad de resveratrol para las accesiones 27 y 29 se presentó en Huatusco y para la 33 fue Acateno. La accesión 27 es la que

menos contenido de resveratrol presentó en promedio ($2,99 \mu\text{g g}^{-1}$ FW). Es también interesante que en Acateno se presentó el menor promedio ($7,74 \mu\text{g g}^{-1}$ FW): quizá en dicha localidad fue en donde las accesiones bajo estudio se adaptaron mejor, si se considera la idea de que el resveratrol se incrementa como respuesta a estrés. Por otro lado, para cada una de las condiciones ambientales estudiadas, hay una accesión sobresaliente en contenido de resveratrol: 18 en Teziutlán, 33 en el banco de Acateno, la 29 en los bancos de Toluca y Huatusco. La expresión del genotipo estuvo influenciada significativamente por la condición ambiental. Resultados similares se reportaron al determinar el contenido de polifenoles en vinos procedentes de diferentes regiones de cultivo (2, 18). Las accesiones 27 y 29, estando en su hábitat de origen, presentaron bajo contenido de resveratrol en comparación con condiciones *ex situ* mostrando un patrón de respuesta diferente que la accesión 18, para la cual probablemente persistieron factores que le provocaron estrés y ello pudo influenciar la producción del metabolito secundario (2, 39).

Tabla 4. Suma de cuadrados, cuadrados medios y significancia para contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) de Puebla, México.

Table 4. Sum of squared, squared average and significance for content of resveratrol in leaves of wild grapevines (*Vitis* spp.) of Puebla, México.

Fuente	g. l	s. c.	c. m.	f. c.
Accesión (a)	3	1190,36	396,79	35,91*
C. A. (b)	3	567,43	189,14	16,97*
Accesión * C. A. (a * b)	9	5794,97	643,88	57,78*
Error	47	334,29	11,14	

* Significativo al 5%.

Tabla 5. Contenido de resveratrol ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) en cuatro condiciones ambientales (C. A.).

Table 5. Content of resveratrol ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW) in leaves of wild grapevines (*Vitis* spp.) in four environmental conditions (C. A.).

Accesión	C. A.				
	Origen	Acateno	Toluca	Huatusco	Promedio
18	39,51 a A	0,40 b C	11,65 b B	5,61 d BC	14,32 ab
27	n.d. c B	0,06 b B	0,59 c B	11,32 c A	2,99 c
29	0,06 c C	0,04 b C	21,32 a B	28,44 a A	12,47 b
33	13,94 b BC	30,45 a A	n.d. c C	18,59 b AB	15,75 a
Promedio	13,38	7,74	8,42	15,99	

Cada valor es la media de cuatro observaciones, que a su vez provienen de tres repeticiones; valores con la misma letra minúscula en dirección de la columna y con la misma letra mayúscula en dirección de la fila no son estadísticamente diferentes con la prueba de Tukey al 0,05.
n.d. = no detectado

Posiblemente los factores que más influyeron para el mayor promedio de resveratrol ($15,9 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) en Huatusco fueron las altas temperaturas (ambiente y dentro del invernáculo) (tabla 6, pág. 135), aunado a que las plantas presentaron estado sanitario regular, el cual estuvo dado por la presencia de lesiones por insectos per-

foradores y menor desarrollo vegetativo. Dichas condiciones posiblemente también permitieron mayor contenido del analito para las accesiones, excepto para la 18, la cual presentó menor contenido ($5,6 \mu\text{g g}^{-1}$ FW) que su promedio ($14,3 \mu\text{g g}^{-1}$ FW) como puede observarse en la tabla 5 (pág. 134).

La accesión 33 sintetizó mayor contenido de resveratrol ($15,7 \mu\text{g g}^{-1}$ PF) a través de las cuatro condiciones ambientales (tabla 5) superando el promedio de la accesión 18, que tuvo contenidos mayores a $13,9 \mu\text{g g}^{-1}$ PF en tres de las cuatro condiciones ambientales, lo cual no se observó en las otras tres accesiones. Es posible que la accesión 33 tenga una buena capacidad de respuesta para atenuar algunos efectos adversos mediante la síntesis de resveratrol (7, 34) confiriéndole mayor estabilidad. En el banco de germoplasma de Toluca (muy buen estado de sanidad) hubo menos grados día (tabla 6) y coincide con bajos contenidos de resveratrol. Lo anterior parece estar asociado con menor estrés en las plantas.

Tabla 6. Condiciones ambientales en localidades y en bancos de germoplasma.

Table 6. Climatologic conditions in localities and in germplasm bank.

	Localidad *				Banco de germoplasma +				
	Máx. (°C)	\bar{x} (°C)	Mín. (°C)	P. P. (mm)	Máx. (°C)	\bar{x} (°C)	Mín. (°C)	G. D. Base 10°C	Estado sanitario
Acateno, Teziutlán; Puebla	20,5	14,5	8,5	1568,0	22,5	29,1	35,8	1725	B
El Cerrillo, Toluca, México	20,9	13,4	5,9	704,7	34,4	28,1	21,9	1669	MB
Huatusco, Veracruz	22,9	17,3	11,7	2003,0	22,9	30,1	35,8	1790	R

* Promedios de al menos 11 años. Fuente: Servicio Meteorológico Nacional (30).

+ Promedios de agosto-octubre de 2008.

Estado sanitario (E: excelente, MB: muy bueno, B: bueno, R: regular, M: malo, P: pésimo).

Los contenidos de resveratrol en hojas de accesiones de vides silvestres se determinaron en una estación del año; en consecuencia, sería recomendable reproducir el experimento en las otras estaciones para corroborar la interacción genotipo - condición ambiental.

CONCLUSIONES

La variabilidad genética de las accesiones de vides se manifestó ampliamente. La extracción de resveratrol a partir de hojas con metanol es más eficiente que por infusión en agua caliente. De manera empírica, algunas comunidades de México han empleado las infusiones con hojas de esta planta para tratar males cardíacos. El resveratrol podría ser el principal compuesto que ha otorgado a *Vitis* spp. su importancia en medicina tradicional. Es necesario continuar con análisis que revelen el perfil de otros metabolitos benéficos a la salud y detectar accesiones con mayor tipo de antioxidantes.

REFERENCIAS

1. Alkhalaf, M. 2007. Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacology* 80, 134-143.
2. Anli, E.; Vural, N.; Demiray, S.; Özkan, M. 2006. Trans-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish red wines with HPLC. *J. Wine Res.* 17, 117-125.
3. Baur, J.; Sinclair, D. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. *Nature reviews* 5, 493-506.
4. Bavaresco, L.; Petegolli, D.; Cantu, E.; Fregoni, M.; Chiusaz, G.; Trevisan, M. 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 36, 77-83.
5. Campbell, Ch. 2004. Rooting out the wine plague phylloxera: How wine was saved for the world. *Nature* 428, 20.
6. Cruz, C. 2007. Uvas silvestres (*Vitis*): Distribución y usos en la región central de Veracruz. In: Nieto, R. (Ed.): *Frutales nativos, un recurso fitogenético de México*. Universidad Autónoma Chapingo. 225-235. Chapingo, México.
7. Fong, G.; Walker, M.; Granett, J. 1995. RAPD assessment of California phylloxera diversity. *Mol. Ecol.* 4, 459-464.
8. Franco-Mora, O.; Cruz-Castillo, J. G.; Cortés-Sánchez, A.; Rodríguez-Landero, A. C. 2008. Location and uses of wild grapevines (*Vitis* spp.) in the state of Puebla, México. *Ra Ximhai* 4, 151-165.
9. _____; Morales-Rosales, E. J.; González-Huerta, A.; Cruz-Castillo, J. G. 2008. Vegetative characterization of wild grapevines (*Vitis* spp.) native to Puebla, México. *Hortsc.* 43, 1991-1995.
10. Fwu-Ming, S.; Hong-Wen, Ch. 2008. Element composition of tea leaves and tea infusions and its impact on health. *Bull Environ Contam Toxicol.* 80, 300-304.
11. German, J.; Walzem, R. 2000. The health benefits of wine. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 561-593.
12. Heldt, H.; Piechulla, B. 1997. *Pflanzenbiochemie*. Heidelberg. Spektrum Akademischer Verlag. 672 p.
13. Howitz, K.; Bitterman, K.; Cohen, H.; Lamming, D.; Lavu, S.; Wood, J.; Zipkin, R.; Chung, P.; Kisielewski, A.; Zhang, L.; Scherer, B.; Sinclair, D. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* chemopreventive activity of resveratrol lifespan. *Nature* 425, 191-196.
14. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Unión para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) and OIV. 1997. Descriptors for grapevine (*Vitis* spp.). International Plant Genetic Institute. Rome, Italy.
15. Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.; Slowing, K.; Thomas, C.; Beecher, C.; Fong, H.; Farnsworth, N.; Kinghorn, D.; Metha, R.; Moon, R.; Pezzuto, J. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-220.
16. _____; Pezzuto, J. 1999. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 65-77.
17. Jean-Denis, J.; Pezet, J.; Tabacchi, R. 2006. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *J. Chromatog. A.* 1112, 263-268.
18. Kallithraka, S.; Tsoutsouras, E.; Tzourou, E.; Lanaridis, P. 2006. Principal phenolic compounds in Greek red wines. *Food Chem.* 99, 784-793.
19. Kulisic-Bilusic, T.; Dragovic-Uzelac, V.; Milos, M. 2006. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technol. Biotechnol.* 44(4): 485-492.
20. Langcake, P.; Pryce, R. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77-86.

21. Lekakis, J.; Rallidis, L.; Andreadou, I. 2005. Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 12, 596-600.
22. Lorenz, D.; Eichhorn, K.; Bleiholder, H.; Klose, R.; Meier, U.; Weber, E. 1994. Phänologische entwicklungsstadien der weinrebe (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*). *Vitic. Enol. Sci.* 49, 66-70.
23. Lu, M. C. 2005. Micropropagation of *Vitis thunbergii* Sieb. et Zucc., a medicinal herb, through high-frequency shoot tip culture. *Sci. Hort.* 107, 64-69.
24. Navarro, S.; León, M.; Roca, P.; Boluda, R.; García, F.; Pérez, B.; Gavidia, I. 2008. Characterisation of Bobal and Crujidera grape cultivars, in comparison with Tempranillo and Cabernet Sauvignon: Evolution of leaf macronutrients and berry composition during grape ripening. *Food Chem.* 108, 182-190.
25. Oliveira, M. 1998. Calculation of budbreak and flowering base temperatures for *Vitis vinifera* cv. Touriga Francesa in the Douro Region of Portugal. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:74-78.
26. Palamara, A.; Nencioni, L.; Aquilano, K.; De Chiara, G.; Hernandez, L.; Cozzolino, F.; Ciriolo, M.; Garaci, E. 2005. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J. Infectious Disease* 191, 1719-1729.
27. Pool, R.; Creasy, L.; Frackelton, A. 1981. Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis* 20, 136-145.
28. Rimando, A.; Kalt, W.; Magee, J.; Dewey, J.; Ballington, J. 2004: Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 4713-4719.
29. Sanders, T.; McMichael, R.; Hendrix, K. 2000: Occurrence of resveratrol in edible peanuts. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1243-1246.
30. Servicio Meteorológico Nacional. Productos climatológicos. Normales climatológicas 1971-2000. <http://smn.cna.gob.mx/>. 15/sep/2008.
31. Siemann, E.; Creasy, L. 1992: Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Amer. J. Enol. Vitic.* 43, 49-52.
32. Soleas, G.; Diamandis, E.; Goldberg, D. 1997: Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30, 91-113.
33. Stein, J.; Keevil, J.; Wiebe, D. 1999: Purple grape juice improved endothelial function and reduce the susceptibility of LDL cholesterol, to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 100, 1050-1055.
34. Stein, U.; Blaich, R. 1985: Untersuchungen über Stilben-Produktion und Botrytis anfälligkeit bei *Vitis*-Arten. *Vitis* 24, 75-87.
35. Tassoni, A.; Fornale, S.; Franceschetti, M.; Musiani, F.; Michael, A. 2005: Jasmonates and Na-Orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist* 166, 895-905.
36. Valenzano, D.; Terzibasi, E.; Genade, T.; Cattaneo, A.; Domenici, L.; Cellerino, A. 2006: Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr. Biol.* 16, 296-300.
37. Vargas, A.; Soto, H.; González, H.; Engleman, E.; Martínez, G. 2006: Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia* 40, 109-115.
38. Wood, J.; Rogina, B.; Lavu, S.; Howitz, K.; Helfand, S.; Tatar, M.; Sinclair, D. 2004: Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-689.
39. Zamboni, A.; Vrhovsek, U.; Kassemeyer, H.; Mattivi, F.; Velasco, R. 2006: Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes. *Vitis* 45, 63-68.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de México, a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos A. C. por el financiamiento parcial al presente trabajo. El sistema PROMEP-SEP, México, otorgó la beca para estudiar el doctorado a J. Refugio Tobar Reyes.