



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali

TESI DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE AGRARIE

*TITOLO*

Analisi preliminari per lo studio delle fosfolipasi nel “peel pitting” delle arance in post-raccolta

Relatore:

Dott. Benedetto Ruperti

Laureando: Enrico Scarpel

Matricola n. 562877

ANNO ACCADEMICO 2009- 2010

## INDICE

1- INTRODUZIONE	
1.1 Fisiopatologie post-raccolta negli agrumi.....	1
1.2 Le fosfolipasi negli stress abiotici e il ruolo dell'acido abscissico.....	4
1.3 Pinalate, un mutante naturale con bassi livelli di ABA.....	9
1.4 Scopo della tesi.....	12
2- MATERIALI E METODI	
2.1 Materiale vegetale.....	13
2.2 Trattamenti e condizioni di conservazione.....	13
2.3 Perdita di peso e conta del "peel pitting".....	15
2.4 Estrazione dell'RNA.....	19
2.5 RT-PCR real time.....	21
3- RISULTATI	
3.1 Indice di scostamento percentuale della perdita di peso.....	23
3.2 Incidenza del "peel pitting".....	25
3.3 Incidenza di infezioni di funghi.....	27
3.4 Estrazione di RNA da campioni di flavedo.....	28
4- CONCLUSIONI.....	32
5- BIBLIOGRAFIA.....	33

## RIASSUNTO

In questa tesi è stato valutato l'effetto di diversi trattamenti nel controllo del fenomeno del "peel pitting" nella conservazione post-raccolta delle arance. Il "peel pitting" è un disordine fisiologico che consiste in un imbrunimento dei tessuti del flavedo e che comporta gravi perdite economiche. Esso è dovuto all'azione incontrollata delle fosfolipasi D e A2, a loro volta regolate dall'ABA. A questo scopo sono stati messi a confronto gli effetti di trattamenti con ABA, LPE o AT (inibitori delle fosfolipasi D e A2, rispettivamente) nel controllo del peel pitting in presenza di due diversi livelli di umidità relativa (30 o 90 %) e su due Cv, Navelate e Pinalate, quest'ultima caratterizzata da una minore produzione endogena di ABA per un disturbo nella via biosintetica. I risultati hanno evidenziato che il trattamento con ABA ha riportato la Cv Pinalate a livelli di "peel pitting" comparabili a quelli riscontrati in Navelate e che i trattamenti con l'inibitore della PLD (LPE) hanno consentito in generale un migliore contenimento del fenomeno.

## ABSTRACT

In this thesis the effect of different treatments was evaluated for their effectiveness on the control of the peel pitting phenomenon during postharvest storage of orange fruits. Peel pitting is a physiological disorder consisting on the oxidative browning of the *flavedo* tissues that induces significant losses. It is due to the uncontrolled activity of phospholipases D and A2, both regulated by ABA. To this end the effects of treatments with ABA, LPE o AT (inhibitors of phospholipases D and A2, respectively) were evaluated for their potential in controlling peel pitting in the presence of two different levels of relative humidity (30 or 90 %) and on two Cv, Navelate and Pinalate, the latter one characterized by lower endogenous levels of ABA due to an impaired biosynthesis. The results have pointed out that the treatment with ABA has restored the peel pitting incidence in Pinalate to levels comparable to those found in Navelate and that treatments with the PLD inhibitor LPE had in general a better efficacy in the containment of the disorder.

## 1- INTRODUZIONE

### 1.1 Fisiopatologie post-raccolta negli agrumi.

Gli agrumi possono sviluppare disordini fisiologici sulla buccia in conseguenza a stress biotici e abiotici durante la conservazione post-raccolta, che compromettono la qualità esterna del frutto diminuendone il valore commerciale. I frutti in conservazione possono essere attaccati da un gran numero di patogeni fungini necrotrofi con infezioni che, se non controllate, portano a grandi perdite sia nella quantità di frutta fresca prodotta, sia nella qualità, con conseguenti perdite economiche ingenti. Si ha perdita di prodotto durante tutti i passaggi della distribuzione, in percentuali diverse: raccolta 16%, stoccaggio 7%, trasporto 1%, manipolazioni varie 2%, grande magazzino e vendita al dettaglio 20%, per un totale del 46%. Si stima infatti che a livello mondiale si perda circa il 46% della frutta immagazzinata, causando una perdita di 4 milioni di dollari al semestre solo negli Stati Uniti.

Tra i patogeni fungini più comuni per gli agrumi si ricordano *Penicillium digitatum* (Fig. 2), *P. italicum* e *Alternaria alternata* (Fig. 1) che attaccano gli agrumi durante la conservazione, il trasporto e la commercializzazione.



**Figura 1.** Arancia Navelate infetta da *Alternaria alternata*.



**Figura 2.** Arancia Navelate infetta da *Penicillium digitatum*.



**Figura 3.** Arancia Navelate che presenta danni da stress idrico sul flavedo (“peel pitting”).

Tra gli stress abiotici è interessante rivolgere l’attenzione soprattutto ai danni causati dallo stress idrico. Lo stress idrico è stato riconosciuto come principale responsabile dei danni al flavedo (parte esterna pigmentata della buccia) causando una perdita di qualità nella frutta con conseguente ricaduta economica. La ricaduta economica è rilevante per la perdita di peso della frutta e per il cattivo aspetto della buccia dovuto alla sua degenerazione. La capacità della frutta raccolta di conservare la propria freschezza si basa principalmente sulla sua capacità di ritenere l’acqua limitando la traspirazione. Agrumi sottoposti a stress idrico

presentano avvizzimento, depressioni del flavedo oltre che perdita del turgore, della freschezza e della succulenza. Nelle case di stoccaggio la frutta è spesso sottoposta per diverse ore a condizioni di bassa umidità relativa (RH) prima di essere lavata e immagazzinata ad alta umidità relativa. Queste condizioni portano alla formazione di “peel pitting” sul flavedo. Alla base di questa fisiopatia vi è uno stress ossidativo forte associato ad un rapido invecchiamento del tessuto a carico del flavedo. E' stato dimostrato che questi fenomeni sono associati ad un aumentato livello di attività di enzimi lipolitici fra cui diverse fosfolipasi, lipasi e lipossigenasi (Alferez, 2008; Mao *et al.*, 2007; Page *et al.*, 2001; Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Gosalbes *et al.*, 2004).

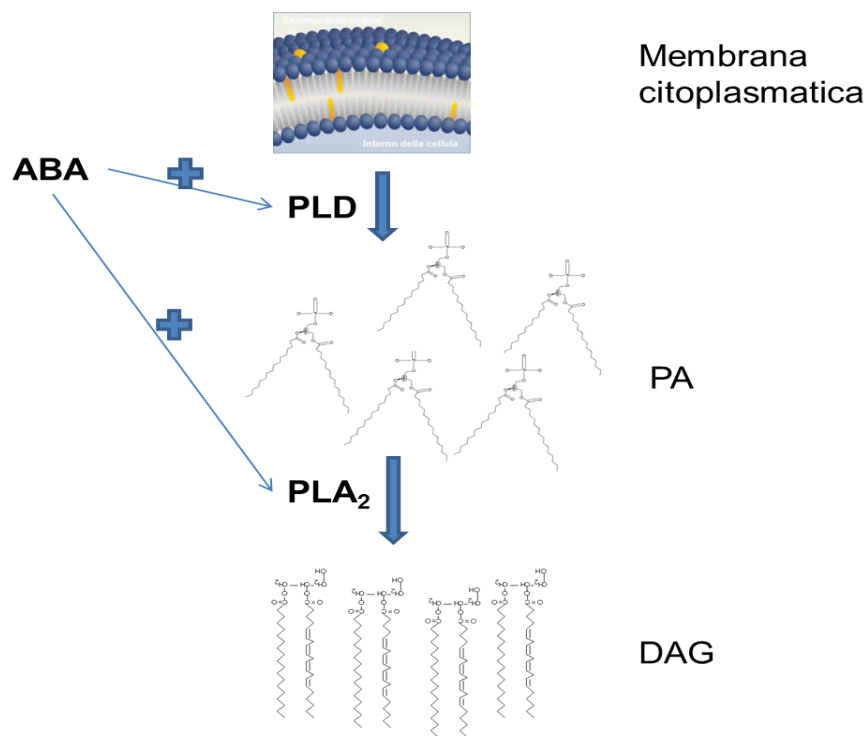
### **1.2 Le fosfolipasi negli stress abiotici e il ruolo dell'acido abscissico.**

Le fosfolipasi sono un gruppo di enzimi con azione lipolitica e di segnale (segnali lipidici) che possono attuare uno scompenso osmotico conseguente a una progressiva degradazione della membrana fosfolipidica in risposta a stimoli biotici e abiotici (Matos *et al.*, 2001; Meijer *et al.*, 2001; Denekamp and Smeekens, 2003; Meijer and Munnik, 2003). Quest'azione ha lo scopo di aumentare la dispersione di elettroliti causando però il deterioramento dei tessuti (Alferez, 2008). Ad esempio, la degradazione della membrana cellulare come determinante per la liberazione di elettroliti è stata correlata alla comparsa di “pitting” sulla superficie di frutti di cetriolo (Mao *et al.*, 2007). L'attività lipossigenasica è indotta in fiori senescenti di broccoli dopo lunghi periodi di conservazione, così com'è stata osservata in foglie isolate di *Arabidopsis thaliana* (Page *et al.*, 2001). Negli agrumi, l'espressione di un gene omologo di un  $\alpha$ -diossigenasi di tabacco, che può essere indotto da specie reattive dell'ossigeno e che catalizza il primo passo per l' $\alpha$ -ossidazione dell'acido linoleico e di altri acidi grassi, è stata riscontrata essere momentaneamente indotta in caso di refrigerazione in mandarini “Fortune” (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003; Gosalbes *et al.*, 2004).

La degradazione lipidica genera, inoltre, una cascata di segnali lipidici e, globalmente, tali eventi possono essere correlati all'invecchiamento e alla degradazione dei tessuti.

Le fosfolipasi (PL) sono costitutivamente presenti nei tessuti delle piante e sono rilasciate nello spazio intercellulare in occasione di una ferita o uno stress sul tessuto, così che degradano le membrane rilasciando molecole lipidiche segnale (Creelman and Mulpuri, 2002). Possono però essere anche indotte a livello trascrizionale da fattori ormonali in

risposta ad uno stress. Per esempio, l'attività della fosfolipasi D (PLD) e l'espressione del gene di PLD $\alpha$  possono essere aumentate dalla disidratazione in *Craterostigma* (Frank *et al.*, 2000). L'attività delle fosfolipasi A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) è stata verificata in *Dunaliella salina* in risposta a stress osmotico (Eisenpahr *et al.*, 1988) e negli agrumi l'espressione di molti geni codificanti per PLA<sub>2</sub> è apparsa essere modulata in risposta alle condizioni di umidità durante la conservazione post-raccolta, determinando "peel pitting" sul flavedo (Alferez *et al.*, 2008). Fra i regolatori ormonali delle PL sicuramente un ruolo importante è giocato dall'acido abscissico (ABA), un fitormone che, sintetizzato in risposta a stress idrico, agisce da induttore per PLD e PLA<sub>2</sub> (Figura 4).



**Figura 4.** Azione di PLD e PLA<sub>2</sub> sulla membrana cellulare e induzione delle fosfolipasi ad opera di ABA.

PLD = fosfolipasi D; PLA<sub>2</sub> = fosfolipasi A<sub>2</sub>; ABA = acido abscissico; PA = acido fosfatidico; DAG = diacilglicerolo.

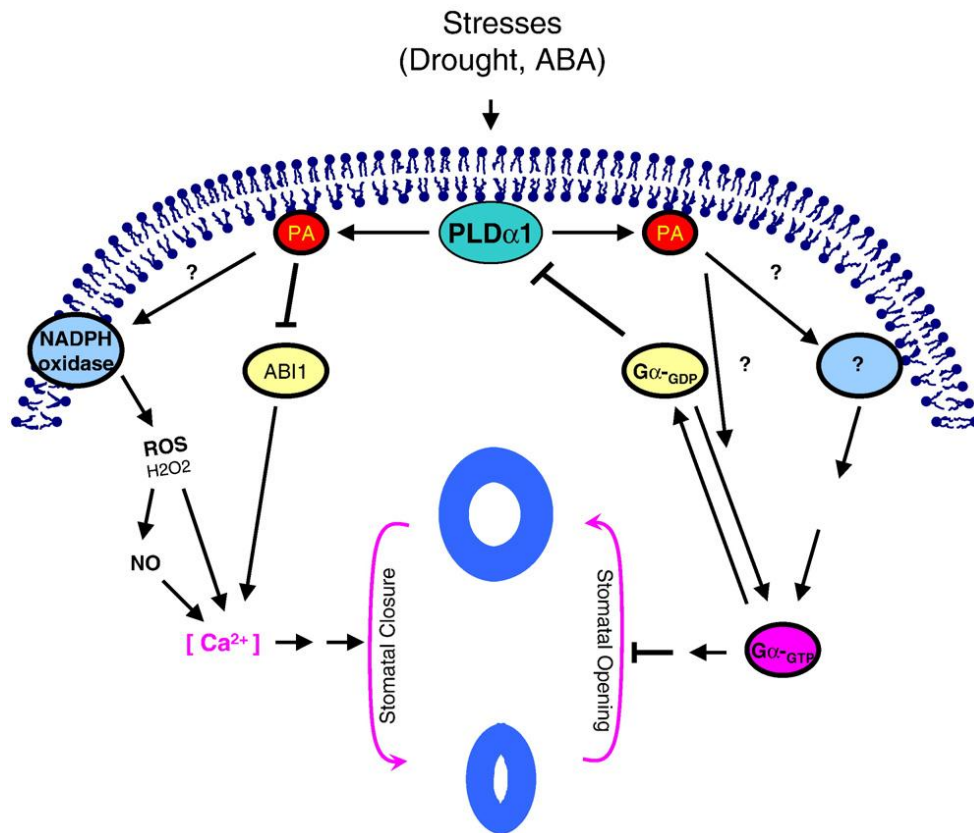
L'acido abscissico (ABA) è un fitormone ubiquitario che svolge un ruolo fisiologico fondamentale nella regolazione della trasmissione di segnali in risposta a stress ambientale e attacco di fitopatogeni. In condizioni di stress idrico l'ABA è coinvolto nella regolazione dell'apertura degli stomi, promuovendone la chiusura e inibendone l'apertura, col fine di ridurre la traspirazione fogliare (Schroeder *et al.*, 2001; Finkelstein *et al.*, 2002; Assmann, 2003; Xiong and Zhu, 2003; Hirayama and Shinozaki, 2007). Come tutti gli ormoni, la sua

concentrazione determina la sua efficacia nel modulare le risposte a stress. L'ABA è una molecola a 15 atomi di Carbonio, sintetizzato a partire da un carotenoide a 40 atomi di carbonio chiamato violaxantina, un prodotto del catabolismo del  $\beta$ -carotene (Figura 8) (Davies, 1991). Nei frutti l'ABA è prodotto in risposta a stress abiotici quali stress idrico, salino e da calore, anche se precedenti lavori hanno dimostrato che l'acido abscissico non è coinvolto nei meccanismi adattativi di mandarini "Fortune" conseguenti a stress da refrigerazione (Lafuente MT *et al.*, 1997). Alcuni studi relativi all'influenza dell'acido abscissico su meccanismi di difesa indotti da stress salino, hanno dimostrato che questo fitormone ha un ruolo nella resistenza e acclimatazione della pianta alle condizioni di salinità (Mengual *et al.*, 2003). Uno studio comparativo tra la Cv Navelate e il mutante Pinalate, in fase di post-raccolta, ha evidenziato come in Pinalate (carente di acido abscissico) la produzione di etilene in seguito a stress idrico è molto maggiore che in Navelate, facendo supporre quindi che l'acido abscissico svolga un ruolo di inibitore della sintesi di etilene indotta da stress idrico (Alferez *et al.*, 2005).

Attraverso l'utilizzo della genetica inversa e diretta, di approcci molecolari e biochimici, sono stati caratterizzati numerosi componenti della via di trasduzione del segnale mediata da ABA, comprese le proteine G, le protein chinasi/fosfatasi, fattori trascrizionali, recettori ed enzimi, coinvolti nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Gosti *et al.*, 1999; Merlot *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Himmelbach *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Nilson and Assmann, 2007; Ma *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Inoltre sono stati identificati intermedi lipidici generati da PLD e PLC come parti di una complessa cascata di segnali attivata in risposta ad ABA (Fan *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Recenti studi hanno dimostrato che PLD e il suo prodotto lipidico, l'acido fosfatidico (PA), interagiscono con una proteina G e una proteina fosfatasi per mediare la risposta ad ABA nelle cellule di guardia; la soppressione di PLD $\alpha$ 1 rende il mutante di *Arabidopsis thaliana* insensibile ad ABA per la chiusura degli stomi causando una maggiore perdita d'acqua rispetto al "wild type" (Zhang *et al.*, 2004), mentre una sovraespressione di PLD $\alpha$ 1 porta a una minore perdita d'acqua (Sang *et al.*, 2001). Infatti ABA induce l'attività di PLD $\alpha$ 1 e quindi la produzione di PA che ha come target intracellulare la proteina ABI1 fosfatasi 2C che è regolatrice negativa di ABA. L'interazione PA-ABI1 promuove la chiusura degli stomi legando ABI1 alla membrana cellulare (Zhang *et al.* 2004).

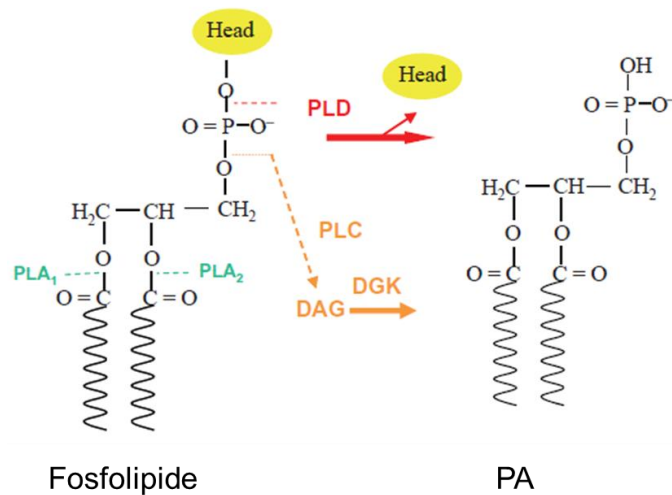


Quest'interazione inibisce la funzione negativa di ABI1 sulla chiusura degli stomi attraverso l'inibizione della sua attività di fosfatasi, legandola alla membrana cellulare. Questo legame si pensa sia necessario per evitare l'interazione tra ABI1 e il fattore di trascrizione ATHB6 (Zhang et al., 2004).



**Figura 5.** Modulazione di PLD $\alpha$ 1 e del suo prodotto PA impiegati nel movimento degli stomi attraverso l'interazione con ABI1 e G $\alpha$ . G $\alpha$ -GDP lega PLD $\alpha$ 1 inibendola; in risposta ad ABA, G $\alpha$  è attivato e si dissocia da PLD $\alpha$ 1. Questa, ora attiva, produce PA che lega ABI1 legandolo alla membrana cellulare e inattivandolo. In questo modo PA, prodotto da PLD $\alpha$ 1, promuove la risposta indotta da ABA per la chiusura degli stomi sopprimendo l'effetto negativo di ABI1. Inoltre PA potrebbe essere coinvolto nell'indurre la formazione di G $\alpha$ -GTP partecipando così all'inibizione dell'apertura degli stomi promossa da ABA (Li *et al.* 2009).

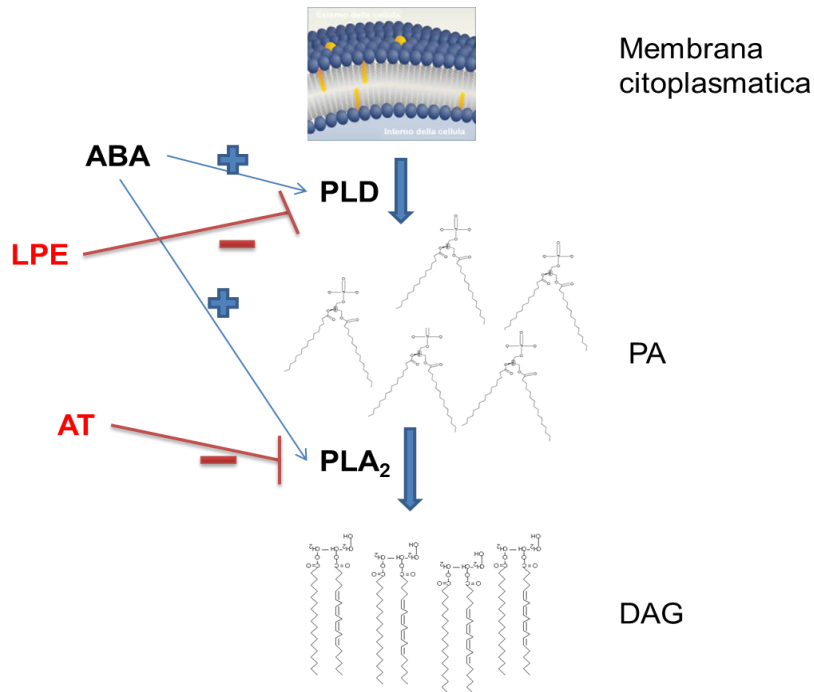
La famiglia delle fosfolipasi D comprende la maggior parte degli enzimi che idrolizzano le membrane fosfolipidiche nelle piante, andando a liberare la testa del fosfolipide idrolizzando il legame con il gruppo fosfato (figura 6; Hong *et al.* 2010).



**Figura 6.** In figura sono indicati i siti di idrolisi del fosfolipide da parte delle fosfolipasi D, C e A<sub>2</sub> e PA, prodotto da PLD. PLD idrolizza il legame fosfodiesterico tra la testa del fosfolipide e il gruppo fosfato, producendo acido fosfatidico. Il gruppo di testa può essere colina, etanolamina, serina o glicerolo. Con PA si intende tutta la famiglia degli acidi fosfatidici, dato che possono essere distinti a seconda delle loro catene di acidi grassi.

L'attivazione di PLD risulta dare un aumento di acido fosfatidico (PA), derivante dalla degradazione dei fosfolipidi, e questo sembra a sua volta attivare PLA<sub>2</sub> la cui azione consiste nel degradare PA in diacilglicerolo (DAG) e fosfato (Wang *et al.*, 2002). Infatti l'attività fosfolipasica deve essere strettamente controllata perché l'idrolisi massiccia di membrane fosfolipidiche può causare la perdita dell'integrità cellulare (Bargmann and Munnik, 2006). Comunque il possibile ruolo di PLD nello sviluppo di disordini della buccia negli agrumi e la sua comunicazione con PLA<sub>2</sub>, così come la regolazione di entrambe le fosfolipasi in risposta a stress di post-raccolta, sono totalmente sconosciuti.

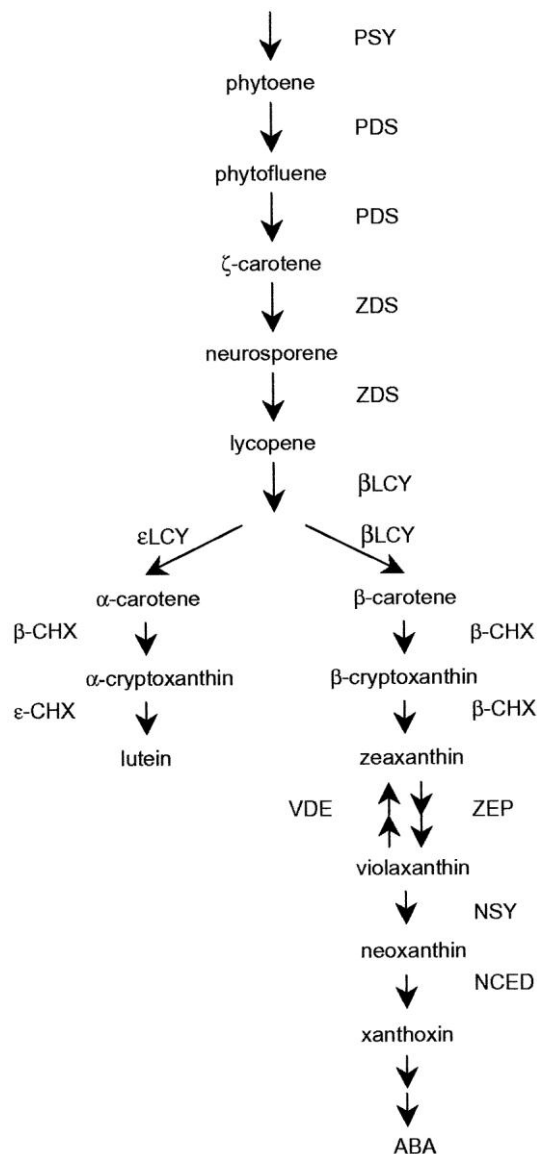
L'attività di PLA<sub>2</sub> porta un aumento del pool di lisofosfolipidi che sembra a sua volta regolare negativamente l'attività di PLDα con un meccanismo di feedback negativo (Wang *et al.*, 2002). Quindi lisofosfatidiletanolamina (LPE) potrebbe inibire specificatamente l'attività di PLD (Ryu *et al.*, 1997) ritardando i sintomi della senescenza sviluppati in foglie e frutti di pomodoro (Farag and Palta, 1993). Inoltre si è visto in precedenti lavori (Alferez *et al.*, 2006) come l'applicazione di acido aristolochico (AT) porti alla sensibile diminuzione di danni della buccia in seguito a stress idrico grazie all'effetto inibitore su PLA<sub>2</sub> (Fig. 6). Il meccanismo d'azione di AT consiste nell'allontanare la fosfolipasi dal suo substrato e dal sito d'azione, così da inibirne l'effetto.



**Figura 7.** Induzione di PLD e PLA<sub>2</sub> da parte di ABA. Inibizione delle stesse da parte di LPE e AT.

### 1.3 Pinalate, un mutante naturale con bassi livelli di ABA.

Pinalate è un mutante spontaneo dell'arancia Navelate, rilevato per la prima volta a Murcia, Spagna, dove si continua a coltivare nonostante non sia una varietà commerciale, a causa del sapore estremamente amaro dello polpa. Questo mutante è caratterizzato da un blocco parziale dell'enzima  $\zeta$ -carotene desaturasi, responsabile della sintesi di Neurosporene da  $\zeta$ -carotene. Questo enzima catalizza uno step fondamentale nella via di sintesi del  $\beta$ -carotene, un precursore dell'Acido abscissico (Fig. 8).



**Figura 8.** Diagramma schematico della “pathway” biosintetica dei carotenoidi e dell’acido abscissico. PSY = fitoene sintasi; PDS = fitoene desaturasi; ZDS = ζ-carotene desaturasi; β-LCY = β-licopene ciclasti; β-CHX = β-carotene idrossilasi; ZEP = zeaxantina epossidasi; VDE = violaxantina de-epossidasi; NSY = neoxantina sintasi; NCED = 9-cis-epossicarotenoide diossigenasi.

La caratterizzazione di Pinalate come nuovo mutante della Cv Navelate (*Citrus sinensis* L. Osbeck) è stata eseguita per la prima volta nel 2003 (Rodrigo M.J. *et al.*, 2003). Infatti tramite l’analisi della composizione del flavedo si è evidenziata un’alterazione del meccanismo che regola l’accumulo di carotenoidi nel flavedo, portando ad avere una diversa composizione di questi. La prevalenza di ζ-carotene ed altri caroteni lineari e la carenza di xantofille porta, nel frutto maturo, alla formazione di un flavedo di colore giallo. Il tessuto

fogliare non presenta queste alterazioni nel contenuto di carotenoidi, suggerendo che gli effetti della mutazione interessano in modo specifico i tessuti riproduttivi.

Come conseguenza della carenza di neurosporene e quindi di  $\beta$ -carotene, Pinalate presenta bassi livelli di acido abscissico (tabella 1).

<u>Tessuto</u>	<u>ABA (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math> peso fresco)</u>			
	<u>Esperimento I</u>		<u>Esperimento II</u>	
	<u>Navelate</u>	<u>Pinalate</u>	<u>Navelate</u>	<u>Pinalate</u>
Foglie	0.34 $\pm$ 0.11	0.30 $\pm$ 0.05	n.d.	n.d.
Buccia del frutto				
Verde immatura	n.d.	n.d.	0.38 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.03
Matura verde	0.47 $\pm$ 0.07	0.20 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.06	0.27 $\pm$ 0.03
Matura	0.95 $\pm$ 0.11	0.16 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.23	0.31 $\pm$ 0.04

**Tabella 1.** Livelli di acido abscissico in Cv Navelate e nel suo mutante Pinalate, misurati in foglie e buccia del frutto, in quest'ultima durante tre stadi diversi di maturazione. I livelli di ABA sono espressi in  $\mu\text{g}$  di ABA per  $\text{g}^{-1}$  di tessuto fresco. n. d. = non determinato.

I livelli di ABA sono da 3 a 6 volte inferiori in Pinalate rispetto alla Cv Parentale. Questo fa di Pinalate un ottimo strumento per questo studio e per la caratterizzazione dei fattori coinvolti nella regolazione del "peel pitting". Nonostante la bassa concentrazione di ABA e i diversi contenuti di carotenoidi, il mutante non presenta problemi né ritardi nello sviluppo e nella maturazione del frutto. Questo può far supporre che ABA non sia fondamentale per la maturazione del frutto negli agrumi. Inoltre la differenza riscontrata tra foglie e frutto dello stesso Pinalate, può far pensare a due isoforme dell'enzima ZDS: una presente nei tessuti vegetativi attiva nei cloroplasti, l'altra presente nei cromoplasti del frutto, difettosa in Pinalate.

#### 1.4 Scopo della tesi.

In questo lavoro l'attenzione è stata rivolta ai disordini fisiologici del flavedo di arance Navelate, originati da stress idrico post-raccolta, che si manifestano con depressioni (pit) del flavedo interessando i tessuti con necrosi, fenomeno definito complessivamente come "peel pitting".

**Obiettivo:** L'obiettivo finale della ricerca è stato quello di valutare metodi per preservare la qualità e l'integrità del flavedo delle arance del gruppo Navel, durante la conservazione post-raccolta, affinché abbiano una qualità della buccia migliore al momento della vendita. L'obiettivo della tesi è stato quindi di verificare se, controllando l'attività delle fosfolipasi PLD e PLA<sub>2</sub> con inibitori specifici, si possa esercitare un controllo del "peel pitting" mantenendo un flavedo integro nelle arance in conservazione.

A questo scopo, sono stati applicati tre trattamenti su due varietà di arance, Navelate e Pinalate. I trattamenti sono stati definiti con lo scopo di studiare i vari livelli di degradazione del flavedo delle arance, sottoposte o no a stress idrico dopo la raccolta.

I trattamenti utilizzati sono stati quindi i seguenti:

- ABA (acido abscissico): induce PLD e PLA<sub>2</sub>.
- LPE (lisofosfatidiletanolamina): inibitore di PLD (Ryu *et al.*, 1997).
- AT (acido aristolochico): inibitore di PLA<sub>2</sub> (Alferez *et al.*, 2006).

## 2- MATERIALI E METODI

### **2.1 Materiale vegetale.**

Il materiale vegetale utilizzato per questo esperimento è stato raccolto da alberi adulti di arance Navelate e Pinalate (*Citrus sinensis*) innestati su un portinnesto Citrange Carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), presso il Citrus Germplasm Bank dell'Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), a Valencia, Spagna, istituto in cui sono presenti tre alberi di quasi tutte le varietà di arance esistenti al mondo. È stato scelto come portinnesto il Citrange Carrizo perchè i frutti che crescono su di esso mostrano una elevata suscettibilità ai danni della buccia.

Quindi una volta raccolte in modo casuale 160 arance Navelate e 160 Pinalate (80 per albero), sono state immediatamente portate al laboratorio per minimizzare la perdita d'acqua e il conseguente danno al flavedo ("peel pitting") previo trattamento e immagazzinamento.

Una volta in laboratorio sono stati identificati e segnati con pennarello i danni da stress idrico già presenti sul flavedo della frutta, le ferite che le arance avevano subito già durante la vita in campo. Facendo ciò si è evitato che venissero incluse queste ferite nelle conte successive, dopo i trattamenti, per distinguerle da quelle provocate dalla conservazione post-raccolta.

### **2.2 Trattamenti e condizioni di conservazione.**

Le arance raccolte sono state utilizzate per costituire sedici lotti, otto per ogni varietà, come mostra la Tabella 2. Ogni lotto era composto da 20 arance di una stessa varietà e ad ogni lotto è stato applicato un solo trattamento. Dopo il trattamento la frutta è stata immagazzinata in due celle a umidità relativa (RH) diversa: 30% e 90%. Ciò allo scopo di evocare due livelli diversi di stress idrico, presupponendo che la frutta conservata a 30% RH subisca maggiori danni da stress idrico rispetto a quella conservata a 90% RH.

L'umidità relativa (RH) è stata espressa in percentuale come rapporto tra la quantità di vapore acqueo contenuto in una massa d'aria reale, rispetto alla quantità massima di vapore che lo stesso volume d'aria può contenere nelle stesse condizioni di Temperatura e Pressione (umidità assoluta).

Sono stati applicati quattro trattamenti differenti, ripetuti in modo uguale in ogni cella ad umidità relativa ottenendo quattro trattamenti per ogni Cv e per ogni livello di umidità relativa per un totale di otto tesi per ogni Cv. I trattamenti considerati sono stati:

- Trattamento con Acido Abscissico (ABA).
- Trattamento con Lisofosfatidiletanolamina (LPE).
- Trattamento con Acido Aristolochico (AT).
- Trattamento con acqua distillata (controllo).

In tabella 2 sono riportate le diverse tesi ai due diversi livelli di RH (cella a 30% RH e cella a 90% RH), per la varietà Navelate e per Pinalate.

	NAVELATE	PINALATE
30% RH	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tesi con ABA</li> <li>2. Tesi con LPE</li> <li>3. Tesi con AT</li> <li>4. Tesi di controllo</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tesi con ABA</li> <li>2. Tesi con LPE</li> <li>3. Tesi con AT</li> <li>4. Tesi di controllo</li> </ol>
90% RH	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tesi con ABA</li> <li>2. Tesi con LPE</li> <li>3. Tesi con AT</li> <li>4. Tesi di controllo</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tesi con ABA</li> <li>2. Tesi con LPE</li> <li>3. Tesi con AT</li> <li>4. Tesi di controllo</li> </ol>

**Tabella 2.** Organizzazione della frutta in lotti e loro distribuzione nelle celle a diversa umidità relativa (RH).

Ogni lotto di arance è stato collocato su una cassetta forata di plastica ed etichettato riportando il tipo di trattamento e le condizioni di conservazione.

I trattamenti sono stati applicati alla buccia di ogni singola arancia attraverso la vaporizzazione del liquido contenente il trattamento specifico alla concentrazione di 1 mmol L<sup>-1</sup>.

Una volta pronti i lotti per l'immagazzinamento nelle celle a umidità relativa, sono state scelte in modo casuale cinque arance da ogni lotto, che sono state segnate e pesate. Per ogni pesata successiva si sono utilizzate sempre le stesse cinque arance per valutarne la perdita di peso (alcune pesate riportano un numero inferiore di arance, questo a causa di perdite dovute a infezione da *Penicillium digitatum*). Le pesate del primo giorno sono state



registrate come pesate al  $T_0$  (arance appena raccolte dal campo e quindi senza l'effetto di nessun trattamento), quelle al terzo giorno di conservazione come  $T_1$ , al decimo giorno  $T_2$  e al ventiseiesimo giorno come  $T_3$ . Contestualmente, sono state campionate in modo casuale altre cinque arance (sono state utilizzate cinque arance come numero minimo per l'estrazione dal flavedo per avere risultati statisticamente validi), dalle quali è stato rimosso il flavedo per l'estrazione dell'RNA, che è stato in seguito utilizzato per studiare l'espressione genica delle fosfolipasi. Il flavedo è stato congelato immediatamente in azoto liquido e conservato in congelatore a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  per le successive analisi molecolari.

### **2.3 Perdita di peso e conta del "peel pitting".**

I frutti delle diverse tesi sono stati conservati in umidità relativa per ventisei giorni; a ogni "time point" ( $T_0$ ,  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ ) sono state pesate cinque arance per ogni tesi ed è stata valutata l'incidenza del "peel pitting" di tutte le arance contenute in ciascun lotto.

La tabella 3 mostra le pesate effettuate ai differenti "time point" T e in tabella 4 sono indicate le perdite in peso relative (esprese come percentuale rispetto al peso iniziale):

- $T_0$ : 02/03/09, 1° Pesata e conta del "peel pitting"; 0 giorni di trattamento e di conservazione in celle a RH.
- $T_1$ : 05/03/09, 2° Pesata e conta del "peel pitting"; 3 giorni di trattamento e di conservazione in celle a RH.
- $T_2$ : 13/03/09, 3° Pesata e conta del "peel pitting"; 10 giorni di trattamento e di conservazione in celle a RH.
- $T_3$ : 27/03/09, 4° Pesata e conta del "peel pitting"; 26 giorni di trattamento e di conservazione in celle a RH.

Nei casi, soprattutto dopo dieci o ventisei giorni di conservazione, in cui alcune arance hanno presentato infezioni fungine (*Penicillium digitatum*) sulla buccia, queste sono state scartate e, quindi, escluse dalla pesata.

<u>T<sub>0</sub>: 02/03/09, 1° Pesata; 0 giorni di trattamento.</u>				<u>T<sub>1</sub>: 05/03/09, 2° Pesata; 3 giorni di trattamento.</u>			
<i>Varietà pesata</i>	<i>Condizioni di conservazione</i>	<i>Trattamento applicato</i>	<i>Peso in grammi</i>	<i>Varietà pesata</i>	<i>Condizioni di conservazione</i>	<i>Trattamento applicato</i>	<i>Peso in grammi</i>
NAVELATE	30%	ABA	806,5	NAVELATE	30%	ABA	792,5
		AT	626			AT	616
		LPE	605			LPE	592,5
		Controllo	710,5			Controllo	700
	90%	ABA	672		90%	ABA	664
		AT	577,5			AT	571
		LPE	521			LPE	514,5
		Controllo	729			Controllo	721,5
PINALATE	30%	ABA	442	PINALATE	30%	ABA	434,5
		AT	500			AT	491,5
		LPE	411,5			LPE	403,5
		Controllo	418,5			Controllo	410,5
	90%	ABA	550,5		90%	ABA	544
		AT	561			AT	555
		LPE	468,5			LPE	462
		Controllo	587			Controllo	579,5
<u>T<sub>2</sub>: 13/03/09, 3° Pesata; 10 giorni di trattamento.</u>				<u>T<sub>3</sub>: 27/03/09, 4° Pesata; 26 giorni di trattamento.</u>			
<i>Varietà pesata</i>	<i>Condizioni di conservazione</i>	<i>Trattamento applicato</i>	<i>Peso in grammi</i>	<i>Varietà pesata</i>	<i>Condizioni di conservazione</i>	<i>Trattamento applicato</i>	<i>Peso in grammi</i>
NAVELATE	30%	ABA	755,5	NAVELATE	30%	ABA	693
		AT	589			AT	542
		LPE	560			LPE	505,5
		Controllo	672,5			Controllo	622
	90%	ABA	642		90%	ABA	614,5
		AT	553			AT	527
		LPE	498,5			LPE	478,5
		Controllo	703			Controllo	677,5
PINALATE	30%	ABA	412,5	PINALATE	30%	ABA	378,5
		AT	469			AT	435
		LPE	381,5 *			LPE	288 *
		Controllo	388			Controllo	359,5
	90%	ABA	386,5 *		90%	ABA	263 **
		AT	445 *			AT	306,5 **
		LPE	444,5			LPE	420
		Controllo	562			Controllo	537

**Tabella 3.** Pesate di tutti i lotti. \* = pesata di 4 arance, poiché un'arancia è stata scartata dal lotto a causa di infezione da *Penicillium digitatum*. \*\* = pesata di 3 arance, poiché due arance sono state scartate dal lotto a causa di infezione da *Penicillium digitatum*.

Percentuale di perdita di peso					
<i>Varietà pesata</i>	<i>Condizioni di conservazione</i>	<i>Trattamento applicato</i>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
NAVELATE	30%	ABA	1,74	6,32	14,07
		AT	1,60	5,91	13,42
		LPE	2,07	7,44	16,45
		Controllo	1,48	5,35	12,46
	90%	ABA	1,19	4,46	8,56
		AT	1,13	4,24	8,74
		LPE	1,25	4,32	8,16
		Controllo	1,03	3,57	7,06
PINALATE	30%	ABA	1,70	6,67	14,37
		AT	1,7	6,2	13
		LPE	1,94		12,52
		Controllo	1,91	7,29	14,10
	90%	ABA	1,18	6,24	10,38
		AT	1,07	3,85	8,94
		LPE	1,39	5,12	10,35
		Controllo	1,28	4,26	8,52

**Tabella 4.** Percentuale di perdita di peso.

Dopo ogni pesata, è stato valutato il danno subito dalla buccia attraverso la conta delle ferite presenti su di essa. La conta delle ferite è stata eseguita a ogni "time point" (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>) per valutare l'entità del danno sulla buccia a seconda del trattamento e delle condizioni di conservazione.

La gravità del danno da stress idrico della buccia è stato valutato ed espresso con un indice detto "Peel Pitting Index" (PPI), un indice della quantità di "macchie" causate da stress idrico presenti sulla buccia delle arance. Per calcolarne il valore si sono contate le ferite di tutte le arance presenti nel lotto al momento della conta. Il valore di "peel pitting" attribuito ad ogni arancia, è stato assegnato utilizzando la scala riportata di seguito:

Senza danni = 0      Danni leggeri = 1      Danni medi = 2      Danni gravi = 3

L'indice di "peel pitting" del danno è stato quindi calcolato utilizzando la formula seguente:

$$(0 \times \text{n}^\circ \text{ di arance senza danni}) + (1 \times \text{n}^\circ \text{ di arance con danni leggeri}) + (2 \times \text{n}^\circ \text{ di arance con danni medi}) + (3 \times \text{n}^\circ \text{ di arance con danni gravi}) = \text{TOT} \div \text{n}^\circ \text{ arance totali del lotto.}$$

Ciascun valore è stato calcolato per ciascun lotto esaminato a un determinato T e ad una determinata RH. I dati relativi all'indice di "peel pitting" di tutte le tesi sono riportati in tabella 5.

<b>Varietà pesata</b>	<b>Condizioni di conservazione</b>	<b>Trattamento applicato</b>	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>
<b>NAVELATE</b>	30%	ABA	0	0,33	1,1	1,1 *
		AT	0	0,36	0,5	0,6
		LPE	0	0,4	0,3	0,4
		Controllo	0	0,66	0,9	1
	90%	ABA	0	0,5	0,8	1
		AT	0	0,19	0,6	0,6
		LPE	0	0,26	0,4	0,4
		Controllo	0	0,33	0,6	0,6 *
<b>PINALATE</b>	30%	ABA	0	0,46	1,2	1,4
		AT	0	0,46	0,6	0,8
		LPE	0	0,26	0,3	0,6
		Controllo	0	0,13	0,8	0,8
	90%	ABA	0	0,14	0,25	0,25
		AT	0	0,5	0,78	1,2
		LPE	0	0,07	0,33	0,4
		Controllo	0	0,13	0,7	1

**Tabella 5.** "Peel Pitting Index". Per i campioni identificati con l'asterisco (\*) il "peel pitting" reale calcolato sarebbe risultato inferiore a causa della perdita di alcuni frutti per infezione di funghi; dal momento che un lotto di frutti non può avere un'incidenza di ferite a un T successivo inferiore rispetto al T precedente, in questi casi è stato considerato lo stesso valore riscontrato al T anteriore.

#### **2.4 Estrazione dell'RNA e trattamento con DNAsi.**

Per l'estrazione dell'RNA sono stati impiegati 2 g di tessuto polverizzato e congelato in N<sub>2</sub> liquido, conservato a -80 °C. Il tessuto è stato scongelato con una miscela calda (60°C) contenente il tampone d'estrazione (Tris-HCL 1M pH8, NaCl 5M, EDTA 0.5M pH8, Sarkosyl 10%, PVP-40), β-MercaptoEtanolo e Fenolo. Una volta raffreddato è stata aggiunta una miscela di Cloroformio: alcool Isoamilico (CHCl<sub>3</sub>:IA, 24:1) e le fasi sono state separate mediante centrifugazione a 4.500 rpm per 20 minuti a 4 °C. L'estrazione è stata ripetuta due volte e la fase acquosa superiore contenente la maggior parte degli acidi nucleici, è stata recuperata. Successivamente la fase acquosa è stata incubata in ghiaccio a 4 °C per almeno una notte dopo l'aggiunta di LiCl 12M fino ad una concentrazione finale 3M per precipitare l'RNA. Dopo centrifugazione a 15.000 rpm per 30 minuti a 4 °C, la fase acquosa è stata

scartata e il pellet di RNA è stato lavato per due volte in Etanolo al 70%, mediante centrifugazione a 13.000 rpm per 5 minuti a T ambiente. Successivamente il pellet è stato lavato con AcNa 3M pH 6 mediante centrifugazione a 13.000 rpm per 5 min a T ambiente, ripetendo la procedura almeno 3-4 volte, fino ad ottenere un pellet pulito, cioè poco viscoso e quindi libero da polisaccaridi. Una successiva risospensione del pellet in Etanolo al 70% e centrifugazione, è stata aggiunta per garantire un'ulteriore pulizia. Il pellet è stato infine risospeso in 50 µl di H<sub>2</sub>O (acqua milliQ) e centrifugato per eliminare le impurità in sospensione.

L'integrità, purezza e concentrazione dell'RNA sono state valutate mediante lettura allo spettrofotometro (nanodrop) e una corsa elettroforetica su gel di agarosio. Nel caso in cui il campione fosse risultato non sufficientemente puro (rapporti di assorbanza a 260/280 e 260/230 inferiori a 2) , è stata rieseguita la seconda parte del protocollo, dalla precipitazione in LiCl.

I campioni contenenti l'RNA estratto sono stati conservati in congelatore a -80 °C. In seguito per eliminare il DNA genomico presente in tracce, sui campioni è stato eseguito il protocollo di digestione con la DNasi. Il trattamento con DNasi è stato effettuato come segue: 1 µl di DNasi I, 5,7 µl di 10x DNase I Reaction Buffer, campione totale di RNA e acqua milliQ fino ad un volume finale di 57 µl, incubati per 30 minuti a 37 °C. Dopo l'aggiunta di 40 µl di Fenolo/CHCl<sub>3</sub> (3:1) per l'eliminazione di eventuali proteine il campione è stato miscelato in vortex e centrifugato a 14,000 rpm per 10 minuti. Alla fase acquosa recuperata sono stati aggiunti 5 µl di NaOAc 3M e, dopo aver miscelato, 200 µl di EtOH. L'RNA è stato precipitato lasciando i campioni in congelatore a -80 °C per 1 ora. Dopo centrifugazione per 25 minuti a 4 °C, il supernatante è stato rimosso con cura e il pellet è stato lavato due volte con Etanolo al 70%. Il pellet, dopo essere stato asciugato bene, è stato risospeso in H<sub>2</sub>O (acqua milliQ) e l'RNA contenuto è stato quantificato per via spettrofotometrica (nanodrop). La concentrazione finale di RNA nei campioni è risultata compresa tra 1 e 5 µg/ µl.

## **2.5 RT-PCR real time.**

Per le analisi di espressione mediante RT-PCR real time è stato utilizzato un Roche LightCycler 2.0 che permette prima la retrotrascrizione degli RNA in cDNA e poi la quantificazione.

Il Mix preparato per la quantificazione dei geni di PLD e PLA<sub>2</sub> aveva un volume totale di 9 µL per ogni capillare e comprendeva:

- ✓ Primer Forward 3 µM
- ✓ Primer Reverse 3 µM
- ✓ Multiscribe (Trascrittasi inversa)
- ✓ Acqua milliQ
- ✓ SyBRGreen (dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, DNA polimerasi)
- ✓ Inibitore Rnasi

Al mix è stato aggiunto, per ogni campione, 1 µL di RNA estratto e trattato con DNasi alla concentrazione di 25 ng/µL. Per ogni campione di RNA estratto sono state eseguite delle diluizioni seriali dimezzando sempre la quantità di RNA contenuta come riportato di seguito (espressa in ng): 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25.

Per il gene di PLD il primer forward impiegato è 5'-AATTGTAGATGCTGATGCTGGTTATAA-3' (Cs-PLDb-F), il primer reverse è 5'-TTACCCGTGAAAGTAGGATTGTGA-3' (Cs-PLDb-R). Il gene dell'Actina è stato utilizzato come gene "housekeeping". Per il gene dell'Actina il primer forward impiegato è 5'-TTAACCCCAAGGCCAACAGA-3' (ACTIN-F), il primer reverse è 5'-TCCCTCATAGATTGGTACAGTATGAGAC-3' (ACTIN-R).

Il protocollo utilizzato per il Roche Lightcycler 2.0 è:

1. Attivazione dell'enzima Trascrittasi inversa e retrotrascrizione: 48°C per 30 min;
2. Denaturazione iniziale: 95°C per 10 min;
3. 40 cicli di amplificazione del cDNA neosintetizzato: 95°C per 15s; Melting: 40°C per 30s; annealing 65°C per 30 s; extension 72°C per 15 s. Cooling: 4-10 °C conservazione del DNA amplificato.

Per ogni gene da quantificare, sono stati inseriti i seguenti campioni di controllo:

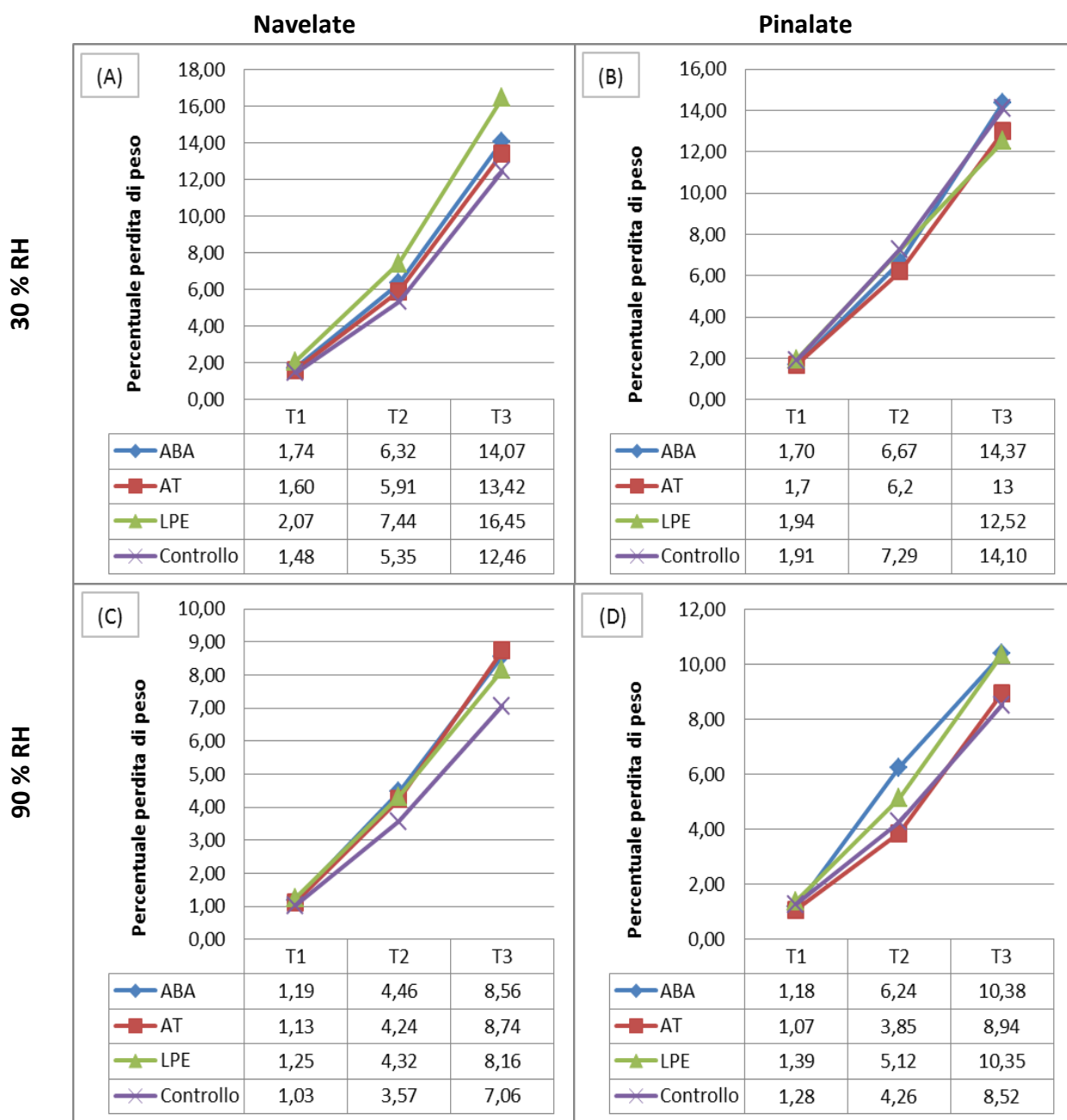
- NTC = No Template Control (campione non contenente l'RNA); controllo negativo
- ST = Campione senza Trascrittasi inversa, per verificare la purezza dei primers, e la presenza di contaminazioni con DNA genomico.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Indice di scostamento percentuale della perdita di peso.

La figura 9 mostra i quattro grafici relativi alla perdita di peso delle arance sottoposte ai quattro trattamenti (ABA, AT, LPE, Controllo), espressa come scostamento percentuale rispetto all'inizio dell'esperimento ( $T_0$ ).

Va ricordato che ABA è induttore di entrambe le fosfolipasi D e  $A_2$ , AT è inibitore di  $PLA_2$  e LPE è inibitore di PLD. Il controllo non prevede l'applicazione di nessun trattamento. Inoltre, in Navelate l'ormone ABA è espresso costitutivamente, mentre in Pinalate no.



**Figura 9.** Indice di scostamento percentuale della perdita di peso, rilevato per tutti i lotti ai tempi  $T_1, T_2$  e  $T_3$ . Con 30% RH e 90% RH si indicano le due condizioni di conservazione ad umidità relativa (RH) diverse. ABA, AT, LPE e Controllo si riferiscono ai lotti trattati rispettivamente con ABA, AT, LPE e Controllo.  $T_1, T_2$  e  $T_3$  indicano i tempi di conservazione, rispettivamente 3 giorni, 10 giorni e 26 giorni.

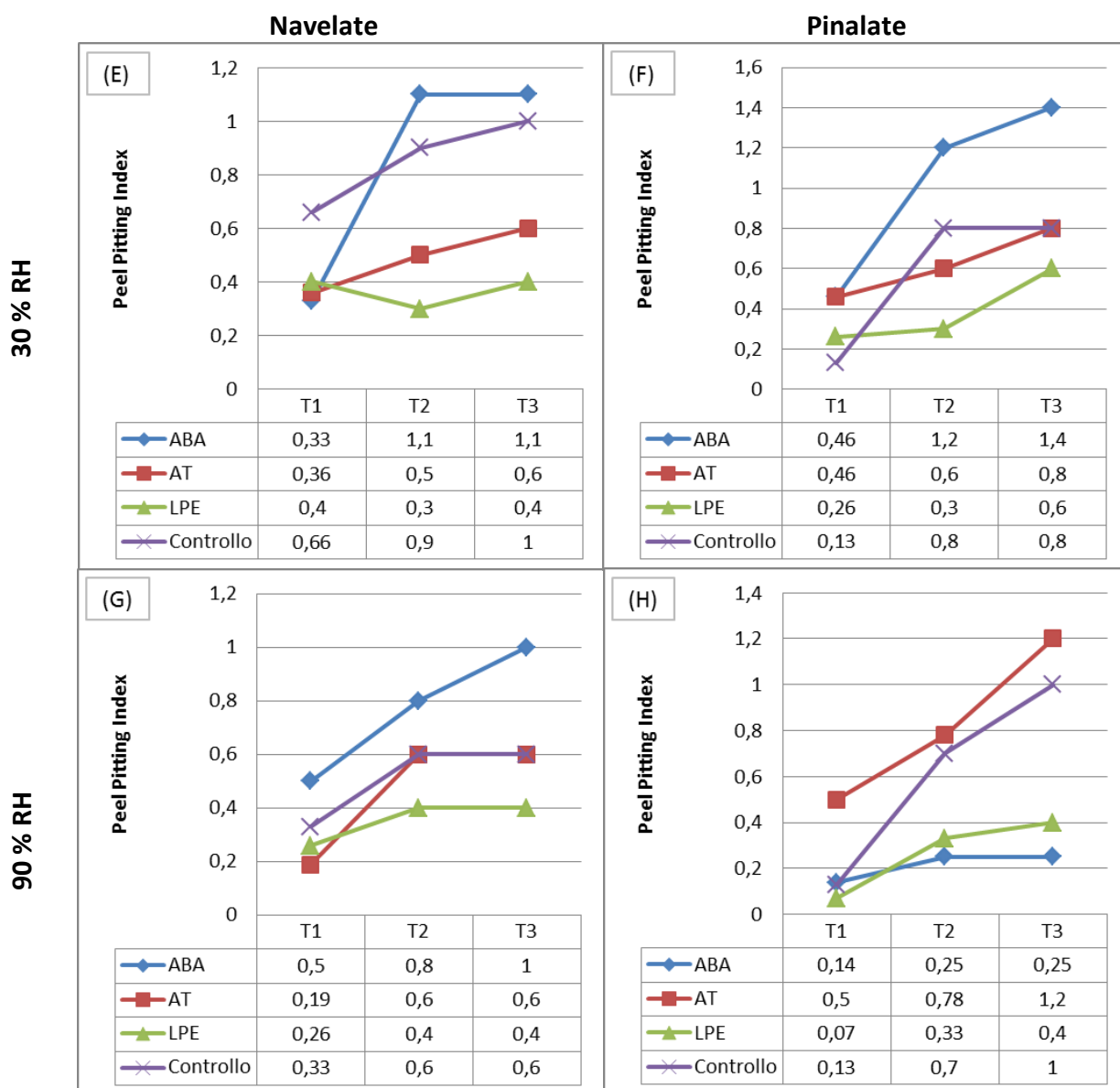
Il grafico A corrisponde a tutti i lotti contenenti arance della varietà Navelate conservati a 30% di RH, il grafico B è comprensivo di tutti i lotti formati da arance Pinalate conservati a 30% di RH. Il grafico C corrisponde a tutti i lotti contenenti arance Navelate conservati a 90% di RH mentre il grafico D comprende tutti i lotti di arance Pinalate conservati a 90% di RH. L'indice di scostamento percentuale della perdita di peso è stato calcolato nei tre momenti  $T_1, T_2$  e  $T_3$ , corrispondenti rispettivamente a 3 gg, 10 gg e 26 gg di conservazione.

Con uno sguardo generale ai grafici si nota subito come nella conservazione a 30% RH (grafico A e B) si è avuta una maggior perdita di peso rispetto alla conservazione a 90% (grafico C e D), in tutti i trattamenti e in entrambe le varietà considerate. Infatti in Navelate si è passati da valori compresi tra 12 e 16 (grafico A) e valori compresi tra 7 e 9 (grafico C). In Pinalate si è avuta una situazione analoga, passando da valori compresi tra 12 e 14,5 in condizioni di elevato stress idrico (30% RH) (grafico B), a valori più bassi, compresi tra 8 e 10,5 in condizioni di minor stress (90%RH) (grafico D). Questi risultati corrispondono al fatto che la frutta immagazzinata in condizione di maggior stress idrico, perda più peso in acqua. In generale, non si sono riscontrate differenze significative nè tra le due Cv, nè tra i diversi trattamenti applicati con gli inibitori di fosfolipasi. Si può però osservare che la tesi trattata con ABA ha sempre riportato valori al di sopra del controllo, facendo pensare che arance trattate con Acido abscissico risultino più sensibili alla perdita di peso.

### **3.2 Incidenza del “peel pitting”.**

In figura 10 sono mostrati i quattro grafici relativi al “peel pitting” delle arance sottoposte ai quattro trattamenti (ABA, AT, LPE, Controllo). Va ricordato che con “peel pitting” si indicano i danni causati da fosfolipasi sul flavedo del frutto, che è misurato secondo il “Peel Pitting Index” (PPI), indice di “peel pitting”, calcolato come descritto nel capitolo “Materiali e metodi”.





**Figura 10.** “Peel Pitting Index” (PPI), rilevato per ogni lotto ai tempi T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>. Con 30% RH e 90% RH si indicano le due condizioni di conservazione ad umidità relativa (RH) diverse. ABA, AT, LPE e Controllo si riferiscono ai lotti trattati rispettivamente con ABA, AT, LPE e Controllo. T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> indicano i tempi di conservazione, rispettivamente 3 giorni, 10 giorni e 26 giorni.

I grafici E ed F riportano l’incidenza del “peel pitting” di tutti i lotti conservati a 30% RH, il primo di arance Navelate e il secondo di arance Pinalate. I grafici G e H riportano l’incidenza del “peel pitting” dei lotti conservati a 90% RH, il primo di arance Navelate e il secondo di arance Pinalate. In ogni grafico l’incidenza del “peel pitting” è stata calcolata in tre tempi T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, corrispondenti rispettivamente a 3 gg, 10 gg e 26 gg di conservazione.

Da un'analisi dei quattro grafici di figura 10, si può dedurre che l'incidenza del "peel pitting" è risultata, in una certa misura, dipendente dai trattamenti con ABA. In generale si è potuto notare una maggiore incidenza del fenomeno in seguito al trattamento in tutti i casi, fatta eccezione per Pinalate in presenza di 90% RH, per cui è stata riscontrata una riduzione significativa del "peel pitting" nella tesi trattata con ABA. È interessante notare come il trattamento con ABA in Pinalate abbia riportato i valori di incidenza del disordine del flavedo a livelli molto simili a quelli riscontrati nella Cv Navelate, suggerendo una stretta relazione tra livelli endogeni di ABA e incidenza del fenomeno. Concentrandosi sui trattamenti con gli inibitori AT e LPE, nel grafico E si nota una importante differenza tra il controllo e i lotti trattati. Quindi in Navelate conservata a 30% RH gli inibitori di fosfolipasi AT e LPE hanno portato a un sensibile contenimento dei danni del flavedo, senza differenze di rilievo tra i trattamenti. In presenza di 90% RH (grafico G) questa differenza è stata riscontrata soltanto per il trattamento con LPE, infatti i tre lotti rimanenti hanno riportato valori abbastanza vicini tra loro (ad es. il lotto AT e il controllo avevano lo stesso valore ai  $T_2$  e  $T_3$ ). Un confronto tra il grafico E e il grafico G ha permesso di evidenziare che nei lotti trattati con AT e LPE non sono state riscontrate differenze evidenti di valori del "peel pitting" tra condizioni di conservazione a elevato stress idrico (30% RH) e condizioni a basso stress idrico (90% RH), differenza invece che si è verificata nel lotto di controllo (minore incidenza del "pitting" in presenza di 90% RH). Per quanto riguarda Pinalate, il grafico F mostra innanzitutto che, a parte il momento  $T_1$ , il lotto di controllo ha presentato valori molto simili al lotto AT. Una risposta diversa è stata invece riscontrata per il lotto trattato con LPE che si è presentato più resistente al "peel pitting", rispetto al controllo. Confrontando il grafico E con il grafico F risulta evidente la differenza tra i due lotti di controllo di Navelate e Pinalate, soprattutto al  $T_1$ , con valori significativamente minori in Pinalate. Ciò va ad ulteriore conferma che il "peel pitting" è parzialmente dipendente dall'ABA, considerando infatti che Pinalate è caratterizzata da livelli inferiori dell'ormone nel flavedo. Nel grafico H si nota una forte incidenza di "peel pitting" nel lotto AT in tutti e tre i tempi. Anche il lotto di controllo presenta alti valori nei  $T_2$  e  $T_3$ , avvicinandosi al lotto AT. Il lotto LPE invece è risultato resistente. In generale si può affermare che le tesi trattate con l'inibitore di fosfolipasi LPE sono risultate sempre quelle maggiormente resistenti all'insorgenza di "peel pitting" rispetto alle tesi di controllo.

Di seguito in figura 11 si riporta un'immagine illustrante un esempio di "peel pitting" del flavedo di arancia Navelate.

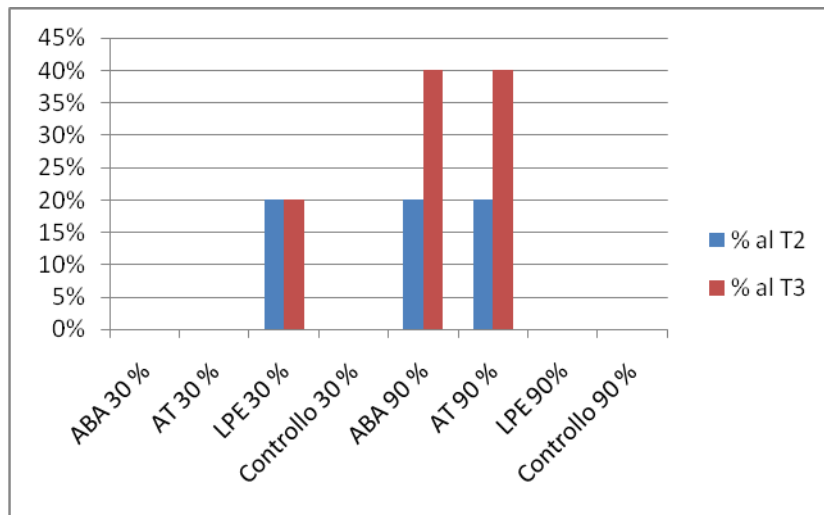


**Figura 11.** Foto di "peel pitting" in Navelate. A sinistra arancia danneggiata, a destra arancia sana.

### **3.3 Incidenza di infezioni di funghi.**

Nella conservazione della frutta è spesso possibile riscontrare infezioni da parte di funghi, in particolare del genere *Penicillium*. Nel nostro caso prolungate condizioni di conservazione (fino a 26 gg) a diverse umidità, ha favorito lo sviluppo di funghi su alcune arance.

Il grafico riportato in Figura 12 mostra l'incidenza delle infezioni da fungo (*Penicillium*) sui lotti di arance Pinalate conservati a 90% di umidità relativa. Nessuna arancia Navelate è stata infettata. Si può notare che nessuna arancia è stata infettata al T<sub>1</sub>, cioè a 3 giorni di conservazione. Le prime arance infette sono state rilevate al T<sub>2</sub> nel lotto LPE conservato a 30% RH, nei lotti ABA e AT conservati a 90% RH. Al T<sub>3</sub> la percentuale d'incidenza delle infezioni è aumentata solo nei lotti ABA 90% RH e AT 90 %RH, restando stabile nel lotto di LPE conservato a 30% RH. Le arance soggette ad infezione sono state eliminate e non considerate per le analisi della perdita di peso e incidenza del "peel pitting".



**Figura 12.** Percentuale delle perdite dovute a incidenza dei funghi. Il grafico si riferisce solo ad arance Pinalate che sono state a infettate da *Penicillium* al T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>. Nessuna arancia Navelate è stata infettata.

### 3.4 Estrazione di RNA da campioni di flavedo.

Per studiare le basi molecolari del “peel pitting”, sono stati prelevati campioni di flavedo delle diverse tesi di arance Pinalate e Navelate ai tempi indicati (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>) per un totale di 50 campioni. Da questi campioni sono stati estratti gli RNA per le successive analisi di espressione e nella tabella di seguito sono riportati i risultati delle estrazioni di RNA di tutti i cinquanta campioni, più una riprecipitazione di quattro campioni che alla prima estrazione erano risultati non sufficientemente puri. La qualità dei campioni di RNA è stata valutata sulla base dei rapporti di assorbanza a 260/280 e 260/230 nm (purezza) e dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio (integrità). Per i campioni con valori dei rapporti di assorbanza inferiori a 2 si è proceduto alla riprecipitazione/purificazione dell’RNA (campioni sottolineati in tabella 6, con rapporti di assorbanza evidenziati con asterisco). Le estrazioni di RNA dai campioni di tessuto sono state eseguite per poi procedere alla quantificazione dell’espressione genica attraverso l’uso della RT-PCR real time.

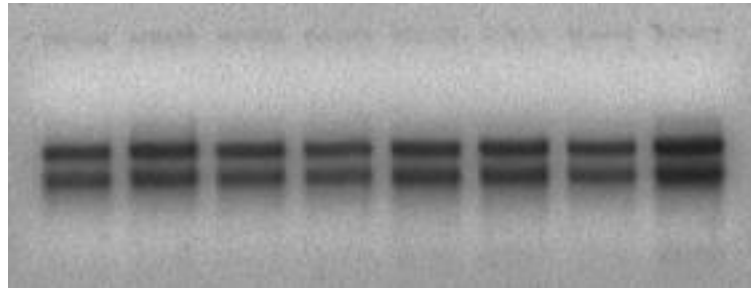
Campione n°	Descrizione campioni	ng/μl	260/280	260/230
N1	ST-0gg	879,31	2,17	2,12
P2	ST-0gg	1246,76	2,16	2,19
N3	30%-AT-3gg	1167,21	2,18	2,14
N4	30%-ABA-3gg	430,84	2,05	1,65

N5	30%-LPE-3gg	908,86	2,17	2,21
N6	30%-Controllo-3gg	1386,93	2,16	2,22
P7	30%-AT-3gg	424,78	2,09	2,09
P8	30%-ABA-3gg	742,09	2,18	2,08
P9	30%-LPE-3gg	1309,17	2,15	2,17
P10	30%-Controllo-3gg	1062,75	2,15	2,18
N11	90%-AT-3gg	3180,68	2,01	2,15
N12	90%-ABA-3gg	2510,67	2,08	2,19
N13	90%-LPE-3gg	3021,98	2,02	2,16
N14	90%-Controllo-3gg	2527,88	2,08	2,19
<u>P15</u>	<u>90%-AT-3gg</u>	<u>3855,75</u>	<u>1,82*</u>	<u>1,92*</u>
<u>P16</u>	<u>90%-ABA-3gg</u>	<u>3975,36</u>	<u>1,72*</u>	<u>1,79*</u>
<u>P17</u>	<u>90%-LPE-3gg</u>	<u>3262,85</u>	<u>1,96*</u>	<u>2,05*</u>
P18	90%-Controllo-3gg	2102,94	2,1	2,16
N19	30%-AT-10gg	813,45	2,11	1,83
N20	30%-ABA-10gg	1644,4	2,11	2,07
N21	30%-LPE-10gg	1547,35	2,11	2,1
N22	30%-Controllo-10gg	1011,99	2,09	1,95
P23	30%-AT-10gg	851,85	2,11	1,9
P24	30%-ABA-10gg	1656,34	2,1	2,12
P25	30%-LPE-10gg	1005,98	2,11	2,05
P26	30%-Controllo-10gg	972,26	2,11	1,98
N27	90%-AT-10gg	3935,49	1,77	1,81
N28	90%-ABA-10gg	1278,33	1,88	1,74
N29	90%-LPE-10gg	2771,74	2,06	2,16
N30	90%-Controllo-10gg	3438,33	1,98	2,07
P31	90%-AT-10gg	2356,34	2,09	2,16
P32	90%-ABA-10gg	1602,27	2,14	2,14
P33	90%-LPE-10gg	1923,24	2,1	2,07

P34	90%-Controllo-10gg	2529,36	2,07	2,1
N35	30%-AT-26gg	1743,99	2,08	2,11
N36	30%-ABA-26gg	1061,28	2,11	2,06
N37	30%-LPE-26gg	737,19	2,13	1,93
N38	30%-Controllo-26gg	860,47	2,13	2,01
P39	30%-AT-26gg	1077,5	2,1	2,09
P40	30%-ABA-26gg	1555,28	2,08	2,08
P41	30%-LPE-26gg	2112,2	2,08	2,17
P42	30%-Controllo-26gg	1076,34	2,11	2,06
N43	90%-AT-26gg	2248,03	2,11	2,15
N44	90%-ABA-26gg	1445,88	2,15	2,15
N45	90%-LPE-26gg	2180,83	2,09	2,15
N46	90%-Controllo-26gg	1168,12	2,16	2,05
P47	90%-AT-26gg	2378,18	2,11	2,14
P48	90%-ABA-26gg	2839,83	2,08	2,14
P49	90%-LPE-26gg	1967,22	2,12	2,17
P50	90%-Controllo-26gg	1695,93	2,13	2,13
<b>Valori dopo la riprecipitazione dei campioni:</b>				
N13	90%-LPE-3gg	2054,18	2,14	2,35
P15	90%-AT-3gg	1640,46	2,15	2,4
P16	90%-ABA-3gg	1214,21	2,15	2,42
P17	90%-LPE-3gg	1140,81	2,16	2,37

**Tabella 6.** Risultati delle estrazioni di RNA. La tabella mostra i rapporti 260/280 e 260/230 e la concentrazione di RNA per ogni campione espressa in ng/ $\mu$ l. N indica che il campione è Navelate, P Pinalate. La descrizione del campione riportata nella seconda colonna indica il grado di umidità relativa durante la conservazione, il trattamento impiegato e i giorni di conservazione.

In figura 13 è riportata la foto di una corsa elettroforetica su gel di agarosio di alcuni campioni rappresentativi.



**Figura 13.** Foto di elettroforesi su gel di agarosio di RNA. Sono visibili le due bande tipiche dell'RNA ribosomiale, con le quali si apprezza la diversa concentrazione e purezza dei campioni; in alto i pozzetti d'inserimento dei campioni. I campioni visualizzati sono in ordine da sinistra: P41, P42, N43, N44, N45, N46, P47, P48.

Tutte le estrazioni di RNA sono risultate buone per l'impiego di RT-PCR quantitativa, con RNA senza evidenti segni di degradazione e con rapporti di assorbanza superiori a 2. È in corso la quantificazione dell'espressione dei geni delle fosfolipasi D e A<sub>2</sub> mediante RT-PCR real time.

#### 4- CONCLUSIONI

Dai dati di incidenza di “peel pitting” nelle diverse tesi in conservazione si evince che la Cv Pinalate risulta meno suscettibile. Ciò è coerente con la minore biosintesi di ABA riscontrata nel flavedo di questa Cv rispetto alla Cv Navelate. I trattamenti con ABA hanno riportato tale incidenza a livelli comparabili a quelli riscontrati in Navelate, suggerendo che il disordine fisiologico potrebbe dipendere in buona parte dai livelli dell’ormone. I trattamenti con inibitori delle fosfolipasi hanno evidenziato un effetto inibitorio significativo in tutti i casi solamente per LPE, l’inibitore di PLD, mentre AT in molti casi non ha avuto effetti di rilievo rispetto al controllo. Ciò potrebbe, se confermato, indurre a concludere che l’evento regolativo primario nella mediazione dell’induzione del “peel pitting” da parte di ABA è principalmente determinato dall’azione di PLD.



## 5- BIBLIOGRAFIA

**Alferez F., Lluch Y., Burns J. K.** (2008). Phospholipase A<sub>2</sub> and postharvest “peel pitting” in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 69-76.

**Alferez, F., Pozo, L., Burns, J.,** (2006). Physiological changes associated with senescence and abscission in mature citrus fruit induced by 5-chloro-3-methyl-4-nitro-1H-pyrazole and ethephon application. *Physiol. Plant* 127, 66–73.

**Alférez F., Romero P., Gandía M.** (2009). Inhibiting Phospholipase A<sub>2</sub> and D Activities Alters Postharvest Performance of Citrus Fruit. In pubblicazione.

**Alférez F., Sala J. M., Sanchez-Ballesta M. T., Mulas M., Lafuente M. T., Zacarias L.** (2005). A comparative study of the postharvest performance of an ABA-deficient mutant of oranges: I. Physiological and quality aspects. *Postharvest Biol. Technol.* 37: 222-231.

**Assmann, S.M.** (2003). OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in Arabidopsis guard cells. *Trends Plant Sci.* 8: 151–153.

**Bargmann, B.O., Munnik, T.** (2006). The role of phospholipase D in plant stress responses. *Curr. Op. Plant Biol.* 9: 515-522.

**Bartz J. A., Brecht J. K..** (2003). Postharvest physiology and pathology of vegetables. Cap.5: Transpiration and water stress, pag 112. CRC Press; 2° edition.

**Creelman, R.A., Mulpuri, R.** (2002). The oxylipin pathway in *Arabidopsis*. The Arabidopsis book.

**Davies W. J., Jones H. G.** (1991). Abscisic acid: physiology and biochemistry. Coronet Books.

**Denekamp, M., Smeekens, S.C.,** (2003). Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the AtMYB102 transcription factor gene. *Plant Physiol.* 132, 1415–1423.

**Diseases of Citrus in Arizona.** Plant Disease Publications.  
<http://ag.arizona.edu/pubs/diseases/az1154/>

**Eisenpahr, K.J., Maeda, M., Thompson, G.A. Jr.** (1988). Concurrent changes in *Dunaliella salina* ultrastructure and membrane phospholipid metabolism after hyperosmotic shock. *J. Cell Biol.* 107: 529-538.

**Fan, L.-M., Zhao, Z., and Assmann, S.M.** (2004). Guard cells: A dynamic signaling model. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 537–546.

**Farag, K.M., Palta, J.P.** (1993). Use of lysophosphatidyletanolamine, a natural lipid, to retard tomato leaf and fruit senescence. *Physiol. Plant.* 87:515-521.

**Finkelstein, R.R., Gampala, S.S., and Rock, C.D.** (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14: S15–S45.

**Frank, W., Munnik, T., Kerkmann, K., Salamini, F., Bartels, D.** (2000). Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12, 111-124.

**González-Candelas L., Sánchez-Torre P., Alamar S., Establés B., Ballester A.R., Sánchez-Ballesta M.T., Lluch Y., Gosalbes M.J., Zacarias L., Marcos J.F., Lafuente M.T., Forment J., Granell A.** Genomic approaches to postharvest biotic and abiotic stresses of *citrus* fruit. *ISHS Acta Horticulturae* 682: V International Postharvest Symposium.

**Gosalbes, M.J., Zacarias, L., Lafuente, M.T.,** (2004). Characterization of the expression of an oxygenase involved in chilling-induced damage in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 33, 219–228.

**Gosti, F., Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A.A.R., Vartanian, N., and Giraudat, J.** (1999). ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11: 1897–1909.

**Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., Hoenher, B., and Grill, E.** (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21: 3029–3038.

**Hirayama, T., and Shinozaki, K.** (2007). Perception and transduction of abscisic acid signals: Keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 12: 343–351.

- Hong Y., Zhang W., Wang X.** (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, Cell and Environment* 33: 627–635.
- Lafuente M. T., Martínez-Téllez M. A., Zacarías L.** (1997). Abscisic Acid in the Response of 'Fortune' Mandarins to Chilling. Effect of Maturity and High-Temperature Conditioning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73: 494–502.
- Li M., Hong Y., Wang X.** (2009). Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1791, 927–935.
- Liu, X.G., Yue, Y.L., Li, B., Nie, Y.L., Li, W., Wu, W.H., and Ma, L.G.** (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315: 1712–1716.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Krote, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068.
- Mao, L., Pang, H., Wang, G.,** (2007). Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biol. Technol.* 44, 42–47.
- Matos, A.R., d'Arcy-Lameta, A., France, M., Petres, S., Edelman, L., Kader, J., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T.,** (2001). A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Lett.* 491, 188–192.
- Meijer, H.J.G., Arisz, S.A., van Himbergen, J.A.J., Musgrave, A., Munnik, T.,** (2001). Hyperosmotic stress rapidly generates lysophosphatidic acid in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 25, 541–548.
- Meijer, H.J.G., Munnik, T.,** (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54, 265–306.
- Mengual V. A., Serra M. L. F., Marin P. E., Casanova A. J. M., Miret J. A. J., Cadenas A. G.** (2003). Influence of abscisic acid and other plant growth regulators on citrus defence mechanism to salt stress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1: 59-65.

- Mishra, G., Zhang, W., Deng, F., and Wang, X.** (2006). A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*. *Science* 312: 264–266.
- Nilson, S.E., and Assmann, S.M.** (2007). The control of transpiration. Insights from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 19–27.
- Oh B.J., D. Balint & J.Giovannoni.** (1994). DNase Digestion/Treatment of total RNA sample.
- Page, T., Griffiths, G., Buchanan-Wollaston, V.,** (2001). Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* 125, 718–727.
- Pandey, S., Nelson, D.C., and Assmann, S.M.** (2009). Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136: 136–148.
- Park, S.-Y., et al.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PRY/PYL family of START proteins. *Science* 324:1068–1071.
- Raven Peter H., Evert Ray F., Eichhorn Susan E.** (2002). *Biologia delle piante*. Cap. 24: Regolamento della crescita e dello sviluppo: gli ormoni vegetali, pag 487. Zanichelli ed.
- Rodrigo M.J., Marcos J.F., Alférez F., Mallent M.D., Zacarías L.** (2003). Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 383, pp. 727-738
- Ryu, S.B., Karlsson, B.H, Ozgen, M., Palta, J.P.,** (1997). Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 12717-12721.
- Sanchez-Ballesta, M.T., Lluch, Y., Gosalbes, M.J., Zacarias, L., Granell, A., Lafuente, M.T.,** (2003). A survey of genes differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. *Planta* 218, 65–70.
- Sang, Y., Zheng, S., Li, W., Huang, B., and Wang, X.** (2001). Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Da. *Plant J.* 28: 135–144.

- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., and Allen, G.J.** (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410: 327–330.
- Shen, Y.Y., et al.** (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823–826.
- Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W., and Welti, R.** (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* 45: 250–278.
- Wang, X., Wang, C., Sang, Y., Qin, C., Welti, T.** (2002). Networking of phospholipases in plant signal transduction. *Physiol. Plant.* 115: 331-335.
- Wang, X.-Q., Ullah, H., Jones, A.M., and Assmann, S.M.** (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cell. *Science* 292: 2070–2072.
- Xiong, L., and Zhu, J.-K.** (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 133: 29–36.
- Zhang Y., Zhu H., Zhang Q., Li M., Yan M., Wang R., Wang L., Welti R., Zhang W., Wang X.** (2009). Phospholipase D $\alpha$ 1 and Phosphatidic Acid Regulate NADPH Oxidase Activity and Production of Reactive Oxygen Species in ABA-Mediated Stomatal Closure in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 21: 2357–2377.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., and Wang, X.** (2004). Phospholipase D $\alpha$ 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9508–9513.
- Zhang, W., Yu, L., Zhang, Y., and Wang, X.** (2005). Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* 1736: 1–9.