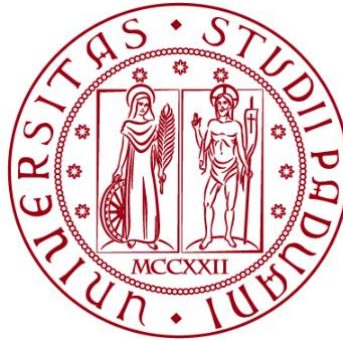


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**ATTIVAZIONE DI RISPOSTE DI DIFESA NELLE PIANTE
MEDIANTE TRATTAMENTO CON ACQUA ATTIVATA DAL
PLASMA FREDDO**

**Tutor: Prof.ssa Lorella Navazio
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Irene Povoleri

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Abstract

1. Stato dell'arte	1
1.1 Il plasma ed il plasma freddo	1
1.2 Acqua attivata dal plasma freddo: cos'è e quali sono i metodi di produzione ...	1
1.3 Medicina del plasma	3
1.3 Plasma freddo e PAW in agricoltura.....	4
2. Approccio sperimentale	7
2.1 Produzione di acqua attivata dal plasma (PAW)	7
2.2 Materiale vegetale e condizioni di crescita	7
2.3 Trattamenti delle piante con PAW	7
2.4 Estrazione di RNA	9
2.5 Analisi di espressione genica mediante qRT-PCR.....	10
2.6 Preparazione di librerie di piccoli RNA sequenziati e analisi bioinformatica delle sequenze	10
2.7 Predizione dei geni target per i miRNA espressi in modo differenziale.....	10
3 Risultati e discussione	11
3.1 Composizione chimica della PAW	11
3.2 Sovra-espressione di geni in germogli di pervinca dopo trattamento con PAW	11
3.3 Sovra-espressione di geni in piante di vite dopo trattamento con PAW	13
3.4 Cambiamenti di espressione di miRNA in piante di pervinca dopo trattamento con PAW	14
3.5 Conclusioni	15
Bibliografia	17

Abstract

Il plasma freddo, anche detto “plasma non termico”, è un gas parzialmente ionizzato, altamente reattivo a bassa temperatura. Le sue proprietà chimiche particolari lo rendono uno strumento molto utile che presenta già oggi delle importanti applicazioni, specialmente nell’industria agro-alimentare.

Studi recenti hanno dimostrato effetti positivi a livello della germinazione dei semi e della crescita delle piante, e ci sono crescenti evidenze della possibilità di utilizzare questa tecnologia innovativa per potenziare la resistenza delle piante a stress ambientali.

Nell'articolo, la cui discussione critica è oggetto di questa tesi, piante di pervinca e di vite sono state trattate con acqua attivata dal plasma (PAW) per intervalli di tempo diversi. Sono state quindi condotte analisi mediante qRT-PCR per valutare l’espressione differenziale di geni codificanti enzimi coinvolti nella sintesi delle fitoalessine. Infine, sono state preparate librerie di piccoli RNA ed è stata condotta un’analisi bioinformatica delle sequenze. I risultati ottenuti in questo lavoro dimostrano che nelle piante trattate con PAW si ha l’induzione dell’espressione di geni che hanno un ruolo nelle risposte di resistenza a stress biotici. È possibile quindi confermare che i trattamenti effettuati con l’acqua attivata dal plasma possano migliorare le risposte di difesa delle piante, tramite modifiche nell’espressione genica.

Zambon, Y., Contaldo, N., Laurita, R., Várallyay, E., Canel, A., Gherardi, M., Colombo, V., & Bertaccini, A. (2020). Plasma activated water triggers plant defence responses. *Scientific Reports*, 10:19211.<https://doi.org/10.1038/s41598-020-76247-3>

1. Stato dell'arte

1.1 *Il plasma ed il plasma freddo*

Il plasma è considerato il quarto stato della materia, distinguendosi dagli stati: solido, liquido e aeriforme.

Può essere descritto come un gas parzialmente ionizzato, globalmente neutro (la sua carica totale è nulla), e che contiene particelle cariche e neutre, come ioni, elettroni, radicali, molecole eccitate e fotoni.

Nell'universo il plasma è lo stato della materia più diffuso, mentre sulla terra, in natura, la sua presenza è limitata: è rilevabile principalmente durante la generazione di fulmini e dell'aurora boreale.

Il plasma può essere prodotto anche in modo artificiale e si distingue in termico e non termico: in entrambi i casi esso viene utilizzato in svariate applicazioni.

Il plasma freddo, o plasma non termico, deve il suo nome allo squilibrio termodinamico tra elettroni (che raggiungono 10^5 K), e particelle pesanti come ioni e radicali (che raggiungono 300 K) (Holubová et al., 2020). Esso presenta una temperatura di massimo 60 °C. Il plasma freddo viene generato applicando una elevata energia ad un gas, in particolare sottoponendolo ad una elevata tensione elettrica (Adhikari et al., 2020): questa operazione viene compiuta a pressione atmosferica. Durante la generazione del plasma si formano inizialmente gli elettroni che, sottoposti al campo elettrico, accelerano nel mezzo gassoso (Holubová et al., 2020). Si verificano poi vari processi come ionizzazione, dissociazione, eccitazione di particelle che portano alla formazione dei vari componenti del plasma.

L'applicazione del plasma ha un ruolo importante in diverse aree commerciali. Il plasma ad elevate temperature è fondamentale nel processo di fusione nucleare, e in molti processi produttivi, come la fusione di metalli, il taglio e la saldatura al plasma (Heberlein, 2002). Inoltre, il plasma viene utilizzato nell'industria automobilistica per produrre vernici di alta qualità e nell'industria tessile per trattare fibre naturali come cotone e lana al fine di rimuovere le impurità e facilitarne il processo di tintura (Weltmann et al., 2019). Infine, grazie al plasma non termico, è stato possibile l'utilizzo di approcci innovativi in ambito biomedico, con la "medicina del plasma" e nell'ambito della biologia vegetale, come si vedrà in modo più specifico più avanti.

1.2 *Acqua attivata dal plasma freddo: cos'è e quali sono i metodi di produzione*

Il trattamento dell'acqua con plasma freddo permette di ottenere PAW (plasma activated water), ovvero acqua attivata dal plasma. La PAW presenta proprietà differenti rispetto a quelle dell'acqua da cui essa è stata originata. Le principali differenze si riscontrano in cambiamenti di:

- *concentrazione di specie chimiche*: dopo l'attivazione tramite plasma, l'acqua presenta al suo interno specie reattive dell'ossigeno (ROS: reactive oxygen species) e dell'azoto (RNS: reactive nitrogen species), che complessivamente sono chiamate RONS. Le specie più rilevanti che si possono formare nell'acqua sono: il perossido di idrogeno (H_2O_2), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Si possono anche formare dei RONS secondari, generati da quelli primari. In Figura 1 sono rappresentati i principali componenti chimici della PAW.
- *pH*, ovvero la misura della concentrazione di ioni idrogeno in una soluzione. Le reazioni che hanno luogo tra le specie chimiche formate nel plasma e l'acqua danno luogo al processo di acidificazione: il pH diventa più basso (da 0 a 7), cioè la soluzione diventa più acida. Il pH diminuisce all'aumentare del tempo di attivazione per la formazione di acidi forti.
- *potenziale redox*, ovvero la capacità di una soluzione di ossidare o ridurre un'altra sostanza: dipende dalla concentrazione di specie ossidanti, come il perossido di idrogeno (H_2O_2). Nella PAW si verifica un aumento del potenziale redox, fattore importante per quanto riguarda l'azione antimicrobica di PAW.
- *conducibilità*, ovvero la misura della capacità dell'acqua di facilitare il flusso di corrente elettrica attraverso di essa. La formazione di ROS e RNS contribuisce all'aumento della conducibilità (Thirumdas et al., 2018).

Le proprietà della PAW e la composizione delle specie chimiche al suo interno dipendono da vari fattori: gas di lavoro, sorgente del plasma, metodi di attivazione e tempo di attivazione.

Il *gas di lavoro*, ovvero il gas che viene utilizzato per generare il plasma, può essere di varia natura, per esempio neon, argon, azoto ma anche ossigeno e aria. Si possono anche utilizzare delle miscele di questi gas. In Figura 1 sono rappresentati diversi gas di lavoro e le specie chimiche che si formano nella PAW.

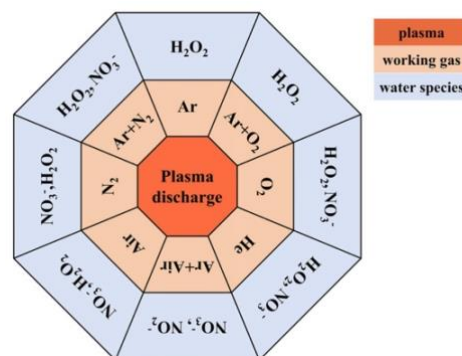


Figura 2. Effetti del gas di lavoro sulla formazione delle principali specie chimiche prodotte nella PAW (da Guo et al., 2021).

Esistono varie *sorgenti di plasma*, ovvero dispositivi che fungono da generatori di plasma freddo: scarica a barriera dielettrica (DBD), torcia, scarica a bagliore, scarica a scintilla, carica a corona e scarica ad arco planante. La scelta della strumentazione utilizzata come sorgente di plasma influirà sulle caratteristiche della PAW, come la composizione di specie reattive e di conseguenza proprietà chimiche e fisiche (Guo et al., 2021).

Esistono inoltre due *metodi di attivazione dell'acqua*: la scarica di plasma può avvenire sopra o sotto la superficie dell'acqua. Le proprietà della PAW e prodotti di reazione generati al suo interno sono differenti nell'applicazione dei due metodi: nel caso della scarica sotto la superficie dell'acqua, quest'ultima diventa risposta di scarica, rendendo la reazione più forte e producendo specie più reattive. In particolare, visto che il contenuto di ossigeno nell'acqua è superiore a quello dell'aria (a volume costante), si generano gruppi contenenti ossigeno, che hanno la possibilità di produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed elettroni liberi (Guo et al., 2021). La PAW generata con questo metodo presenta un maggior potenziale redox e una maggiore conducibilità.

Il *tempo di attivazione* consiste nel tempo utilizzato per attivare l'acqua tramite la scarica di plasma. Maggiore è questo tempo, maggiore sarà la concentrazione di RONS, come nitrati e perossido di idrogeno.

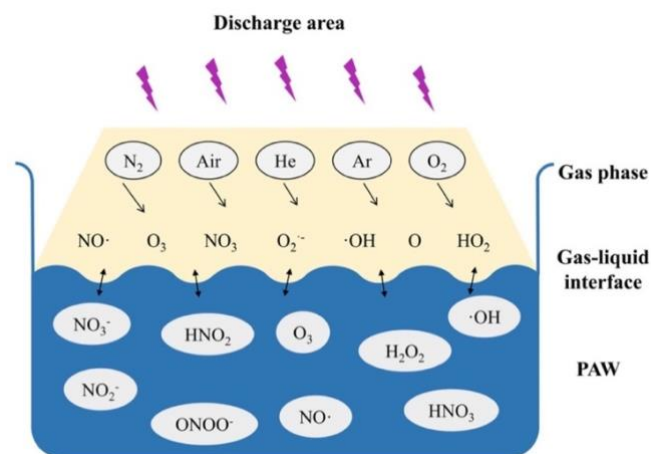


Figura 3. Rappresentazione schematica della formazione dei componenti chimici della PAW (da Guo et al., 2021).

Le proprietà chimico-fisiche di PAW e le sue caratteristiche la rendono uno strumento molto utile per le applicazioni che verranno descritte in seguito.

1.3 Medicina del plasma

Il progresso della ricerca sulle applicazioni del plasma ha dato vita ad un nuovo campo della medicina, chiamato appunto “medicina del plasma”.

Per quanto riguarda l'applicazione di sorgenti di plasma per uso biomedico, gli interventi possono essere distinti in due grandi categorie: la prima riguarda i trattamenti compiuti *in loco*, durante i quali la zona di scarica attiva, o il pennacchio di plasma a temperatura ambiente, entra in contatto diretto con il bersaglio biologico. Questa alternativa viene scelta nel caso della guarigione di ferite particolarmente gravi.

La seconda tipologia di trattamenti comprende quelli compiuti *fuori sede*: essi vengono applicati attraverso acqua attivata dal plasma (PAW) o mezzi attivati dal plasma (PAM: plasma activated media), ovvero sia delle soluzioni biologiche che vengono esposte direttamente o indirettamente alla sorgente di plasma. La soluzione ottenuta dopo l'esposizione al plasma viene trasferita al bersaglio biologico. Queste soluzioni hanno il vantaggio di poter essere trasportate in organi e cavità in cui non è possibile l'applicazione diretta della scarica di plasma (Kaushik et al., 2018).

Per quanto riguarda la generazione e l'utilizzo di PAM, esso si sta dimostrando uno strumento promettente nel mondo della medicina del plasma, in particolare:

- *facilita la coagulazione del sangue*, di conseguenza viene utilizzato per arginare la fuoriuscita del sangue in ambito chirurgico. In questo contesto, la PAM agisce su componenti del sangue e stimola la formazione di coaguli. Un grande vantaggio di questo trattamento è che, essendo un trattamento a temperatura ambiente, non induce lesioni da calore, cosa che invece accade nel caso degli altri dispositivi emostatici chirurgici.
- *presenta attività antiossidante*: grazie alle proprietà di PAM, esso è in grado di bloccare l'ossidazione delle molecole biologiche, donando i suoi elettroni all'ossigeno attivo, presente nell'organismo. Questa sua azione evita che le biomolecole subiscano danni ossidativi, cosa che può anche portare all'insorgere di patologie.
- *permette la sterilizzazione di apparecchiature odontoiatriche e mediche*: PAM rappresenta una alternativa sicura ed economica ai metodi di sterilizzazione tradizionali.
- *ha il potenziale per essere un nuovo tipo di collutorio e un agente di sbiancamento dentale*. Grazie ai suoi effetti antimicrobici PAW ha le capacità di eliminare batteri orali e agenti patogeni che causano il sopraggiungere della placca, delle carie dentali e delle malattie parodontali e presenta come vantaggio il fatto di non causare macchie ed erosione dei denti. È ancora in studio, invece, l'utilizzo di PAM o PAW come agente per procedure di sbiancamento dentale, ma è già ben chiaro il suo potenziale dovuto alla sua efficienza, sicurezza e bioprotezione.
- è un induttore di apoptosi e necrosi: può essere applicato per il *trattamento di cellule tumorali*. I RONS presenti nella PAM provocano danno cellulare, che, conseguentemente, provoca la morte della cellula. (Kaushik et al., 2018).

1.4 Plasma freddo e PAW in agricoltura

La diversità dei meccanismi d'azione del plasma freddo e la flessibilità di questa tecnologia fornisce una preziosa risorsa per soluzioni innovative in settori come quello agricolo e alimentare (Bourke et al., 2018). In questi ambiti, i trattamenti al plasma freddo possono essere diretti, con l'esposizione al plasma freddo, o indiretti, attraverso l'utilizzo di PAW.

Un'importante applicazione della PAW in ambito agricolo è quella che permette il *miglioramento della germinazione dei semi*, andando ad agire nei parametri di bagnabilità e idrofilia della superficie. Le particelle reattive del plasma, i ROS, attaccano la superficie del seme provocando erosione e piccole crepe: questi processi aumentano l'idrofilia superficiale e di conseguenza migliorano l'assorbimento dell'acqua. Inoltre, gli effetti della PAW comprendono l'aumento dell'attività di enzimi come amilasi, proteasi, fitasi, che digeriscono il materiale di riserva dei semi, favorendo la germinazione dei semi (Holubová et al., 2020). Infine, i RONS, come perossido di idrogeno e nitrato, presenti nella PAW, possono agire come molecole di segnalazione nei semi, comportando cambiamenti a livello proteomico, trascrittomico e ormonale. In particolare, le specie chimiche sopra citate sono in grado di attivare i meccanismi che diminuiscono la presenza dell'ormone ABA (acido abscissico, ormone che svolge un ruolo essenziale nella dormienza dei semi), promuovendo così la germinazione dei semi (Guo et al., 2021). Trattamenti con PAW compiuti su piante coltivabili sono applicazioni molto promettenti: infatti, i tempi lunghi e la bassa percentuale del tasso di germinazione rappresentano uno dei motivi della perdita di resa delle colture.

Un altro aspetto positivo della PAW è il fatto che essa induce un *miglioramento della crescita delle piante*. Questo processo è frutto di un effetto sinergico di molti fattori. In primo luogo, il nitrato presente nella PAW è un elemento essenziale per la crescita vegetale: nelle cellule viene trasformato in ione ammonio, essenziale nella sintesi degli amminoacidi, biomolecole fondamentali per gli organismi vegetali. Inoltre, i ROS influenzano i livelli di ormoni vegetali come l'acido abscissico (ABA) e l'acido indol-3-acetico (IAA). In particolare, aumentano il contenuto di IAA, la cui funzione primaria è quella di promuovere l'allungamento delle cellule vegetali, mentre riducono la presenza dell'ABA, ormone che inibisce la crescita delle piante (Guo et al., 2021).

La tecnologia basata sul plasma freddo è stata esplorata per una serie di applicazioni in più fasi della produzione alimentare e sono stati dimostrati svariati vantaggi: il funzionamento a basse temperature, i tempi di lavorazione brevi e l'elevata efficacia antimicrobica, con un impatto minimo sulla qualità degli alimenti e sull'ambiente. Il plasma freddo e la PAW sono stati applicati con successo per *inattivare un'ampia gamma di microrganismi*, sia su prodotti agricoli (come frutta, semi e cereali), che su piante da coltura, quindi ottenendo un effetto pesticida (Bourke et al., 2018).

Specie molto reattive presenti all'interno della PAW, in particolare quelle che contengono il gruppo ossidrilico (OH), avviano la perossidazione lipidica del doppio strato lipidico della membrana batterica; ne consegue la rottura della stessa. Inoltre, le specie reattive provocano anche danni intracellulari, tramite l'ossidazione prolungata di macromolecole come proteine, lipidi e acidi nucleici (tra cui il DNA).

Tutti questi eventi comportano l'inattivazione e la morte dei microrganismi (Adhikari et al., 2020). È evidente che il plasma e PAW abbiano un effetto negativo sui contaminanti microbici, ma non sulle piante: la differenza importante tra questi due organismi è la natura e lo spessore della parete cellulare. La parete cellulare batterica è costituita da peptidoglicano e subisce perossidazione lipidica, mentre le pareti delle cellule vegetali sono costituite in buona parte da cellulosa ed emicellulosa, molecole che sono più resistenti alle specie reattive (Thirumdas et al., 2018).

Un aspetto ancora in fase di studio è l'induzione della resistenza delle piante agli stress biotici e abiotici tramite l'acqua attivata dal plasma, la cosiddetta "*vaccinazione al plasma*".

In natura, le condizioni ideali per gli organismi, comprese le piante, si verificano piuttosto raramente, rispetto a quelle sfavorevoli. Di conseguenza le piante hanno sviluppato strategie che consentono loro di difendersi attivamente da una varietà di fattori di stress, che possono essere condizioni abiotiche avverse (sicchezza, salinità, alte e basse temperature) o malattie causate da batteri, funghi e virus. Uno di questi meccanismi consiste nella risposta adattativa: uno stimolo di stress, non così forte da indurre morte all'organismo, può causare il rafforzamento di quest'ultimo, consentendogli di tollerare meglio altri stress futuri.

La risposta adattativa può essere indotta dal trattamento con PAW. La PAW, infatti, agisce come agente di innesco e induce le risposte immunitarie delle piante attivando segnali di difesa, portando all'espressione di geni di difesa (Holubová et al., 2020).

Durante l'esposizione di una pianta ad uno stress, come l'invasione di un patogeno, avviene un accumulo di RONS all'interno delle cellule vegetali. Ciò ha un duplice scopo: inattivare e distruggere i patogeni e attivare le cascate di segnalazione legate all'espressione di geni di difesa delle piante e alla risposta ipersensibile (Adhikari et al., 2020). Trattare la pianta con PAW, che contiene RONS, permette di stimolare il meccanismo sopra descritto, e costituisce quindi una innovativa e promettente strategia di controllo delle malattie delle piante, rendendole più resistenti a svariati stress, senza indurre alcun danno per la vitalità delle piante.

Viene discusso in seguito il lavoro compiuto da Zambon e collaboratori (2020), che hanno esaminato l'induzione delle risposte di difesa delle piante legate a cambiamenti di espressione genica, in conseguenza dell'applicazione di acqua attivata dal plasma.

2. Approccio sperimentale

2.1 Produzione di acqua attivata dal plasma (PAW)

Per produrre acqua attivata dal plasma (PAW), si espongono 80 mL di acqua distillata sterile (SDW) al plasma prodotto mediante una scarica a barriera dielettrica (DBD), operando in atmosfera per un intervallo di tempo di 10 mi, con una tensione di 19 kV e una frequenza di ripetizione degli impulsi di 1 kHz. Immediatamente dopo questo trattamento, si procede con il congelamento delle aliquote di PAW. Il giorno successivo alla produzione, successivamente allo scongelamento delle aliquote a temperatura ambiente, si monitora il pH e si misurano le concentrazioni di perossido di idrogeno (H_2O_2) e nitrati (NO_3^-) attraverso kit commerciali colorimetrici.

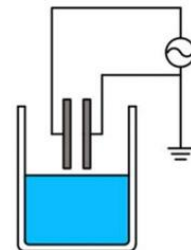


Figura 3. Scarica a barriera dielettrica (da Guo et al., 2021)

2.2 Materiale vegetale e condizioni di crescita

Germogli di pervinca (*Catharanthus roseus*) sono stati micropropagati da una pianta madre con fiori bianchi e mantenuti in vitro in un fitotrone, ovvero un ambiente in cui le condizioni sono controllate, con una temperatura di 24 ± 2 °C e un ciclo luce/buio di 16 h/8 h. Successivamente piante di pervinca, derivate da quelle micropropagate, e piante di vite (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay) vengono coltivate su terreno in serra. Per tutta la durata degli esperimenti le condizioni ambientali della serra sono le seguenti: 16 ore di luce ad una temperatura di 30 °C e 8 ore di buio a 24 °C, 70-75% di umidità relativa, in condizione controllate di assenza di insetti.

2.3 Trattamenti delle piante con PAW

A seconda del materiale vegetale, sono stati effettuati differenti trattamenti per l'esposizione a PAW:

1. Germogli di pervinca micropropagati trattati per immersione. (Figura 4A)
2. Piante di vite trattate per immersione delle radici. (Figura 4B)
3. Piante di pervinca trattate per immersione capovolta. (Figura 4C)

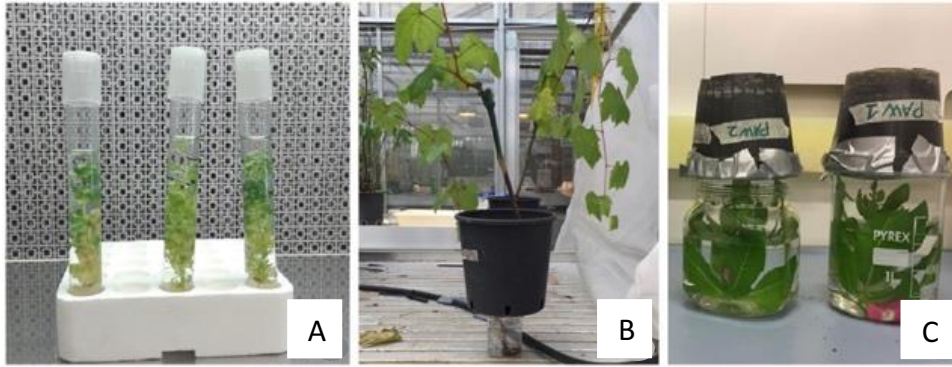


Figura 4. Trattamenti con PAW dei diversi sistemi sperimentali vegetali utilizzati nello studio.

1) Si immergono i germogli di pervinca in tubi di vetro da micropropagazione contenenti 20 mL ciascuno di PAW, per un tempo di 25 min. Per avere un controllo negativo alcuni germogli vengono immersi in tubi contenuti acqua distillata sterile (SDW). Si utilizza inoltre una soluzione di alluminio fosetil (FoAl) in concentrazione 2.5 g/L (controllo positivo), per la sua nota capacità di stimolare la produzione di proteine correlate alla patogenesi. Un ulteriore controllo negativo è rappresentato dall'utilizzo di una soluzione di acqua distillata sterile avente lo stesso pH della PAW generata precedentemente e la stessa concentrazione delle principali specie chimiche in essa contenute, ovvero $13.5 \text{ mg} \times \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ e $81.9 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ di NO_3^- . È stato verificato che il materiale vegetale trattato con quest'ultima soluzione non subisce nessun effetto rilevante ai fini dell'esperimento. Si raccolgono i germogli da ogni replica biologica in sei diversi momenti temporali dall'inizio del trattamento con PAW: 0 ore, 7 ore, 24 ore, 48 ore, 96 ore e 120 ore. Ad ogni time point si raccolgono inoltre quattro germogli non trattati utilizzabili come controlli negativi.

2) Per le piante di vite si procede con il loro parziale sradicamento, una volta raggiunto il secondo anno di età. Le radici vengono lavate e si innaffiate tramite dispositivi di irrigazione per acclimatarle prima dei trattamenti. Dopo un'attesa di tre settimane, si immerge l'apparato radicale per 25 min in 450 mL di PAW, SDW e FoAl. Si raccolgono la 4^a, 5^a, 6^a foglia di ciascuna pianta per ogni trattamento in tre punti temporali: 16 ore, 26 ore, 36 ore. Come nel caso precedente, si prelevano tre germogli non trattati in ogni punto temporale da utilizzare come controllo negativo.

3) Nel terzo tipo di trattamento con PAW, piante di pervinca, vengono immerse capovolte per 25 min in 650 mL di PAW e SDW, e rimosse dopo 16 ore.

Infine, al termine dei tre procedimenti, si procede con il congelamento tramite azoto liquido di tutto il materiale vegetale. Tutti i campioni vengono conservati alla temperatura di -80°C .

2.4 Estrazione di RNA

Si compie un'estrazione di RNA totale da 100 mg di materiale derivante dai germogli di pervinca micropropagati (trattamento 1): successivamente si eluisce l'RNA in 50 μ L di acqua distillata priva di nucleasi e lo si conserva a -20°C .

L'RNA dalla pianta di vite (trattamento 2) si estrae come segue: campioni di 200 mg ciascuno, polverizzati in azoto liquido, vengono aggiunti a 900 μ L di tampone di estrazione e 2% di β -mercaptoetanol. Si aggiunge un uguale volume di cloroformio e alcol isoamilico (in proporzione 21:1, v/v). Si capovolge vigorosamente la provetta e si procede con una centrifugazione a $11000 \times g$ per 10 minuti a 4°C . Dopo avere recuperato il supernatante si esegue una seconda estrazione con cloroformio/acido isoamilico. Si aggiungono 0,25 volumi di LiCl 3 M al surnatante, in una nuova provetta, che viene poi incubata in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugata a $21000 \times g$ per 20 minuti a 4°C . L'RNA viene pellettato selettivamente e poi risospeso in 500 μ L di tampone di SSTE. Si aggiunge nuovamente un uguale volume di cloroformio/alcol isoamilico: la miscela viene sottoposta a centrifuga a $11000 \times g$. Infine si aggiunge isopropanolo al supernatante e si compie una centrifugazione al fine di far precipitare l'RNA. Al fine di conservare il pellet, esso viene lavato con etanolo, essiccato, risospeso in 50 μ L di acqua distillata e conservato a -20°C .

Per compiere il sequenziamento ad alto rendimento di piccoli RNA si compie un'estrazione con fenolo-cloroformio da piante di pervinca (trattamento 3), ottenendo l'acido nucleico. Per ciascuna pianta si eseguono quattro estrazioni di RNA, due delle quali dalle foglie, e due dagli steli. Dal risultato delle estrazioni si preparano librerie di sequenziamento di piccoli RNA.

I campioni polverizzati in azoto liquido, di 200 mg ciascuno, vengono aggiunti a 600 μ L di tampone di estrazione e un eguale volume di fenolo. Eseguita la centrifugazione a 15000 rpm per 5 minuti, si aggiungono 600 μ L di fenolo/cloroformio (in rapporto 1:1) alla fase acquosa. Si esegue una seconda centrifugazione alle medesime condizioni. Si aggiungono poi 600 μ L di cloroformio alla fase acquosa ottenuta, 0,1 volumi di NaOAc e 2,2 volumi di etanolo freddo. La miscela viene nuovamente centrifugata. A centrifugazione compiuta le provette vengono conservate in ghiaccio per 10 minuti, prima di svolgere un'ultima centrifugazione a 15000 rpm, alla temperatura 4°C per 30 minuti. Il pellet ottenuto si risciacqua con etanolo, si asciuga e si rimette in soluzione in 50 μ L di acqua distillata priva di nucleasi e conservata a -20°C .

Si verifica la qualità dell'RNA estratto caricandolo in gel d'agarosio e sottoponendolo ad elettroforesi. Il gel viene successivamente colorato con una soluzione di bromuro di etidio per 20 minuti e decolorato in acqua distillata per 5 minuti. Tale procedimento lo si effettua per poter poi analizzare la presenza di RNA tramite luce UV (312 nm)

2.5 Analisi di espressione genica mediante qRT-PCR

Si utilizza la trascrittasi inversa M-MLV ed un primer esamerico per sintetizzare il cDNA. Per ogni gene d'interesse, si utilizza circa 1,5 ng di cDNA templatato per la reazione di polimerasi, con l'espressione normalizzata al gene dell'ubiquitina (pervinca) e ai geni di actina, ubiquitina e gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (vite).

- I geni target selezionati per i campioni di pervinca sono quelli codificanti per la callosio sintasi (*CrCalS11*), la fenilalanina ammonio liasi (*CrPAL1*), strictosidina- β -glucosidasi (*CrSGD*), deacetilvinodolina-O-acetiltransferasi (*CRDAT*) e calcone sintasi (*CrCHS*).
- I geni target selezionati per i campioni di vite sono fenilalanina ammonio liasi (*VvPAL1*), calcone sintasi 2 e 3 (*VvCHS2* e *VvCHS3*) e stilbene sintasi (*VvSTS*).

Il profilo termico è stato impostato come segue: 95°C per 10 minuti, 40 cicli a 95°C per 15 s e 60°C per 1 min.

2.6 Preparazione di librerie di piccoli RNA sequenziati e analisi bioinformatica delle sequenze

Si preparano sei librerie di piccoli RNA, 3 delle quali da campioni di pervinca trattati con PAW, e 3 da campioni di pervinca trattati con SDW. Viene utilizzato il Baggerley test, che permette di confrontare le proporzioni dei conteggi di un gruppo di campioni con quelle di un altro gruppo di campioni. Si selezionano miRNA espressi in modo differenziale e si purifica una frazione di piccoli RNA su gel di poliaccrilammide. Dopo aver legato gli adattatori, viene sintetizzato il cDNA e amplificato tramite PCR. Il prodotto ottenuto dalla reazione viene purificato tramite gel e infine sequenziato.

Vengono mantenute solo le sequenze di buona qualità, di lunghezza compresa tra 16 e 28 nucleotidi. I risultati delle repliche biologiche vengono confrontate attraverso un software e le differenze statistiche analizzate dal test di Baggerley. Si applicano ulteriori analisi statistiche al fine di selezionare differenze di miRNA. Le differenze ottenute dalle analisi statistiche sono state elaborate da un software e sono state prodotte mappe di calore.

2.7 Predizione dei geni target per i miRNA espressi in modo differenziale

Si utilizzano tre software per predire i geni target: solamente le previsioni condivise da tutti e tre i software si considerano valide. Si esaminano poi i processi biologici, le funzioni molecolari e i componenti cellulari di questi geni target utilizzando il software Blast2GO.

3. Risultati e discussione

3.1 Composizione chimica della PAW

Nel lavoro di Zambon et al. (2020) il trattamento di acqua distillata con il plasma, tramite scarica a barriera dielettrica (DBD) ha indotto, come ci si poteva aspettare, la produzione nella PAW sia di specie a breve durata (μs o ms) che specie a lunga durata, come perossido di idrogeno (H_2O_2), nitrati (NO_3^-), e nitriti (NO_2^-). La concentrazione di H_2O_2 è risultata $13,5 \pm 1,3 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, mentre la concentrazione di NO_3^- $81,9 \pm 3,4 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$. Ulteriore aspetto che viene confermato rispetto alle attese risulta essere la riduzione del pH dell'acqua dopo l'attivazione con il plasma ($\text{pH} = 2,78 \pm 0,47$), rispetto all'acqua distillata sterile ($\text{pH} = 5,5 \pm 0,1$).

La concentrazione dei NO_2^- è scesa sotto il limite di rilevabilità in pochi minuti, dopo il trattamento con il plasma, mentre le concentrazioni di H_2O_2 e NO_3^- sono aumentate e rimaste stabili per 24 ore anche dopo il congelamento e lo scongelamento.

3.2 Sovra-espressione di geni in germogli di pervinca dopo trattamento con PAW

Nell'articolo, la cui discussione critica è oggetto di questa tesi, gli autori sono quindi passati ad effettuare analisi tramite una qPCR (reazione a catena della polimerasi quantitativa) in campioni derivanti da germogli di pervinca (*Catharanthus roseus*) micropropagati e raccolti in momenti diversi dopo il trattamento con PAW, al fine di rilevare cambiamenti di espressione genica. Nei germogli di pervinca trattati con PAW si riscontra una sovra-espressione, rispettivamente dopo 7 h, 24 h, e 24-96 h, dei seguenti geni: *CrCalS11*, *CrPAL1*, *CrSGD*, mentre per il gene *CrDAT* si riscontra una leggera sovra-espressione in tempi più lunghi (120 h). In particolare, il gene *CrCalS11* risulta sovra-espresso sia nei germogli trattati con PAW che in quelli trattati con alluminio fosetil (FoAl), dopo 7 h dal trattamento. Inoltre, non viene rilevata nessuna variazione nell'espressione del gene *CrCHS* (Fig. 5).

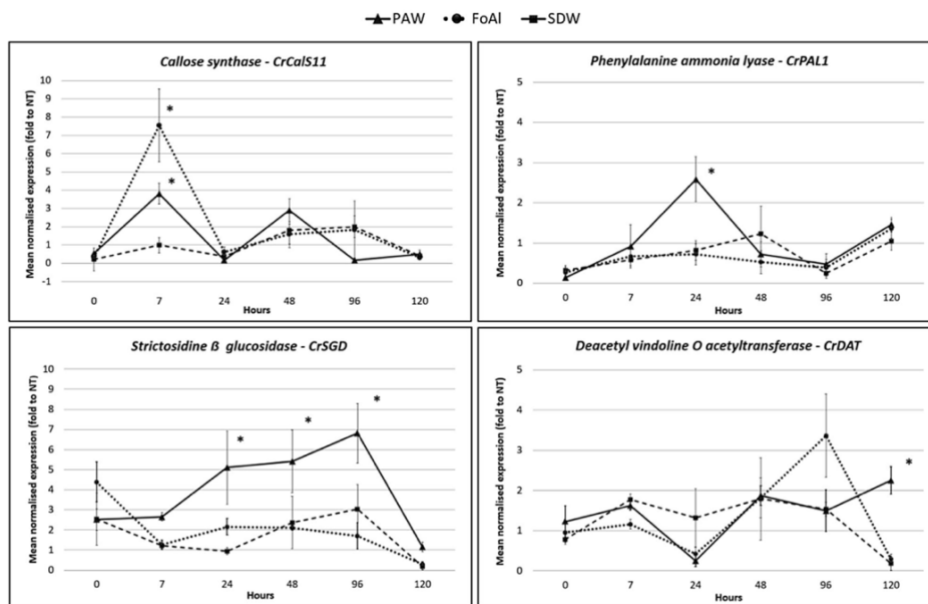


Figura 5. Cambiamenti di espressione genica in germogli di pervinca dopo il trattamento con PAW. L'espressione relativa dei geni *CrCalS11*, *CrPAL1*, *CrSGD* e *CRDAT* è stata valutata mediante qRT-PCR a differenti intervalli di tempo dopo il trattamento. *, differenza statisticamente significativa, $P < 0.05$.

Il gene *CrCalS11* codifica per un enzima coinvolto nella deposizione di callosio: la formazione di callosio è una risposta generica a stress biotici e abiotici (Ellinger & Voigt, 2014). Per esempio, in seguito ad un attacco da parte di un patogeno, nella pianta avviene una deposizione di callosio tra la membrana plasmatica e la parete cellulare, in modo da formare una barriera fisica che è in grado di rallentare o fermare l'invasione del patogeno. La sovra-espressione di questo gene in risposta sia al trattamento con PAW che a quello con FoAl indica l'induzione di risposte di difesa e potrebbe essere correlato alla presenza di H_2O_2 .

Il gene *CrPAL1* risulta sovra-espresso nei germogli trattati con PAW a causa dell'azione di H_2O_2 e del NO_3^- in essa contenuti. L'ossido nitrico (NO) e i suoi donatori inducono la trascrizione del gene PAL tramite un meccanismo cGMP (guanosina-monofosfato ciclico) -dipendente, mentre H_2O_2 è il principale intermediario nell'attivazione della resistenza indotta, che porta alla risposta di ipersensibilità. Le due specie chimiche (H_2O_2 e NO_3^-), agiscono quindi come segnali di risposta allo stress.

Il gene *CrSGD*, la cui espressione è stata indotta dalle specie presenti in PAW, codifica per un enzima chiave nella via biosintetica di alcaloidi come vincristina e vinblastina, che hanno un ruolo antimicrobico contro funghi e batteri fitopatogeni. L'attivazione del gene *CrSGD* è dovuta a H_2O_2 (Tang et al., 2009).

3.3 Sovra-espressione di geni in piante di vite dopo trattamento con PAW

Nel lavoro di Zambon et al. (2020) successivamente gli autori hanno esteso il trattamento con PAW, prodotta mediante DBD, a piante di vite (*Vitis vinifera* cv. Chardonnay). In seguito ad una analisi tramite qPCR dei campioni derivanti dalle piante di vite, è stata verificata una sovra-espressione di tutti i geni analizzati dopo 16 h dal trattamento con PAW, ovvero i geni *VvPAL1*, *VvCHS2*, *VvCHS3*, *VvSTS* (Fig. 6).

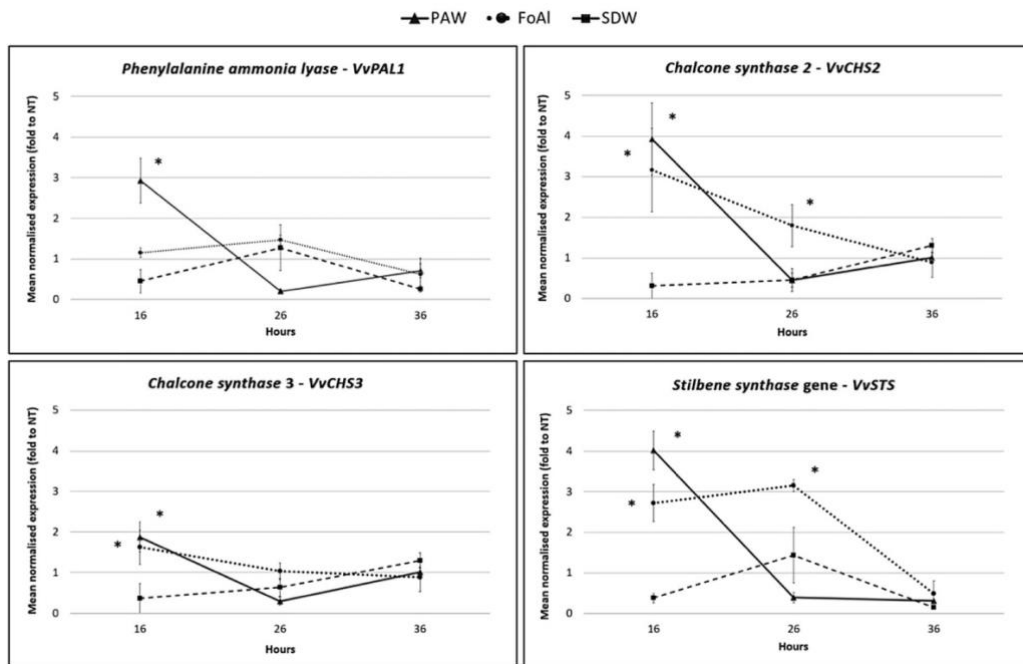


Figura 6. Cambiamenti di espressione genica in piante di vite dopo il trattamento con PAW. L'espressione relativa dei geni *VvPAL1*, *VvCHS2*, *VvCHS3* e *VvSTS* è stata valutata mediante qRT-PCR a differenti intervalli di tempo dopo il trattamento. *, differenza statisticamente significativa, $P < 0.05$.

Il gene *VvPAL1* codifica un enzima che ha un ruolo nelle vie metaboliche che portano alla formazione del resveratrolo, e dei suoi derivati come 3-viniferina, pterostilbene e piceatannolo. Questi composti rappresentano le principali fitoalessine della pianta di vite, ovvero molecole che vengono sintetizzate anche in risposta ad infezioni da parte di patogeni come *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea*.

I risultati ottenuti sia nelle piante di vite che di pervinca confermano l'effetto positivo del trattamento con PAW sul pathway di sintesi delle fitoalessine, composti ad azione antimicrobica, prodotti in seguito ad interazioni con agenti patogeni.

3.4 Cambiamenti di espressione di miRNA in piante di pervinca dopo trattamento con PAW

Sono state create sei librerie di piccoli RNA (sRNA) a partire dall'RNA derivante da piante di pervinca trattate con acqua attivata dal plasma (PAW1, PAW2, PAW3) o di controllo, incubate cioè con acqua distillata sterile (H₂O1, H₂O2, H₂O3). Il sequenziamento dei sRNA ha prodotto 18.862.867 letture grezze di alta qualità per le librerie di piante trattate con acqua, mentre 21.163.320 per le librerie di piante trattate con PAW. La maggior parte delle letture di ogni libreria risulta essere compresa tra i 20 e i 25 nucleotidi, in particolare quelle da 24 nucleotidi erano le più abbondanti, seguite da quelle da 21 nucleotidi.

È stato possibile osservare che 81 miRNA appartenenti a 36 famiglie hanno subito cambiamenti dopo il trattamento con PAW: i miRNA appartenenti alle famiglie *miR157*, *miR172*, *miR393*, *miR5368*, *miR8016* risultano sotto regolati, mentre risultano sovra regolati quelli appartenenti alle famiglie *miR159*, *miR165*, *miR319*, *miR395*, *miR396*, *miR398*, *miR399*.

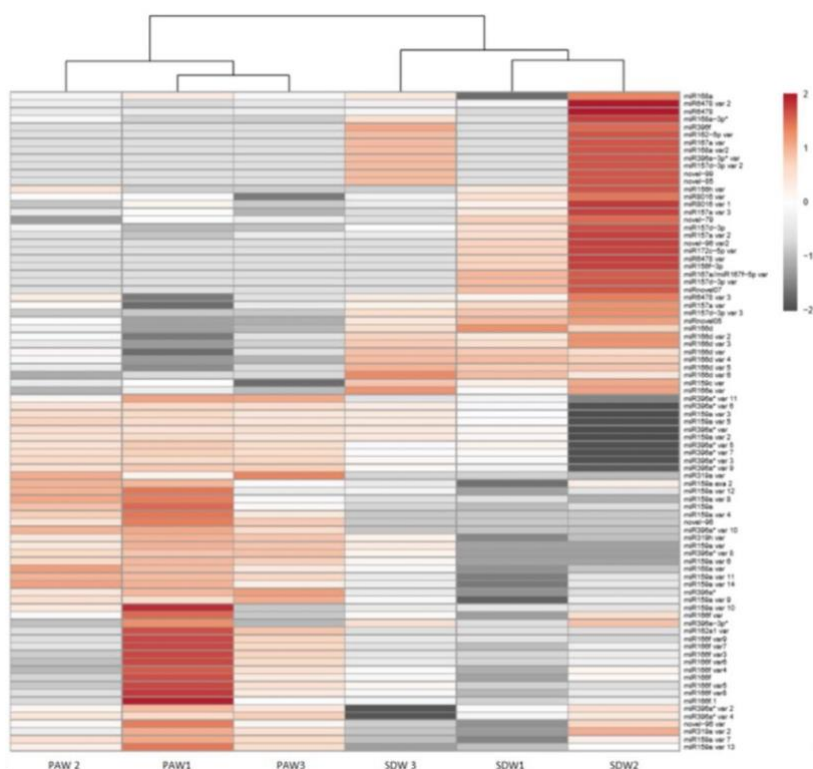


Figura 7. Heat-map del cambiamento doppio logaritmico degli miRNA diversamente espressi in piante di pervinca dopo il trattamento con PAW.

In Figura 7 è riportata una mappa termica che rappresenta due distinti cluster di espressione che distinguono le librerie derivanti da campioni trattati con PAW e da quelli non trattati. I risultati del trattamento con PAW sono statisticamente simili nelle tre repliche biologiche.

Solitamente, nelle cellule vegetali, la sovra-regolazione dell'espressione di un miRNA provoca la degradazione del suo gene bersaglio. Inoltre, i geni bersaglio dei miRNA sovra regolati possono essere associati alla risposta allo stress, mentre i geni bersaglio dei miRNA sotto regolati sono generalmente coinvolti nella resistenza allo stress.

La sovra-espressione dei miRNA appartenenti alle famiglie *miR159*, *miR395*, *miR398* e *miR165* è dovuta all'accumulo di perossido di idrogeno nelle cellule vegetali. Questo risultato, insieme alla sotto espressione di *miR157*, che regola negativamente un enzima chiave della risposta ossidativa (la GST, ovvero la glutatione-s-transferasi), conferma l'ipotesi che il trattamento con PAW attivi la risposta ossidativa nelle cellule vegetali.

I geni bersaglio di *miR157*, che nelle piante trattate con PAW risulta sotto regolato, sono coinvolti nella formazione di componenti del citoscheletro. Questo risultato supporta la scoperta della sovra-espressione del gene per la callosio sintasi, che porta ad un accumulo di callosio.

I *miR398* hanno come target tre geni per la superossido dismutasi *CSD1*, *CSD2*, *CSD3*, che codificano enzimi importanti nella eliminazione dei ROS dalla cellula. La sovra espressione di questa famiglia di miRNA nelle piante trattate con PAW diminuisce i livelli di trascrizione dei geni del superossido dismutasi. Ciò si traduce in una riduzione della capacità della pianta di degradare i composti ossidativi, come il perossido di idrogeno: ciò aumenta la trasduzione del segnale di difesa.

Le famiglie *miR399* e *miR395*, che sono sovra-esprese nelle piante trattate con PAW, sono coinvolte nella sotto-regolazione di alcuni geni, nel caso di condizioni di carenze nutrizionali, al fine di migliorare l'assorbimento di azoto, fosfato e solfato. Questo aspetto potrebbe essere alla base di future strategie di fertilizzazione delle piante.

3.5 Conclusioni

Alla luce dei dati ottenuti nel lavoro di Zambon et al. (2020) si può confermare che la scelta del metodo di attivazione dell'acqua tramite plasma, ovvero il metodo di scarica a barriera dielettrica (DBD), risulta essere un procedimento valido. Infatti, permette di produrre in acqua moderate concentrazioni di specie dell'azoto e dell'ossigeno, come NO_3^- e H_2O_2 . I RONS generati dal plasma, una volta entrati nella cellula vegetale, apportano diversi effetti positivi alla pianta: se accumulati sono tossici per i patogeni che invadono le cellule, stimolano il sistema antiossidante dell'organismo vegetale e attivano delle cascate di segnalazione che culminano nell'attivazione della risposta a stress sia biotici che abiotici.

In questo studio, grazie alle analisi molecolari trascrizionali e post-trascrizionali, è stata messa in evidenza la capacità di PAW di stimolare i meccanismi di difesa della pianta. Ciò avviene attraverso l'aumento dell'espressione di alcuni geni e la regolazione di vari miRNA, che a loro volta modulano l'espressione di altri geni. In particolare, quando si verifica la sovra espressione del gene *CrCalS11* (in germogli di pervinca micropropagati), aumenta la deposizione di callosio, composto che, oltre ad avere una funzione strutturale fondamentale nello sviluppo delle piante, è importante nella risposta a stress biotici e abiotici (Ellinger & Voigt, 2014). Inoltre, i risultati dimostrano che il trattamento con PAW aumenta l'espressione di geni che hanno un ruolo fondamentale nella via biosintetica delle fitoalessine, molecole ad azione antimicrobica. In particolare, il gene *CrSGD*, in pervinca, codifica per un enzima coinvolto nella sintesi degli alcaloidi come vincristina e vinblastina, mentre il gene *VvPAL1*, in vite, codifica un enzima coinvolto nella sintesi degli stilbeni.

I risultati ottenuti in questo lavoro confermano l'ipotesi che la PAW, grazie alle specie chimiche presenti al suo interno (RONS), induce le risposte di difesa delle piante, attraverso dei cambiamenti di espressione genica.

In conclusione, i trattamenti effettuati in questo lavoro su due specie vegetali diverse (pervinca e vite) tramite l'acqua attivata dal plasma sono risultati in grado di migliorare la resistenza delle piante a stress biotici. Questa strategia, che migliora l'immunità delle piante, ha un enorme potenziale, offrendo la possibilità di sostituire, o per lo meno diminuire, pesticidi di natura chimica. L'abuso di pesticidi tradizionali sta infatti causando problematiche che non possono essere ignorate: essi, infatti, contribuiscono all'inquinamento dell'ambiente compromettono l'ecosistema agricolo. I trattamenti al plasma freddo sono invece degli strumenti economici ed ecologici, che non creano residui dannosi. Gli ulteriori effetti positivi che il plasma freddo e la PAW provocano sulle piante, come l'aumento della loro crescita e l'effetto di miglioramento della germinazione dei semi (Holubova et al., 2020), rendono questo approccio un'utile integrazione ai metodi che fino ad oggi sono stati utilizzati per migliorare la resa delle colture. Sono necessarie, infatti, nuove strategie che possano contrastare la perdita nella resa della produzione agricola, che è ancora oggi ad un valore del 20%-30% senza dimenticare che, a causa dell'aumento della temperatura e della concentrazione di CO₂, eventi dovuti dall'attuale cambiamento climatico, le colture vegetali sono più suscettibili a specifici patogeni: ciò comporta l'insorgenza di nuove malattie.

Sebbene siano necessari ulteriori studi al fine di poter applicare i trattamenti al plasma freddo su grande scala, i risultati fino ad ora ottenuti confermano l'ipotesi che questa nuova tecnologia possa aiutare a soddisfare le richieste di miglioramento in termini di efficienza e sicurezza in campo agricolo e nell'industria alimentare.

Bibliografia

- Adhikari, B., Pangomm, K., Veerana, M., Mitra, S., & Park, G. (2020).** Plant Disease Control by Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma. *Frontiers in Plant Science* 11: 77. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00077>
- Bourke, P., Ziuzina, D., Boehm, D., Cullen, P. J., & Keener, K. (2018).** The Potential of Cold Plasma for Safe and Sustainable Food Production. *Trends in Biotechnology* 36: 615–626. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.11.001>
- Ellinger, D., & Voigt, C. A. (2014).** Callose biosynthesis in Arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany* 114: 1349–1358. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu120>
- Guo, D., Liu, H., Zhou, L., Xie, J., & He, C. (2021).** Plasma-activated water production and its application in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 101: 4891–4899. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11258>
- Heberlein, J. (2002).** New approaches in thermal plasma technology. *Pure and Applied Chemistry* 74: 327-335
- Holubová, L., Kyzek, S., Ďurovcová, I., Fabová, J., Horváthová, E., Ševčovičová, A., & Gálová, E. (2020).** Non-thermal plasma—a new green priming agent for plants? *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21249466>
- Kaushik, N. K., Ghimire, B., Li, Y., Adhikari, M., Veerana, M., Kaushik, N., Jha, N., Adhikari, B., Lee, S. J., Masur, K., von Woedtke, T., Weltmann, K. D., & Choi, E. H. (2018).** Biological and medical applications of plasma-activated media, water and solutions. *Biological Chemistry* 400: 39–62. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0226>
- Tang, Z., Yang, L., Zu, Y., & Guo, X. (2009).** Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H₂O₂ in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Growth Regulation*, 57: 15–20. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9320-5>
- Thirumdas, R., Kothakota, A., Annapure, U., Siliveru, K., Blundell, R., Gatt, R., & Valdramidis, V. P. (2018).** Plasma activated water (PAW): chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends in Food Science and Technology* 77: 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.007>
- Weltmann, K. D., Kolb, J. F., Holub, M., Uhrlandt, D., Šimek, M., Ostrikov, K. (Ken), Hamaguchi, S., Cvelbar, U., Černák, M., Locke, B., Fridman, A., Favia, P., & Becker, K. (2019).** The future for plasma science and technology. *Plasma Processes and Polymers* 16. <https://doi.org/10.1002/ppap.201800118>