



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI AGRARIA
DOTTORATO DI RICERCA IN CHIMICA AGRARIA ED
ECOCOMPATIBILITA'
XXIII CICLO
Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle
Produzioni Animali

Tiziana Crifò

Identificazione di geni
differenzialmente espressi in condizioni
di cold stress in arance rosse [*(Citrus*
***Sinensis)* L. Osbeck]**

Relatori:

Chiar.mo Prof. PETRONE Goffredo

Chiar.ma Prof.ssa LO PIERO Angela Roberta

Coordinatore:

Chiar.ma Prof.ssa GENNARI Mara

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

INDICE

<u>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</u>	7
1.1 LE RISPOSTE DELLE PIANTE A STIMOLI BIOTICI E ABIOTICI	8
1.1.1 Stress da basse temperature	11
1.1.2 “Cold Acclimation” e il suo ruolo nel determinare la tolleranza	13
1.1.3 La trasduzione del segnale	16
1.2 L’ACIDO ABSCISSICO: BIOSINTESI ED ATTIVITA’	22
1.2.1 La scoperta dell’acido abscissico	22
1.2.2 La struttura dell’ABA e la sua distribuzione in natura	23
1.2.3 La biosintesi dell’acido abscissico	24
1.2.4 L’attività fisiologica dell’acido abscissico in condizioni di stress: traslocazione e catabolismo	27
1.2.5 Stress da basse temperature: via ABA-dipendente	35
1.2.6 Stress da basse temperature: via ABA-indipendente	37
1.3 LE ARANCE	40
1.3.1 Componenti principali del frutto	40
1.3.2 Origini e produzione di arance rosse siciliane	42
1.3.3 Proprietà salutistiche delle arance	43

1.4 I FLAVONOIDI E LE ANTOCIANINE	46
1.4.1 La struttura chimica dei flavonoidi	46
1.4.2 La struttura chimica delle antocianine	49
1.4.3 La biosintesi dei flavonoidi e delle antocianine	52
1.4.4 Induzione ambientale della sintesi delle antocianine	57
1.4.5 Importanza delle antocianine nella tolleranza allo stress	58
1.4.6 Incremento delle antocianine nelle arance frigoconservate	60
1.5 CONSIDERAZIONI PRELIMINARI E SCOPO DEL LAVORO	62
<u>CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI</u>	66
2.1 PIANO SPERIMENTALE	67
2.2 PRELIEVO DELLA POLPA	68
2.3 DETERMINAZIONE DELLE ANTOCIANINE	69
2.4 ESTRAZIONE, QUANTIFICAZIONE E CONCENTRAZIONE DELL'RNA	72
2.4.1 Estrazione dell'RNA totale	72
2.4.2 Quantificazione dell'RNA	74
2.4.3 Analisi elettroforetica dell'RNA totale	76
2.4.4 Concentrazione dell'RNA	77
2.5 CONVERSIONE DI RNA TOTALE IN mRNA CON "Oligotex mRNA Batch Protocol"	77

2.6	SINTESI DEL cDNA	79
2.6.1	Trasformazione dell'mRNA in cDNA tramite "SuperScript™ III Two-Step qRT-PCR Kit".	79
2.6.2	Sintesi del cDNA tramite "Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit"	80
2.7	COSTRUZIONE DELLA LIBRERIA SOTTRATTIVA	88
2.7.1	Ligazione degli adattatori ai tester	91
2.7.2	Analisi dell'efficienza della ligazione	92
2.7.3	Prima ibridizzazione	95
2.7.4	Seconda ibridizzazione	95
2.7.5	Amplificazione PCR	96
2.8	TRASFORMAZIONE DEI BATTERI COMPETENTI	98
2.8.1	Ligazione	98
2.8.2	Trasformazione delle cellule competenti	99
2.8.3	Screening delle colonie trasformate	100
2.8.4	Estrazione di DNA plasmidico	100
2.9	RT-REAL TIME PCR	104
2.9.1	I principi della RT-REAL TIME PCR	104
2.9.2	Esecuzione della RT-REAL TIME PCR	111

2.10 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) DI TIPO COMPETITIVO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ABSCISSICO	112
2.10.1 Preparazione dei campioni	112
2.10.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay "ELISA"	113
<u>CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONI</u>	116
3.1 ESPERIMENTO NEL LUNGO PERIODO (77 GIORNI)	117
3.1.1 Effetto della frigoconservazione sul contenuto di antocianine nella polpa di Tarocco Sciara	117
3.1.2 Analisi del contenuto di RNA nella polpa di Tarocco Sciara esposta a due differenti temperature di conservazione	118
3.1.3 Classificazione dei trascritti differenziali	119
3.1.4 RT-REAL TIME PCR	123
3.1.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay "ELISA"	130
3.2 ESPERIMENTO NEL BREVE PERIODO (15 GIORNI)	132
3.2.1 Effetto della frigoconservazione sul contenuto di antocianine nella polpa di Tarocco Sciara	132
3.2.2 RT-REAL TIME PCR	133
3.2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay "ELISA"	140
3.2.4 Caratterizzazione dei fattori di trascrizione isolati mediante la genoteca sottrattivi	143
BIBLIOGRAFIA	148

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 LE RISPOSTE DELLE PIANTE A STIMOLI BIOTICI E ABIOTICI

Le piante, essendo organismi sessili, non hanno la possibilità di muoversi e di conseguenza sono frequentemente esposte a molti tipi di stress; questi ultimi vengono, per convenzione, suddivisi in due categorie: gli stress abiotici quali basse temperature, eccessiva salinità, siccità, alte temperature, stress ossidativi ed esposizione a metalli tossici; e gli stress di tipo biotico dovuti a funghi, batteri, nematodi, insetti. Questi fattori di stress possono ostacolare il raggiungimento del pieno potenziale genetico della pianta e di conseguenza ridurre notevolmente la produttività. Si è valutato, infatti, che la crescita e la produttività di piante esposte a condizioni di stress biotico o abiotico si riduce anche del 50% rispetto a piante coltivate in condizioni ottimali. (Bray E.A. *et al.* 2000), (Thomashow M. F. *et al.* 2001).

In seguito a situazioni di stress le piante hanno quindi sviluppato, nel corso dell'evoluzione, specifiche forme di adattamento e sofisticati meccanismi di difesa in risposta ai segnali di stress, in grado di conferire loro capacità di tolleranza o resistenza (Schmelzer E. *et al.* 2002; Fowler S. *et al.*, 2002; Komatsu S. *et al.* 2006). Come risposta agli stress alcuni geni vengono sovraespressi; la sovraespressione ha lo scopo di mitigare l'effetto dello stress e di indurre le modifiche necessarie atte a superare la condizione non ottimale in cui la pianta viene a trovarsi. La conoscenza a livello molecolare dei meccanismi che stanno alla base della tolleranza ai fattori ambientali può contribuire fortemente allo sviluppo di nuove varietà o nuovi metodi che aumentano la produttività. Generalmente le basse temperature provocano danni meccanici, mentre la salinità e la siccità operano alterando l'equilibrio ionico ed osmotico della cellula (Mahajan S. *et al.*, 2005). Le basi cito-fisiologiche e molecolari della risposta della pianta a fattori biotici ed abiotici di disturbo sono alquanto articolate e complesse. Esse includono l'attivazione di specifiche vie metaboliche per la trasduzione del segnale (Kessler A. *et al.*, 2002), le vie metaboliche così attivate interagiscono determinando una risposta diretta o una riconfigurazione metabolica o

ancora l'espressione di specifici geni (Bonhert H.J. *et al.*, 1995; Ramalingam J. *et al.*, 2003), che conduce in alcuni casi alla risposta ipersensibile ed alla morte cellulare programmata (Blee E., 2002; Heath M.C., 2000). Gli studi che si riferiscono alla risposta a stress abiotici sono molti e indicano come i meccanismi di risposta siano spesso simili e collegati tra loro. È tuttavia possibile osservare la stretta correlazione tra diversi agenti di stress abiotici e come questi spesso riconducano agli stessi meccanismi adattativi. In particolare quattro stress quali: carenza idrica, elevata salinità, freddo o caldo eccessivo ed inquinamento sono fattori primari di stress, ma che si riconducono tutti a due tipologie di stress secondario: stress iperosmotico e stress ossidativo (Vinocur *et al.*, 2005). In generale l'adattamento delle piante a stress di natura ambientale è controllato da una cascata di segnali biochimici che attivano meccanismi di risposta agli stress tali da ripristinare i processi omeostatici e da proteggere e riparare le proteine e le membrane danneggiate (Wang *et al.*, 2003). Si verifica, inoltre, una rapida induzione di fattori di trascrizione implicati nei pathway di attivazione genica nella risposta agli stress abiotici. Nel corso degli ultimi 10-15 anni sono stati clonati numerosi geni la cui espressione è regolata (nella maggior parte dei casi incrementata) dalle basse temperature e/o dalla disidratazione. Analizzando le sequenze per omologia, funzione ed espressione, i geni isolati sono stati raggruppati in classi a seconda delle diverse funzioni. L'esatta funzione della maggior parte dei prodotti genici di queste sequenze è ancora sconosciuta, anche se il loro pattern d'espressione manifesta chiaramente una stretta connessione tra la loro attività e l'acquisizione di tolleranza agli stress. I meccanismi molecolari che permettono alle piante di percepire esternamente i cambiamenti ambientali e di trasdurre questo segnale al nucleo, dove sono attivati i geni di resistenza, sono anch'essi poco conosciuti. Questo è dovuto al fatto che tutte le risposte agli stress sono meccanismi complessi nei quali sono coinvolti molti geni, che possono avere effetti additivi o ridondanti e possono interagire l'uno con l'altro nelle diverse e complesse vie di trasduzione del segnale

(Cattivelli *et al.*, 2002). La percezione dello stress nelle cellule vegetali è un processo che prevede l'interazione tra diversi pathway, ognuno dei quali coinvolge probabilmente uno specifico recettore e differenti compartimenti cellulari. Tutti questi segnali devono essere inviati al nucleo per avere l'appropriata risposta cellulare. Infatti, ogni cellula contiene, nel proprio genoma, l'informazione necessaria per la sintesi di migliaia di proteine diverse, tuttavia in ciascun momento della sua vita solo una parte di queste è presente; il tipo di proteine espresse e la loro quantità dipendono dalle condizioni fisiologiche della cellula e dagli stimoli ambientali. Gli organismi viventi sono, infatti, in grado di variare il profilo di espressione del loro genoma e in questo modo riescono, ad esempio, a adattarsi a diverse condizioni di crescita, a rispondere ai vari stress ambientali e in particolare, negli organismi pluricellulari, a dare origine a tessuti differenti. Dall'attivazione di un gene alla produzione della proteina attiva, esistono numerosi livelli in cui l'espressione genica può essere modulata al fine di ottenere un proteoma il più idoneo possibile a soddisfare le necessità fisiologiche della cellula. Il processo di produzione di una proteina a partire dall'mRNA (traduzione) è regolabile grazie a diverse strategie; una di queste è la stabilità dell'mRNA nel tempo, che varia in modo significativo da un gene all'altro e nelle diverse condizioni; ad esempio, riferendoci ai meccanismi di resistenza al freddo, il gene *blt14* di orzo mostra un aumento della quantità di trascritto in condizioni di bassa temperatura (Atienza S.G. *et al.*, 2004), non per un aumento del suo tasso di trascrizione, ma a causa di una stabilizzazione del suo mRNA da parte della bassa temperatura, o di un fattore proteico presente solo a freddo (Dunn *et al.*, 1994). I meccanismi di regolazione genica vengono quindi sfruttati dalle piante per modificare il loro proteoma nell'ambito dell'interazione che necessariamente devono avere con l'ambiente. I meccanismi regolativi che controllano i geni necessari per "l'adattamento" all'ambiente agiscono, infatti, in risposta a precisi segnali percepiti da opportuni recettori (diversi per i diversi fattori ambientali e spesso localizzati sulle membrane), i quali a loro volta attivano

processi di trasduzione del segnale che trasferiscono lo “stimolo”, generatosi all'esterno della cellula, fino al nucleo. Nelle piante, esempi significativi di questa capacità sono le risposte ai patogeni e agli stress abiotici (ad esempio il freddo o la carenza idrica); gli organismi vegetali sono in grado di percepire la presenza di un fattore di stress, di trasdurre un segnale e di attivare difese molecolari specifiche che non implicano solo la sintesi di nuove proteine, ma anche l'attivazione di risposte più immediate, come la produzione di specie reattive dell'ossigeno, variazioni del potenziale osmotico ecc. Alcuni dei meccanismi che consentono alle piante di sopravvivere a condizioni avverse sono costitutivi, cioè presenti prima dell'esposizione allo stress, mentre altri sono inducibili e in questo caso, come precedentemente detto, è necessario un preliminare periodo di adattamento affinché l'organismo acquisisca il massimo grado di tolleranza. Fenomeni di adattamento si verificano quando la pianta si trova esposta a variazioni non letali delle condizioni ambientali; queste situazioni inducono modificazioni fisiologiche che permettono di sopravvivere a livelli di stress molto più intensi. Le nuove conoscenze nel settore della fisiologia vegetale e biologia molecolare, come precedentemente descritto, indicano che esistono processi biochimici regolati sia da fattori ambientali esterni sia dallo stadio fenologico. Ne consegue che la fenologia non va più intesa come rapporto “sviluppo della pianta – clima” ma come interazione di tre elementi: “sviluppo e crescita – clima – metabolismo cellulare”.

1.1.1 Stress da basse temperature

Spesso lo stress da freddo provoca una sintomatologia comune nelle piante: comparsa sui tessuti d'imbrunimenti o uno scolorimento delle foglie a seguito dell'ossidazione dei polifenoli e un rallentamento della crescita. Da un punto di vista fisiologico, i primi metabolismi che ne risultano danneggiati sono la fotosintesi, la traslocazione dei carboidrati, la

respirazione cellulare e la sintesi proteica, associata ad un aumento della degradazione proteica. Alla base di questi cambiamenti, un meccanismo comune provoca la perdita delle proprietà della membrana con conseguente rilascio dei soluti. La suscettibilità al freddo è, infatti, spesso legata ad un'elevata percentuale di lipidi costituiti da acidi grassi saturi che provocano la solidificazione della membrana, sottoposta ad abbassamento termico, in uno stato semicristallino (Taiz & Zaiger, 1996). La prima risposta fisiologica di una pianta esposta a condizioni di temperature inferiori a 0°C è rappresentata da una significativa perdita d'acqua (fig. 1).

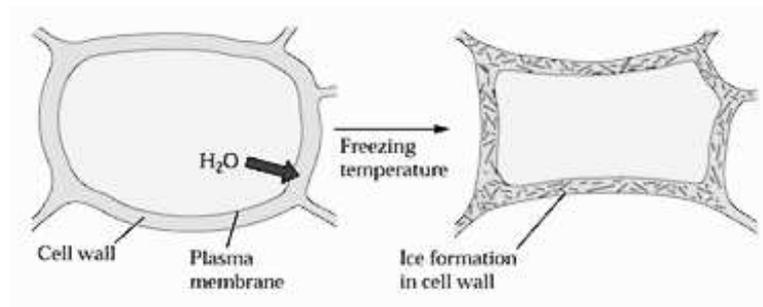


Figura 1– Meccanismo di perdita dell'acqua nella cellula durante il congelamento.

A seguito del congelamento si ha un accumulo di cristalli di ghiaccio negli spazi intercellulari (fig. 2), con formazione di adesioni tra il ghiaccio intercellulare, la parete e le membrane delle cellule, una condizione che promuove ulteriormente una consistente disidratazione.

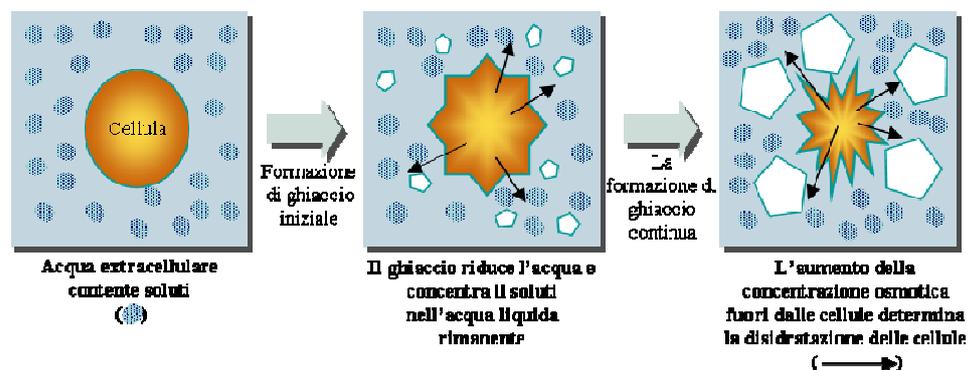


Figura 2- Formazione dei cristalli di ghiaccio.

La formazione di cristalli nell'apoplasto determina una diminuzione del potenziale idrico con un conseguente flusso d'acqua verso l'esterno della

cellula. La disidratazione determina modificazioni fisiologiche più o meno gravi a seconda della quantità d'acqua persa, della velocità di perdita e della durata della condizione di stress. A seguito di carenza idrica si determina una concentrazione dei soluti, una diminuzione del volume cellulare ed una modifica della forma delle membrane, l'alterazione del gradiente di potenziale idrico, la perdita di turgore, la distruzione dell'integrità di membrana, la denaturazione delle proteine (Cattivelli *et al.*, 2002). Durante l'evoluzione le piante hanno saputo sviluppare meccanismi di adattamento per resistere alle condizioni ambientali più avverse. Tra i più noti vi sono le modificazioni morfologiche finalizzate a limitare la perdita d'acqua (caratteri xerofitici) o la sincronizzazione del ciclo vitale per sfuggire le stagioni più avverse (i genotipi primaverili sfuggono i freddi invernali, mentre i genotipi precoci negli ambienti aridi evitano la siccità estiva). Oltre a questi meccanismi che tendono, nella maggior parte dei casi, ad "evitare" l'effetto dello stress sulla cellula, la sopravvivenza di una pianta ad una situazione di stress dipende anche dalla capacità della cellula di "rispondere" alla condizione avversa. La risposta cellulare allo stress è un meccanismo inducibile, spesso attivato da moderate condizioni di stress, che migliora sostanzialmente la capacità di tollerare gli effetti negativi delle condizioni ambientali sfavorevoli.

1.1.2 "Cold Acclimation" e il suo ruolo nel determinare la tolleranza

Ogni pianta ha una temperatura ottimale per la sua crescita ed il suo sviluppo ed è chiaro che quella temperatura ottimale per una determinata pianta può risultare un fattore di stress per un'altra. Molte piante, quali il mais (*Zea mays*), la soia (*Glicine max*), il cotone (*Gossypium hirsutum*), il pomodoro (*Lycopersicon esculentum*) e la banana (*Musa sp.*), manifestano fenomeni di danneggiamento quando esposte alle temperature di congelamento (al di sotto dei 10-15°C) (Lynch D.V. 1990; Guy L. 1990;

Hopkins W.G. 1999). Se, tuttavia, sono esposte, per un certo periodo, a temperature basse non letali (tra 0° e 6°C circa), aumentano la loro tolleranza verso temperature inferiori allo zero (Thomashow, 1999); questo fenomeno è conosciuto come “acclimatamento al freddo” o “hardening” o ancora “Cold Acclimation” (fig. 3) e viene distinta in “chilling tolerance” se si verifica per temperature comprese tra 0-15°C e “freezing tolerance” per temperature sotto gli 0°C. È ben noto che il segnale di stress è prima percepito a livello di membrana e successivamente trasdotto nella cellula dove si verifica l’attivazione di geni stress-responsive. Nel 1988, il ricercatore americano Williams ed il suo gruppo (Williams *et al.*, 1988) spiegarono questo processo con un aumento della percentuale dei lipidi insaturi nella membrana con conseguente aumento della sua fluidità. Il primo sintomo dovuto all’abbassamento della temperatura è l’alterazione della membrana cellulare, che subisce un passaggio da una fase fluida liquido-cristallina a una fase di gel. Lo stato fisico della membrana dipende dalla composizione lipidica, dal grado di saturazione e dalla temperatura ambientale ed il cambiamento di fluidità potrebbe rappresentare un potenziale sito di percezione del freddo e/o di ferita (Horvath *et al.* 1998; Örvar *et al.* 2002). Diversi studi svolti su *Arabidopsis* hanno dimostrato che, a basse temperature, il maggior grado di insaturazione dei lipidi determina un abbassamento nella temperatura di transizione, durante la quale si verifica il cambio di stato fisico fluido-gel, che risulta cruciale per il funzionamento ottimale della membrana. Al contrario, ad un più alto grado di saturazione dei lipidi corrisponde una temperatura di transizione più bassa e una diminuzione dell’efficienza del fotosistema II, del contenuto di clorofilla e di glicerolipidi del cloroplasto oltre ad un ritardo nella crescita dopo l’esposizione prolungata alle basse temperature (Wu J. *et al.* 1997; Hugly *et al.* 1992). Questi studi indicano, quindi, che la fluidità della membrana gioca un ruolo centrale nella rilevazione sia delle basse sia delle alte temperature e che il suo cambiamento può influenzare l’espressione dei geni. La membrana plasmatica rappresenta una barriera fisica tra la cellula e

l'ambiente circostante. È permeabile solo a piccole molecole lipidiche come gli ormoni steroidi che possono fluire attraverso la membrana nel citoplasma, mentre è impermeabile a composti solubili in acqua come ioni, proteine e altre macromolecole. Le risposte cellulari scaturiscono dall'interazione di molecole extracellulari dette elicitori o ligandi con proteine della membrana plasmatica, detti recettori. I vari segnali di stress fungono da ligandi per i recettori delle membrane cellulari della pianta.

Generalmente la risposta delle cellule allo stress da freddo determina, con modalità diverse a seconda della specie, diverse modifiche:

- Accumulo di Acido abscissico (ABA), un ormone vegetale implicato nella tolleranza al freddo, alla carenza idrica e allo stress salino. L'ABA è in grado di attivare specifici set di geni e costituisce uno dei secondi messaggeri usati dalle cellule per attivare i meccanismi di risposta;
- Sostanze ad elevato potere osmotico (osmoliti), quali zuccheri solubili, prolina, glicin-betaina, per contrastare la disidratazione causata dal congelamento dell'apoplasto e proteggere le membrane dalla disidratazione;
- Una famiglia di proteine note come LEA (Late-Embryogenesis Abundant) la cui funzione è ancora sconosciuta ma che presentano elevate caratteristiche idrofiliche;
- Proteine anticongelanti note come AFP (antifreeze proteins) che si suppone possano contrastare la formazione e lo sviluppo dei cristalli di ghiaccio (stress da freddo);
- Altre classi di proteine con funzione e caratteristiche ad oggi ignote principalmente localizzate all'interno del cloroplasto. Il primo gene isolato codificante per una proteina importata nel cloroplasto è stato identificato nel frumento ed è stato denominato *cor14b* (Cattivelli *et al.*, 1990; Crosatti *et al.*, 1995). Sia *cor14b* che l'omologo di frumento *wcs19* (Chauvin *et al.*, 1993) sono indotti solo da basse temperature e la loro espressione viene amplificata dopo brevi e regolari impulsi di luce,

condizione necessaria per il completo sviluppo del cloroplasto (Crosatti *et al.*, 1999).

- Aumento del contenuto in antocianine nelle specie pigmentate.

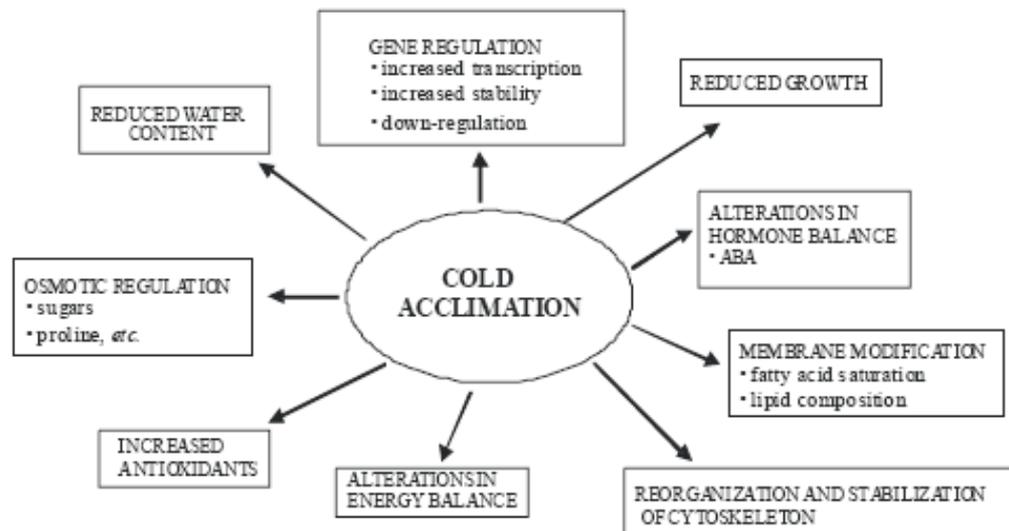


Figura 3– Modificazioni fisiologiche e biochimiche indotte nella pianta da cold-acclimation.

1.1.3 La trasduzione del segnale

La tolleranza agli stress ambientali è ritenuta un carattere complesso, controllato in modo articolato. In molte piante di interesse agrario sono noti un certo numero di geni “stress responsive”: geni codificanti enzimi per la sintesi di osmoprotettori, geni LEA (Late embryogenesis abundant), geni regolatori, geni coinvolti nello stress ossidativo, geni che codificano chaperon molecolari, geni coinvolti nell’insorgenza di osmotic adjustment.

Le variazioni nella fluidità della membrana sono considerate come la prima alterazione fisica della cellula in condizioni di stress da basse temperature, ma fino ad oggi, non è stato identificato con certezza nessun recettore di membrana che dia maggior corpo a quest’ipotesi iniziale (Xiong L. *et al.*, 2002; Chinnusamy V. *et al.*, 2004).

In relazione alle classi di sensori di membrana, è stato studiato il possibile intervento di due sistemi: un’*istidina chinasi associata alla membrana*

(HIK33) (Suzuki I. *et al.*, 2000) e una *proteina-channel* (TRP) (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Tali sensori sono proteine integrali di membrana e si pensa possano riconoscere i cambiamenti nella condizione fisica delle membrane delle cellule che subiscono lo stress da freddo (Mikami *et al.*, 2002). L'azione dell'istidina chinasi come sensore del freddo è stata identificata nei procarioti e studi recenti hanno dimostrato che in particolare l'HIK33 (SII0698) in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Suzuki *et al.*, 2000), l'HIK19 e un regolatore di risposta (RER1) fungono da componenti della via per la percezione e la traduzione dei segnali di bassa temperatura. Si è visto che l'inattivazione di questi geni tramite mutagenesi, ha impedito l'attivazione trascrizionale di parecchi geni freddo-indotti (Sung *et al.*, 2003). L'HIK33 che contiene probabili domini *membrane-spanning*, è stato quindi proposto come sensore di membrana in grado di trasdurre un segnale freddo ad un trasduttore a valle, possibilmente HIK19. Tuttavia, HIK33 sembra sia in grado di trasdurre il segnale soltanto ad un sottoinsieme dei geni freddo-regolati rappresentati da *desB*, ma non a quelli rappresentati da *desA* e *desD*, suggerendo quindi la presenza di altri sensori o vie del segnale del freddo (Suzuki *et al.*, 2000). Recentemente, canali permeabili al Ca^{2+} della famiglia TRP sono stati identificati come sensori del freddo nel sistema nervoso dei mammiferi (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). L'aumento della concentrazione di calcio citosolico libero è un evento precoce comune a molti stress ambientali, incluso il freddo (Knight *et al.*, 1996; Knight *et al.*, 2001), ed è indicato come il primo fenomeno intracellulare di percezione dello stress; pertanto, i canali di afflusso del calcio possono essere inclusi fra i sensori primari dello stimolo da freddo.

Lo stress è prima percepito dai recettori presenti nella membrana cellulare (fig. 4) che attivano le fosfolipasi C (PLC) che catalizzano in modo selettivo l'idrolisi Ca^{2+} -dipendente del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2) in inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG). L' IP_3 è un messaggero intracellulare citoplasmatico, che interagisce con il corrispondente recettore del reticolo endoplasmatico liscio causando la

liberazione del Ca^{2+} immagazzinato e, quindi, l'innalzamento della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare. Il segnale, tradotto downstream, genera secondi messaggeri come il calcio, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e fosfatidilinositolo. Questi messaggeri modulano ulteriormente il livello di calcio intracellulare. L'alterazione del livello di ioni Ca^{2+} nel citosol è percepita dalle proteine che legano il calcio, anche conosciute come Ca^{2+} sensors. Queste proteine sensori interagiscono con i loro rispettivi partners di interazione determinando l'inizio di una *cascata di fosforilazione* (MAPK) (fig. 5) e attivano i principali geni di risposta allo stress (Moffatt *et al.*, 2006) o i fattori di trascrizione che controllano questi geni (Mahajan S. *et al.*, 2005). Le cascate di MAPK rappresentano una parte della via di trasduzione del segnale e nelle piante sono attivate da trattamenti con ormoni, patogeni e da condizioni di stress dovute al freddo, alla siccità e all'elevata salinità (Hirt H., 2000; Ichimura K. *et al.*, 2000; Sangwan *et al.*, 2002). Recentemente sono state identificate MAPK attivate da shock termico, HAMK (Sangwan *et al.*, 2002) ed è stato notato che sono differenti da quelle attivate dal freddo, SAMK (Jonak *et al.*, 1996). Al contrario, piante sottoposte a trattamenti con inibitori del calcio e della calmodulina e con bloccanti dei canali del calcio mostrano una maggiore sensibilità alle basse temperature (Larkindale *et al.*, 2002). Infine, i prodotti di questi geni portano la pianta all'adattamento ed aiutano la pianta a sopravvivere e superare la condizione di stress. I cambiamenti indotti da stress dell'espressione genica possono partecipare alla formazione di ormoni come ABA, acido salicilico, etilene, molecole che amplificano il segnale iniziale ed iniziano un secondo turno di segnalazioni che possono seguire sia lo stesso percorso oppure utilizzare differenti componenti di segnale.

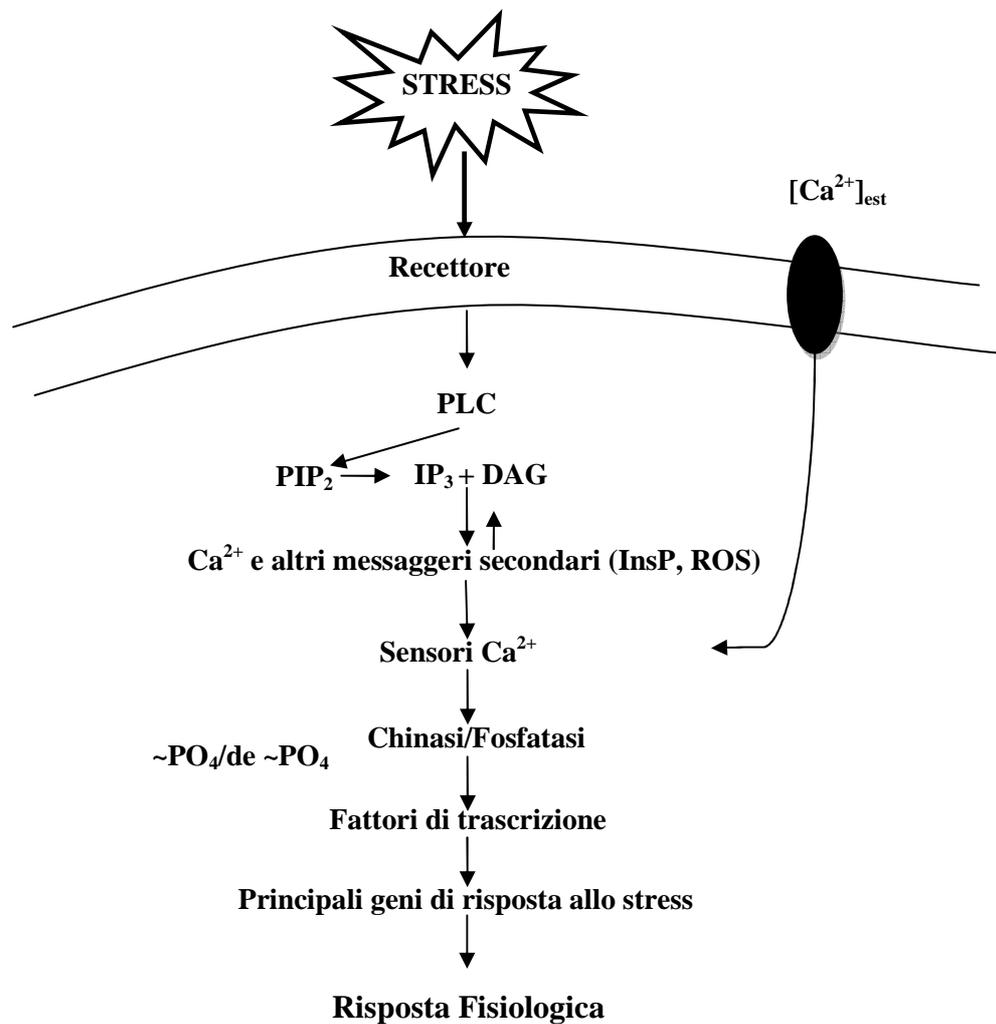


Figura 4- Il segnale di stress è prima percepito da un ricettore sulla membrana, il quale attiva PLC ed idrolizza PIP₂ con formazione di IP₃ e DAG. I livelli di calcio nel citoplasma sono sovraregolati con movimenti di ioni Ca²⁺ dall'apoplasto o dal suo rilascio dalla materia intracellulare mediata da IP₃. Questo cambiamento del livello di Ca²⁺ nel citoplasma è avvertito da un sensore calcio-sensibile che interagisce con i geni di segnalazione quali Kinase o Phosphatase. Queste proteine influenzano l'espressione dei principali geni generanti la risposta fisiologica.

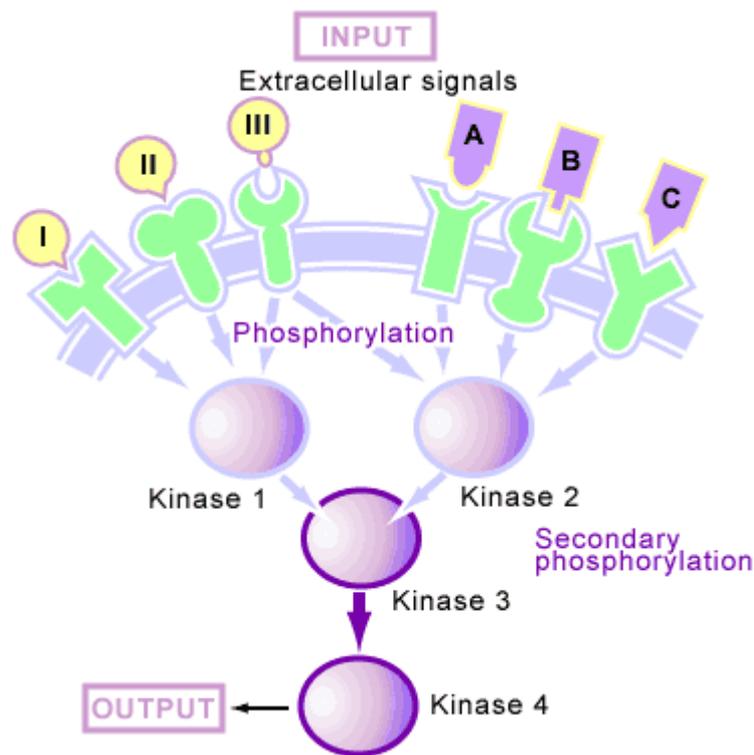


Figura 5 – Fosforilazione a cascata di MAPK.

Un'ulteriore classificazione prevede la distinzione dei vari geni indotti da stress in geni indotti prima (*early*) e dopo (*late*) (fig. 6). I geni indotti nelle fasi iniziali sono attivati dopo pochi minuti dalla percezione del segnale indotto da stress. Diversi fattori di trascrizione sono classificati come geni indotti nella fase iniziale in quanto l'induzione di questi non richiede la sintesi di nuove proteine ed i componenti della segnalazione sono già presenti. Al contrario, molti altri geni che sono attivati dopo parecchie ore dalla percezione dello stress sono classificati come geni tardivi. A questi appartengono i geni RD (responsive to dehydration), KIN (cold induced)/COR (cold responsive) che codificano e modulano proteine necessarie per la sintesi come la proteina LEA-LIKE (Late Embryogenesis Abundant), antiossidanti, proteine stabilizzanti la membrana, ecc...

Stress Responsive Genes

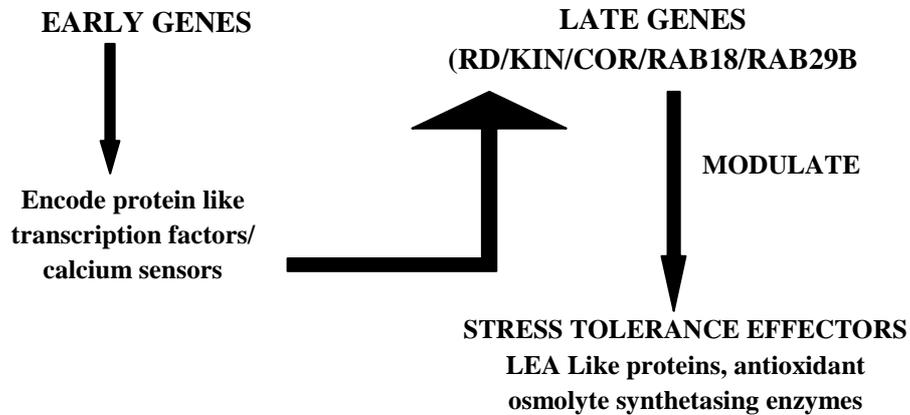


Figura 6 – Espressione di geni early e late in risposta agli stress abiotici.

Molti geni, i cui trascritti si accumulano in risposta alle basse temperature, sono stati isolati in *Arabidopsis*. L'elemento regolativo, CRT-DRE (C-repeat dehydration responsive element) (Shinozaki *et al.*, 2003), contenente la sequenza CCGAC, presente nella regione promotrice dei geni coinvolti nella risposta alla bassa temperatura, conferisce, ad esempio, la capacità di risposta alle basse temperature tramite alcuni attivatori trascrizionali che si legano a questo elemento (CBF1, CBF2, CBF3, DREB1b, DREB1c, DREB1a, DREB2). In effetti, è stato dimostrato che in piante transgeniche di *Arabidopsis* che sovraesprimono queste proteine, si ha l'induzione di molti geni contenenti elementi CRT-DRE anche in assenza di trattamento con basse temperature. E' stato definito quindi un "regulone CBF", che include tutti i geni contenenti elementi CRT-DRE e quindi attivati dai fattori CBF/DRE, e che include i geni coinvolti nell'insorgenza della tolleranza da acclimatazione (Medina *et al.*, 1999). E' stato inoltre dimostrato che il sistema CBF/DREB1 è ubiquitario nelle piante, essendone stata dimostrata la presenza e il coinvolgimento in colza, segale, grano e pomodoro. Questo pathway non è tuttavia l'unico coinvolto nella trasduzione del segnale; altri pathway che si sono dimostrati essenziali durante la risposta allo stress da freddo sono invece mediati da acido abscissico (ABA), e fanno capo ad

elementi ABRE (Abscisic-acid responsive elements; (Fowler *et al.*, 2002). L'analisi di sequenza ha inoltre messo in evidenza che molti geni COR, identificati come coincidenti con i geni RD (responsive to dehydration), evidenziano la natura comune della risposta di *Arabidopsis* ai due stress osmotici, entrambi tradotti in una caduta del Ψ_w (Moffat *et al.*, 2006). Una conferma deriva anche dal fatto che piante transgeniche che sovraesprimono i fattori di trascrizione CBF o DREB1, mostrano un'aumentata tolleranza sia al freddo sia alla siccità (Shinozaki *et al.*, 2000).

1.2 L'ACIDO ABSCISSICO: BIOSINTESI ED ATTIVITA'

1.2.1 La scoperta dell'acido abscissico

Per numerosi anni i fisiologi vegetali hanno avuto il sospetto che il fenomeno della dormienza dei semi e delle gemme fosse causato da composti inibitori. Nel 1953, Bennet-Clark e Kefford, in seguito ad esperimenti condotti con la cromatografia e a saggi biologici sui coleoptili di avena, misero in evidenza un composto inibitore diverso dall'auxina. Dieci anni dopo, nel 1963, ad opera di Frederick Addicott e dei suoi collaboratori, venne purificata e cristallizzata dai frutti di cotone una sostanza che ne promuoveva l'abscissione e venne definita Abscissina II (Addicott *et al.*, 1968). Circa nello stesso periodo venne purificata dalle foglie di acero una sostanza in grado di promuovere la dormienza delle gemme, essa venne definita Dormina. (Salisbury *et al.*, 1992). Quando venne chimicamente identificata la Dormina, si scoprì che era identica all'Abscissina II e il composto fu denominato Acido Abscissico (ABA) a causa del suo coinvolgimento nel processo di abscissione.

L'ABA è riconosciuto come un vero ormone vegetale; esso agisce come:

- Inibitore: da regolatore negativo della crescita e dell'apertura stomatica (particolarmente quando la pianta è sottoposta a stress ambientali)

- Regolatore della dormienza dei semi
- Ormone ubiquitario nelle piante vascolari, si ritrova in ogni parte della pianta, mentre risulta assente nelle alghe e nelle epatiche dove ritroviamo un composto simile sia strutturalmente che funzionalmente, definito acido lunularico.

1.2.2 La struttura dell'ABA e la sua distribuzione in natura

I 15 atomi di carbonio dell'ABA sono configurati in un anello alifatico con un doppio legame, due gruppi metilici e una catena insatura che termina con un gruppo carbossilico. La posizione dei protoni in C-2 e C-4 e il conseguente orientamento del gruppo carbossilico in C-2, determinano gli isomeri *cis* e *trans* dell'ABA. Praticamente tutto l'ABA che si trova in natura è nella forma *cis* e, per convenzione, il nome Acido Abscissico è riferito a questo isomero. L'ABA possiede nella posizione 1' dell'anello un atomo di carbonio asimmetrico, dando origine agli enantiomeri (+) e (-) (rispettivamente S e R) (fig. 7). L'enantiomero S è la forma naturale. L'ABA commercialmente disponibile è una miscela di contenuto approssimativamente uguale delle due forme S e R e l'enantiomero S è l'unica forma attiva nelle risposte veloci come la chiusura degli stomi. Nelle risposte a lungo termine, come i cambiamenti nella sintesi proteica, sono attivi entrambi gli enantiomeri. Nei tessuti vegetali, a differenza degli isomeri *cis* e *trans*, gli enantiomeri S e R non possono essere interconvertiti. Studi sui requisiti strutturali hanno dimostrato che qualsiasi cambiamento della molecola porta alla perdita di attività. Alcune delle caratteristiche fondamentali richieste per l'attività biologica comprendono il gruppo carbossilico, il gruppo alcolico terziario, il doppio legame 2-*cis* e quello sull'anello. I prodotti del catabolismo dell'ABA, presenti nel tessuto e privi di uno di questi gruppi, non sono biologicamente attivi.

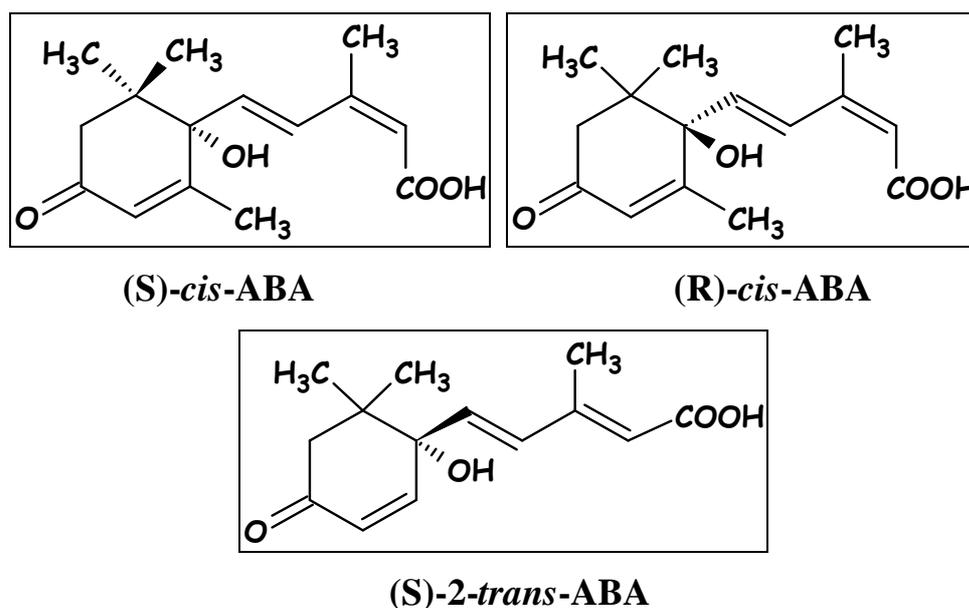


Figura 7 – Struttura dell'ABA.

1.2.3 La biosintesi dell'acido abscissico

Sono due le possibili vie che portano alla biosintesi dell'ABA, una diretta nella quale l'ABA deriva da un precursore a 15 atomi di carbonio: il farnesil pirofosfato ed un'indiretta, nella quale l'ABA deriva da un composto a 40 atomi di carbonio: il carotenoide violaxantina (Zeevaart *et al.*, 1988; Zeevaart, 1999). Il precursore dei carotenoidi è l'isopentenil pirofosfato IPP (C5) che nel citosol deriva dall'acido mevalonico, mentre nei plastidi, dove avviene la sintesi dei carotenoidi, è prodotto, attraverso 1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato (DXP), da piruvato e gliceraldeide 3-fosfato. La DXP sintase è l'enzima che catalizza il primo step della sintesi dell'IPP per via non-mevalonica (Lichtenthaler, 1999; Eisenreich *et al.*, 2001), il quale è successivamente convertito in geranylgeranyl pirofosfato GGPP (C20). Il primo step della sintesi dei carotenoidi prevede la conversione del GGPP nel carotenoide fitoene (C40) ad opera della fitoene sintase PSY. Successivamente, il carotenoide fitoene è convertito in ζ -carotene ad opera della fitoene desaturase (PDS), segue poi il licopene, il β -carotene e l'xantofilla, la zeaxantina (Cunningham *et al.*, 1998; Hirschberg, 2001). La

via di sintesi dell'ABA prende il via dalla conversione della zeaxantina in all-trans-violaxantina attraverso due passaggi di epossidazione catalizzati dall'enzima zeaxantin epossidase (ZEP) (Marin E. *et al.*, 1996). L'enzima catalizzante la conversione dell'all-trans-violaxantina in 9-cis-violaxantina o 9'-cis-neoxantina non è stato ancora isolato e identificato, mentre, nello step successivo, la formazione dell'xantossina dalle xantofille, 9-cis-violaxantina e/o 9'-cis-neoxantina, è catalizzata dalla 9-cis-epossi carotenoidi diossigenase (NCED). Studi biochimici e genetici dimostrano che la scissione ossidativa catalizzata della 9-cis-epossicarotenoid diossigenase (NCED) rappresenta in molte piante lo step critico nella regolazione della sintesi dell'ABA (Schwartz *et al.*, 2003; Nambara *et al.*, 2005). Zaccarías e suoi collaboratori (Zaccarías *et al.*, 2006), nei loro studi sulle arance rosse, isolarono e caratterizzarono dall'epicarpo di arance *Citrus sinensis* due interi tratti di cDNAs (CsNCED1 e CsNCED2) codificanti NCEDs. L'esperimento condotto sulle foglie e sull'epicarpo di arance *Citrus* rivelò che l'evoluzione dei livelli endogeni di ABA era ben correlata con l'accumulo dei trascritti CsNCED1 e CsNCED2, suggerendo quindi un ruolo chiave dell'NCED nella regolazione della sintesi dell'ABA. Una sorprendente caratteristica dei geni NCED1 e NCED2 è la loro differente espressione tessuto-specifica e la loro diversa espressione temporale nella risposta ai segnali ambientali e di sviluppo. Infatti, l'espressione del gene NCED1 aumenta nell'epicarpo del frutto durante la maturazione naturale, nelle foglie e nei frutti disidratati, in combinazione costante con l'accumulo di ABA. Il gene CsNCED2, invece, non si esprime nelle foglie ma è solo rilevabile nei frutti, manifestandosi negli stadi tardivi della maturazione e transitoriamente nel flavedo deidratato. Questi risultati suggeriscono che CsNCED1 gioca un ruolo primario nella biosintesi dell'ABA sia nelle foglie che nei frutti, mentre CsNCED2 riveste un ruolo secondario solo nei tessuti contenenti i cromoplasti (fiori e frutti) necessario probabilmente per regolare o sostenere i livelli di ABA in specifici stage di sviluppo o nella disidratazione del frutto. Successivamente la xantossina è convertita in ABA

nel citosol (fig. 8). Sono state proposte tre possibili vie di conversione, partendo dall'aldeide abscissica, dall'acido xantossico e dall'alcol abscissico.

Nel primo caso studi condotti su mutanti di *Arabidopsis* *aba2* e *aba3*, del tabacco *aba1* e del pomodoro *flacca* e *sitiens* supportano l'idea che la xantossina venga prima convertita in aldeide abscissica da un enzima appartenente ad una famiglia di deidrogenasi/reduccasi SDR a catena corta (Rook *et al.*, 2001) e dopo ossidata per produrre ABA ad opera dell'aldeide ossidase (AOX).

Nel secondo caso la sintesi dell'ABA avverrebbe attraverso l'acido xantossico (Milborrow, 2001; Cowan, 2000) in quanto alcuni studi dimostrerebbero che alcune isoforme di AOX convertirebbero la xantossina in acido xantossico (Lee *et al.* 1997).

Nel terzo e ultimo caso gli studi dimostrerebbero che l'aldeide abscissica è convertita in alcol abscissico successivamente ossidato ad ABA (Rock *et al.*, 1991).

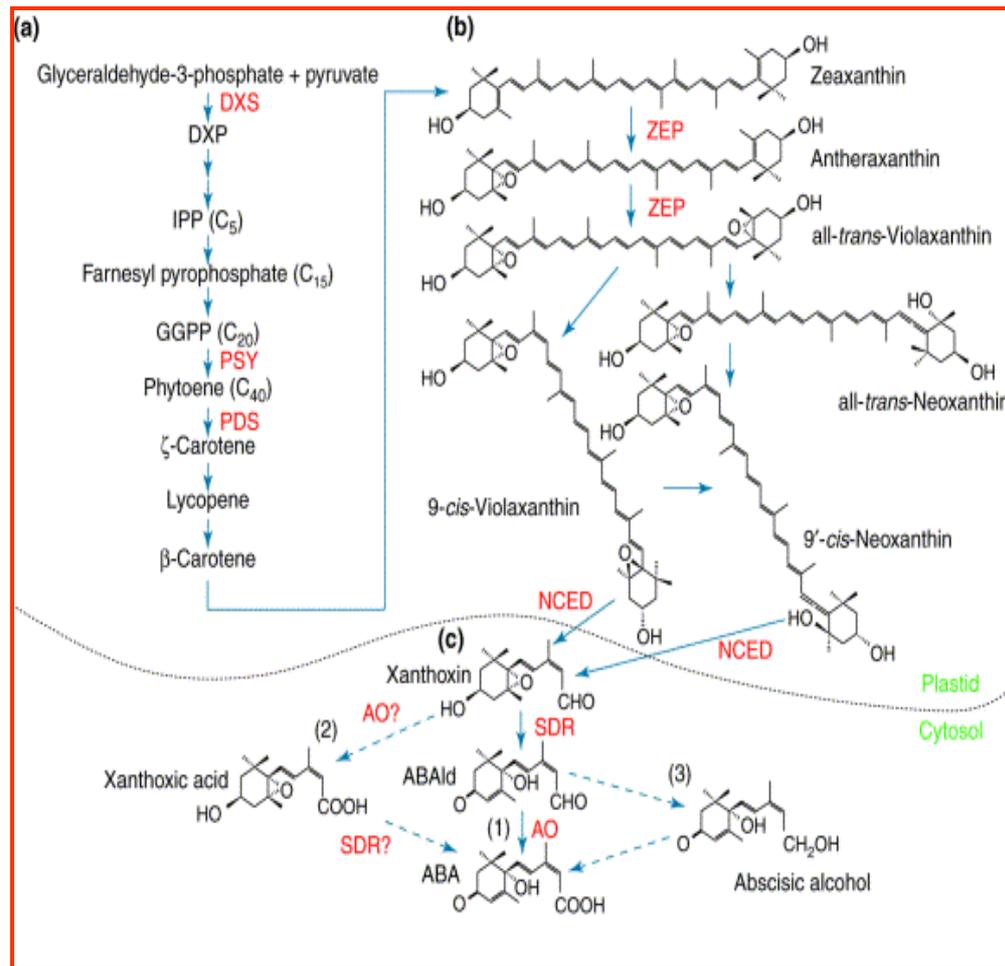


Figura 8 – Via di biosintesi dell'ABA; (a) Sintesi del precursore carotenoidale nel primo step; (b) Formazione dell'epossicarotenoidale e sua scissione nel plastide; (c) Reazioni nel citosol per la formazione dell'ABA.

1.2.4 L'attività fisiologica dell'acido abscissico in condizioni di stress: traslocazione e Catabolismo.

Molti processi fisiologici vegetali coinvolgono la sintesi dell'acido abscissico (Zeevaart *et al.*, 1988). L'ABA, infatti, interviene durante lo sviluppo vegetativo, nella risposta a vari stress ambientali quali la siccità e l'alta salinità, oltre a controllare l'espressione di molti geni indotti da queste condizioni di stress.

Tra i principali effetti fisiologici dell'ABA si includono:

- Chiusura stomatica
- Dormienza di semi e gemme
- Abscissione fogliare e senescenza
- Assorbimento di acqua

I livelli di concentrazione dell'ormone variano non solo in riguardo all'organo considerato o a seconda della fase di vita della pianta ma anche in base alle condizioni di stress cui la pianta viene sottoposta. Nei semi in via di sviluppo la concentrazione può aumentare di 100 volte nell'arco di pochi giorni per poi riscendere man mano che la maturazione avanza. La dormienza di semi e gemme rappresenta, infatti, un meccanismo di difesa della pianta. Durante le fasi di maturazione del seme e inizio della dormienza i livelli endogeni di ABA aumentano. L'ABA ha una funzione protettiva durante la disidratazione del seme in quanto promuove l'accumulo di proteine e lipidi di riserva durante l'embriogenesi, sostanze che verranno utilizzate durante lo sviluppo. L'ABA aiuta, quindi, i semi a superare le condizioni di stress e germinare solo quando le condizioni sono favorevoli per la loro crescita. Inoltre previene la precoce germinazione dell'embrione prematuro.

In condizioni di stress idrico il contenuto in ABA delle foglie può aumentare di 50 volte in 4-8 ore e ritornare a livelli normali altrettanto velocemente (Fricke *et al.*, 2004) Diversi studi sulla biosintesi dell'ABA hanno rilevato una maggiore concentrazione di ormone nelle radici, nella linfa xilematica e nelle foglie in condizioni di disidratazione indotta da freddo e da siccità (Rock *et al.*, 1991). Si è notato, infatti, che l'applicazione di ABA nelle piante minimizza l'effetto delle condizioni di stress grazie alla sua azione di regolazione dell'equilibrio idrico e di tolleranza allo stress osmotico. In condizioni di stress da basse temperature e di stress idrico la prima linea di difesa delle piante è rappresentata dalla chiusura degli stomi al fine di prevenire la perdita di acqua per traspirazione (Mansfield *et al.*, 1990). La chiusura stomatica può essere ricollegata all'azione dell'ABA che promuove un meccanismo di chiusura degli stomi di tipo idroattivo,

provocando l'inversione dei flussi ionici che altrimenti promuovrebbero l'apertura degli stomi. L'ABA è anche coinvolto nei segnali germoglio-radice. Recenti studi hanno dimostrato che la traslocazione di ABA all'interno della radice è modulata da fattori ambientali, dalla durata della luce ma soprattutto dal pH del succo xilematico. L'ABA viene trasportato sia dallo xilema che dal floema. Quando la pianta è sottoposta a stress idrico la concentrazione di ABA nel succo xilematico aumenta (da 1-15 nM a 3 μ M) in quanto una determinata parte di ABA sintetizzata nelle radici (più a diretto contatto con il suolo che si sta disidratando) viene trasportata attraverso lo xilema. In concomitanza, in condizioni di stress idrico, il pH del succo xilematico aumenta da valori di 6,3 a valori di circa 7,2 (Wilkinson *et al.*, 2002, 1997; Hartung *et al.*, 2002). L'alcalinizzazione dell'apoplasto favorisce la dissociazione dell'ABA^H in ABA-libero e il suo trasporto verso il germoglio, raggiungendo più facilmente le cellule di guardia e causando la chiusura degli stomi (fig. 9). La chiusura stomatica però non sempre dipende dalla percezione di segnali di deficit idrico derivanti dalle foglie, talvolta, infatti, la chiusura degli stomi risponde anche direttamente all'essiccamento del suolo ancora prima che vi sia una significativa riduzione nella pressione di turgore del mesofillo della foglia.

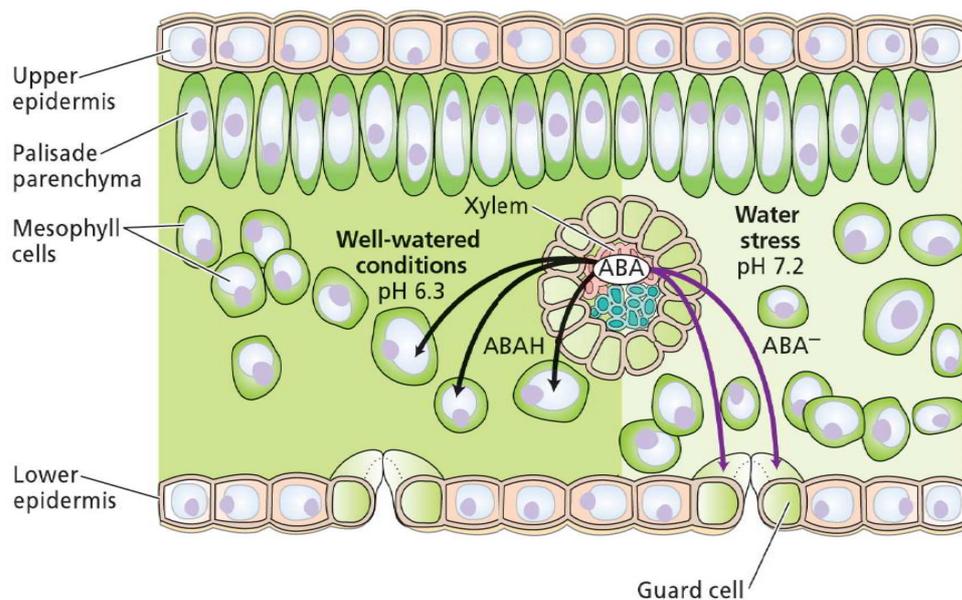


Figura 9 – Meccanismo di chiusura degli stomi.

Allo stesso tempo, le condizioni ambientali, incrementando il grado di traspirazione, comportano un aumento del pH della linfa fogliare, che può promuovere l'accumulo di ABA e la riduzione della conduttanza stomatale (Wilkinson *et al.*, 2002; Davies. *et al.*, 2002). Un intenso fenomeno di traslocazione dell'ormone avviene anche in caso di carenza nel suolo di fosfato e potassio, ciò aumenta la formazione di ABA nelle radici (Fan *et al.*, 2008). In queste condizioni, tuttavia, solo una piccola quantità di ABA viene depositata nelle radici, mentre un'alta percentuale viene rilasciata nello xilema. Uno studio effettuato nel 2005 dai ricercatori Arkhipova e collaboratori (Arkhipova *et al.*, 2005) ha evidenziato un aumento di ABA nei germogli di lattuga trattati con *Bacillus subtilis*, un batterio che produce citochinina. Elevate concentrazioni di citochinina inducevano la biosintesi di ABA nelle radici. L'ABA neo-formato veniva poi traslocato nello xilema senza deposizione nelle radici, situazione simile a quella che avviene in condizione di carenza di fosfato e potassio nel suolo. Il rizobatterio *Variovorax paradoxus*, contenente ACC-deaminasi (ammino-ciclopropano-acido-carbossilico-deaminasi), riesce a degradare i precursori dell'etilene. L'etilene, d'altro canto, induce la biosintesi dell'ABA. Di conseguenza piante trattate con *Variovorax* mostrano una tendenza a diminuire la biosintesi di ABA nelle radici, il trasporto xilematico ed ovviamente anche il trasporto dal floema di nuovo alle radici. Alcuni rizobatteri che producono auxine sono inoltre capaci di influenzare il trasporto dell'ABA (Fan *et al.*, 2008) influenzando sulla sintesi dell'acido indolo-acetico. Dato che IAA induce la biosintesi dell'etilene che a sua volta induce la biosintesi dell'ABA, è chiaro come questi rizobatteri abbiano un effetto sulla produzione ed il trasporto di ABA (fig. 10).

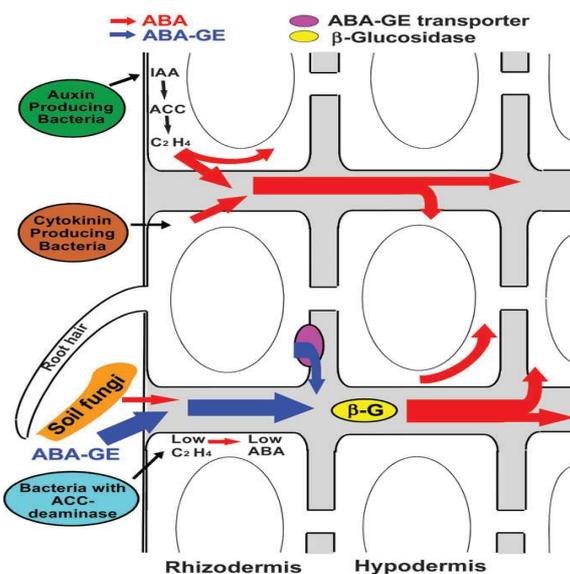


Figura 10- Schema del flusso di ABA nella corteccia delle radici. Un possibile ruolo dei Rizobatteri che producono Auxina (IAA) e citochinina e di batteri che possiedono l'ACC-deaminasi. La larghezza delle frecce indica l'intensità del flusso.

Un effetto immediato che si nota in seguito all'esposizione di cellule di guardia all'ABA è una depolarizzazione della membrana dovuta all'influsso netto di cariche positive ed un aumento transiente nella concentrazione citosolica di calcio. Un effetto, infatti, dell'ABA è di stimolare il rilascio degli ioni calcio nel citosol da comparti interni quali i vacuoli o dal reticolo endoplasmatico; aumentando così la concentrazione citosolica del calcio da 50-350 nM a valori di 1,1 μM (Mansfield *et al.*, 1995) (fig. 11).

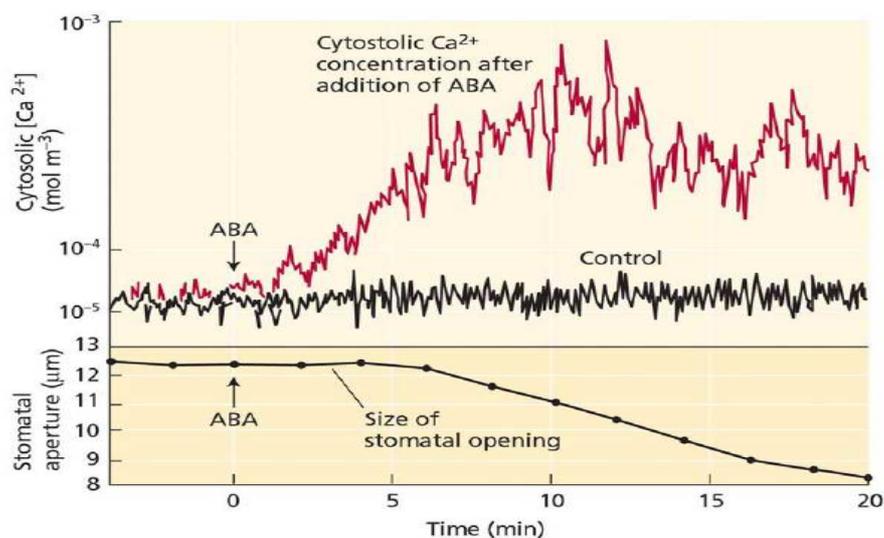


Figura 11- Aumento della concentrazione di ioni Ca^{2+} nel citosol in seguito all'esposizione di ABA.

Oltre ad aumentare la concentrazione del calcio citosolico, l'ABA causa, come precedentemente detto, l'alcalinizzazione del citosol da valori di circa 7,67 a valori di 7,94. L'aumento del pH attiva i canali di efflusso del K^+ presenti nella membrana plasmatica. Comunque la sola attivazione dei canali di efflusso del K^+ non porta alla perdita di K^+ . Perché avvenga un sostanziale efflusso di K^+ , l'ABA deve essere in grado di indurre una depolarizzazione di membrana a lungo termine, depolarizzazione che viene causata dall'influsso di cariche positive e da un aumento transiente nella concentrazione citosolica di calcio. Queste condizioni sono necessarie affinché l'ABA attivi e apra i canali anionici lenti (Tipo-S) presenti sulla membrana plasmatica (Grabov *et al.*, 1997; Pei *et al.*, 1997). L'apertura prolungata di questi canali lenti permette la fuga dalla cellula di ioni Cl^- e malato²⁻ che si spostano secondo il loro gradiente elettrochimico; la parte esterna, infatti, essendo più positiva, possiede concentrazioni minori di Cl^- e malato²⁻ rispetto alla parte interna. La corrente ionica negativa in uscita depolarizza la membrana promuovendo l'efflusso di K^+ . Un altro fattore che può contribuire all'efflusso di ioni potassio è l'inibizione della H^+ -ATPasi di membrana. L'ABA inibisce il pompaggio di protoni stimolato dalla luce blu nei protoplasti di cellule di guardia in accordo con l'ipotesi che una diminuzione dell'attività della H^+ -ATPasi aiuti a depolarizzare la membrana in presenza di ABA (fig. 12).

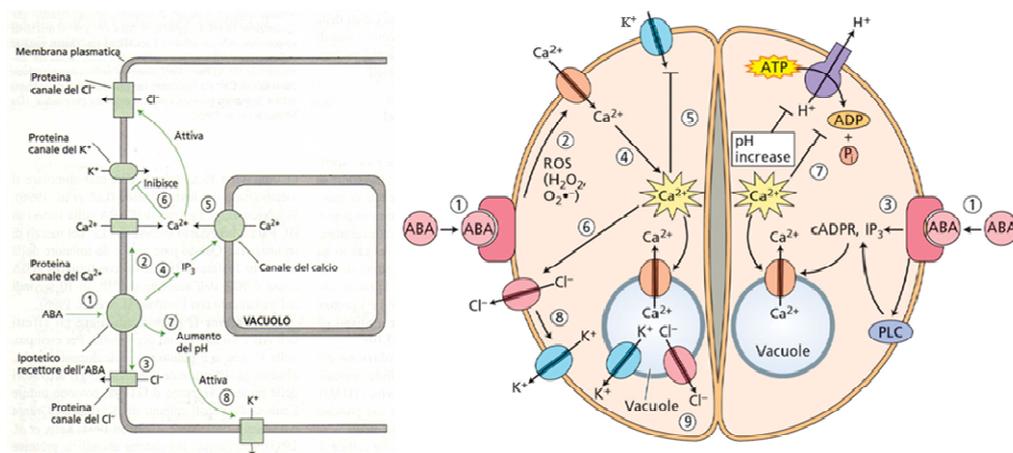


Figura 12

L'acido abscissico riveste un ruolo importante anche nel processo di abscissione fogliare e senescenza delle foglie. La riduzione della superficie fogliare è utile alla pianta nelle condizioni di deficit idrico; in questo modo la foglia espone una superficie fogliare minore con conseguente riduzione della traspirazione. Molte piante mature, come il cotone, sono costrette a rispondere alla siccità accelerando la senescenza (ingiallimento) e l'abscissione (caduta) delle foglie più vecchie; in altre, come il melone cantalupo l'ABA riveste un ruolo importante nel processo di maturazione di tipo climaterico con la promozione di etilene (Martinez *et al.*, 1999). L'ABA favorisce l'assorbimento di acqua che stimola il flusso idrico e la conduttività idraulica nelle radici. Inoltre, in condizioni di stress idrico, stimola la crescita delle radici affinché possano raggiungere zone più profonde del suolo ricche di acqua. In seguito al risolversi della situazione di "crisi", parte dell'ABA formatosi deve essere eliminato o inattivato. Le piante hanno evoluto due diversi sistemi di catabolismo per l'acido abscissico: l'ossidazione e la coniugazione (Popoff *et al.*, 1972).

Nel processo di ossidazione (fig. 13) l'ABA viene prima ossidato in un intermedio instabile: l'acido Faseico (PA), che è solitamente inattivo o ha un'attività molto ridotta (in alcune specie causa la chiusura degli stomi indicando che è in grado di legarsi ai recettori dell'ABA), ed in seguito ossidato in acido 4'-diidrofaseico (DPA) che non ha mai dimostrato attività nei saggi biologici.

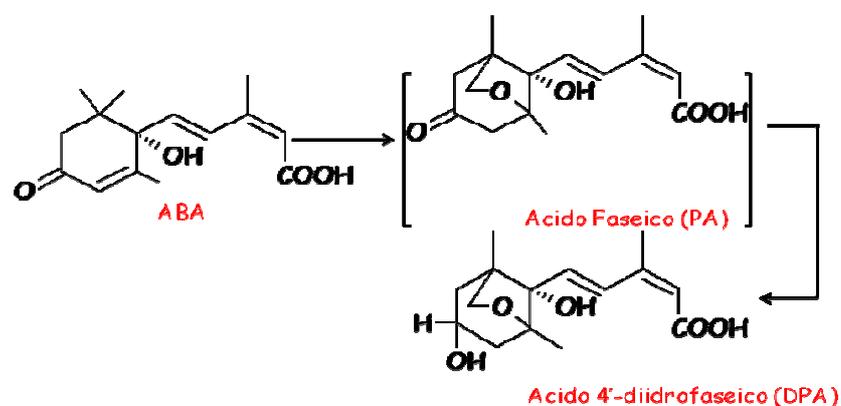


Figura 13- Ossidazione dell'ABA

La coniugazione ha lo scopo di legare l'ABA ad uno zucchero in modo da rendere l'ormone inattivo (fig. 14).

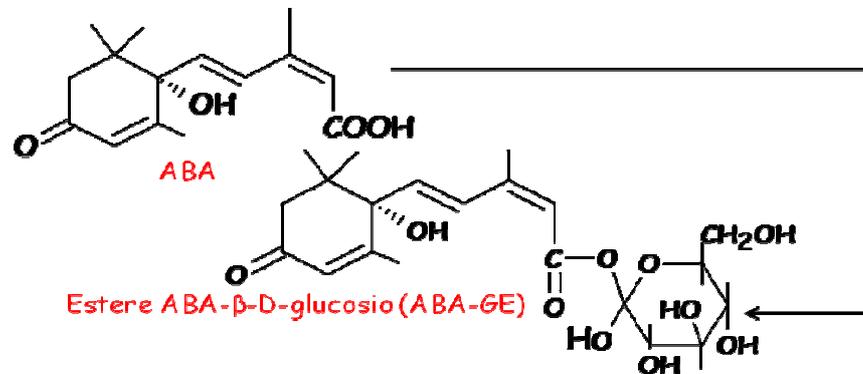


Figura 14- Coniugazione dell'ABA

La coniugazione non solo rende l'ABA inattivo, ma altera anche la polarità e la sua distribuzione cellulare. Infatti, mentre l'ABA libero è localizzato nel citosol, l'ABA-GE si accumula soprattutto nei vacuoli, anche se può essere ritrovato nel succo xilematico di piante sottoposte a stress (Bano *et al.*, 1994; Jeschke *et al.*, 1997; Hartung *et al.*, 2002). Quando le piante sono sottoposte a cicli di stress idrico e reidratazione, la concentrazione di ABA-GE aumenta costantemente, indicando che la forma coniugata dell'ormone non è idrolizzata durante lo stress (Boyer *et al.*, 1982). Si è inoltre dimostrato che l'ABA coniugato aumenta gradualmente con l'età in foglie di *Hyoscyamus niger* rappresentando circa il 95% dell'ABA totale al 4° mese (Weiler, 1980). La funzione del pool extracellulare dell'ABA legato è ancora sconosciuta, è però possibile ipotizzare tre differenti destini:

1. L'ABA legato potrebbe accumularsi nelle fase acquosa intercellulare, conseguentemente la concentrazione di ABA coniugato dovrebbe aumentare nell'apoplasto con l'età e lo stress ugualmente a ciò che avviene nei vacuoli. Tuttavia questo accumulo non è stato riscontrato.
2. L'ABA legato potrebbe essere trasportato all'interno delle cellule. Ad oggi non è stato identificato nessun sistema di trasporto della membrana plasmatica, infatti, il trasporto dell'ABA- β -D-glucosio viene tutt'oggi

considerato insignificante data la scarsa permeabilità dell'ABA-GE attraverso la membrana plasmatica (Baier *et al.*, 1990).

3. L'ABA legato potrebbe essere scisso per via enzimatica una volta raggiunto lo spazio apoplastico delle foglie. L'ABA liberato poi potrebbe quindi essere trasportato all'interno delle cellule ed indurre cambiamenti del metabolismo o agire come segnale di guardia. Esempi di questo tipo di attività enzimatica apoplastica sono: α -mannosidasi, α e β -galattosidasi, fosfodiesterasi (enzimi appartenenti alla classe delle idrolasi, che agiscono sui legami β -glicosidici dei polisaccaridi, idrolizzando i residui terminali di β -D-glucosio e generandone il rilascio). Le β -D-glucosidasi hanno un pH ottimale di circa 7. Il pH del fluido intercellulare di lavaggio (IWF) delle foglie di orzo invece è di 6,2-6,5. Dopo l'alcalinizzazione che avviene in seguito ad uno stress idrico l'attività delle β -glucosidasi aumenta notevolmente favorendo così la scissione dell'ABA-GE rilasciando la forma libera e attiva dell'acido abscissico. L'ABA liberato può così essere trasportato all'interno delle cellule e svolgere la sua funzione di segnale coinvolto nell'adattamento della pianta allo stress (Dietz *et al.*, 2000).

1.2.5 Stress da basse temperature: via ABA-dipendente

L'acido abscissico (ABA) gioca un ruolo cruciale nell'adattamento delle piante a differenti stress ambientali e in diversi processi fisiologici come la maturazione e la dormienza del seme, lo sviluppo del frutto o la senescenza (Zeevaart *et al.*, 1988). Per tale motivo, segnali ambientali e di sviluppo potrebbero operare nella regolazione della biosintesi dell'ABA nei tessuti della pianta. L'espressione di geni indotti da siccità e stress da freddo in *Arabidopsis* è stata analizzata mediante tecniche di Northern blot e PCR (Fowler S. *et al.*, 2002; Kreps J.A. *et al.*, 2002; Seki M. *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2005). Attraverso questi studi sono stati identificati più di 300 geni indotti da stress. I risultati confermano che il 10% dei geni indotti da siccità

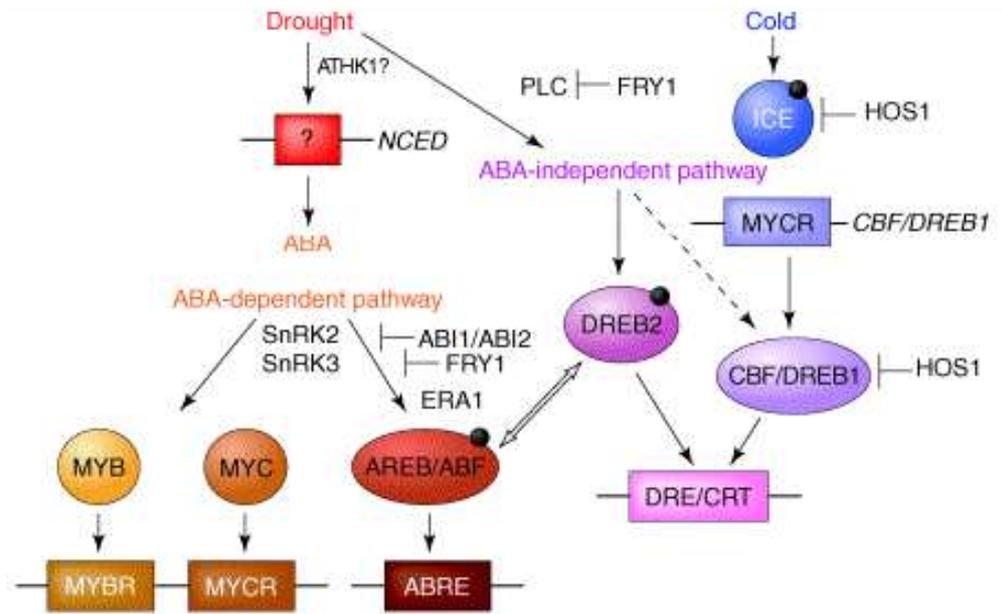
sono indotti anche da basse temperature (Seki *et al.*, 2002), indicando quindi l'esistenza di due vie parallele coinvolte nella risposta a stress abiotici. Nello specifico, il gene RD29A/COR78 è indotto sia da siccità e freddo che dall'ABA, questo indica che è governato in condizioni di stress sia da una via ABA-indipendente che da una via ABA-dipendente (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992). Infatti, il gene RD29A contiene nella sua zona promotore sia *cis*-elementi presenti nei geni della via ABA-indipendente (DRE/CRT) che una sequenza conservata *cis*-attiva chiamata ABRE (ACGTGGC) maggiormente presente nei geni *ABA-responsive*. Questa sequenza fu prima identificata nel gene *Em* dei semi del grano, nel quale si esprime principalmente durante la fase post-embriogenesi (Guiltinan *et al.*, 1990) e nel gene *RABI6* del riso dove è espressa sia nei tessuti vegetali disidratati che nei semi maturi (Mundy *et al.*, 1990). Diversi geni indotti da stress abiotici contengono una simile sequenza conservata *cis*-attiva chiamata G-box (CACGTGGC) (Menkens *et al.*, 1995). Per la trascrizione di geni *ABA-responsive* non è però sufficiente una sola copia di ABRE, ma la formazione di un complesso tra ABRE ed elementi di attacco come CE1 e CE3 DRE/CRT. Un nuovo fattore di trascrizione coinvolto nella risposta da freddo ABA-dipendenti è stato isolato nella soia ed è detto SCOF-1 (*soybean zinc finger protein*). SCOF-1 è una proteina "zinc finger" localizzata nel nucleo che non riesce a legarsi direttamente agli elementi DRE/CRT o ABRE. Studi effettuati su 2 ibridi del lievito rivelano che SCOF-1 interagisce fortemente con SGBF-1 (*soybean G-box binding bZip transcriptional factor*) e *in vitro* favorisce molto il legame tra quest'ultimo e gli elementi ABRE, agendo da transattivatore. Questi studi supportano l'idea che l'interazione proteina-proteina sia essenziale per l'attivazione di geni di risposta al freddo mediati dall'ABRE (Kim *et al.*, 2001). Sono stati isolati degli ulteriori fattori di trascrizione bZip (*leucine zipper*) chiamati ABF/AREB che possono legare specificatamente elementi ABRE e attivare l'espressione dei geni indotti da stress (Uno *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2000). Questi geni AREB (AREB1 e AREB2) sono ABA-dipendenti in quanto

necessitano dell'ABA per la loro piena attivazione ed esibiscono una ridotta attività in mutanti *ABA-deficient* come *aba2* così come in mutanti *ABA-insensitive* come *aba1-1*. Infine, fattori di trascrizione come MYC/MYB, indotti da siccità, potrebbero legare rispettivamente elementi MYCRS/MYBRS e cooperare nell'attivazione del gene RD22 (Abe *et al.*, 1997). In definitiva, le zone promoter dei geni indotti da stress hanno tipici elementi *cis-regulatory* come DRE/CRT, ABRE, MYCRS/MYBRS e sono regolati da vari fattori di trascrizione a monte (fig. 15).

1.2.6 Stress da basse temperature: via ABA-indipendente

Nella via ABA-indipendente l'induzione di molti geni *cold-responsive* (COR) è mediata da fattori di trascrizione come le proteine CBF/DREB (C-repeat binding factor/dehydration-response elements-binding protein) (Stockinger *et al.*, 1997). I fattori di trascrizione CBF/DREB appartengono a una piccola famiglia AP2/EREBP costituita da tre sottogruppi (Haake *et al.*, 2002; Gilmour *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999; Shinwari *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Dei tre, il gruppo CBF/DREB1, cui appartengono CBF1/DREB1B, CBF2/DREB1C, CBF3/DREB1A è specificatamente indotto dal freddo. Il gruppo CBF/DREB2, cui appartengono DREB2A e DREB2B, è indotto invece dalla siccità, dal cloruro di sodio e dall'acido abscissico (Liu *et al.*, 1998). L'analisi del gene cold-responsive RD29A/COR78 ha portato alla scoperta di una sequenza conservata di 9 bp (TACCGACAT) chiamata DRE che rappresenta un *cis*-elemento essenziale per la regolazione dell'induzione del gene. La sequenza DRE, inoltre, è stata trovata nelle regioni promoter di altri geni indotti dalle condizioni di stress da freddo e da siccità (Shinozaki *et al.*, 2000; Thomashow, 1999). Simili *cis*-elementi, chiamati C-repeat (CRT) ed elementi di risposta alle basse temperature (LTRE), contenendo il centro della sequenza DRE (A/GCCGAC), sono coinvolti nella regolazione di geni indotti dal freddo

(Bacher *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1996; Stockinger *et al.*, 1997; Thomashow, 1999). Le CBF/DREB1 e DREB2 si legano entrambe alla sequenza DRE/CRT e attivano la trascrizione di geni. Il fattore CBF3/DREB2A necessita, invece, di essere modificato dalla proteina SFR6 prima di attivare la trascrizione di RD29A/COR78 (Liu *et al.*, 1998). Studi effettuati sul fenotipo di mutanti *sfr6* (sensibili al congelamento) suggeriscono che la proteina SFR6, coinvolta in questo processo di modificazione, sia anche coinvolta nel conseguente aumento della sintesi di geni COR (cold regulated) (Knight *et al.* 1999). Ciò dimostra che, essendo entrambi i fattori di trascrizione coinvolti nell'induzione dei geni COR (cold regulated), le due vie di trascrizione ABA-indipendenti indotte sia da stress da freddo che da disidratazione convergono (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1994) (fig. 15). Infine l'induzione della famiglia delle CBF ha suggerito la ricerca di un vicino trasduttore di segnale che le attivasse, portando alla scoperta di un fattore chiamato ICE (inducer of CBF expression) (Gilmour *et al.*, 1998). L'attivatore ICE1 codifica per un fattore di trascrizione che riconosce specificatamente sequenze MYC sul promotore CBF3. Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2001) hanno inoltre analizzato geneticamente il locus HOS1 (alta espressione di geni in risposta all'osmosi) di *Arabidopsis* e hanno dimostrato che la mutazione *hos1* intensifica e induce maggiormente le CBF2, le CBF3 ed i loro geni "target" durante lo stress da congelamento. Dunque, ciò ha portato ad identificare HOS1 come un regolatore negativo dell'attivazione dei geni COR, attraverso la modulazione del livello di espressione delle CBF (Chinnusamy *et al.*, 2003). Tuttavia, recenti studi di microarray hanno confermato che non tutti i geni di espressione regolati dal freddo sono sotto il diretto controllo della famiglia delle CBF/DREB (Fowler *et al.*, 2002; Kreps *et al.*, 2002) e l'identificazione di altri fattori di trascrizione indotti da freddo tra cui RAV1 e ZAT12 indipendenti dalle CBF indica la presenza di una via di segnalazione parallela o indipendente dalle vie mediate dalle CBF (Fowler *et al.*, 2002).



Current Opinion in Plant Biology

Figura 15 - Regolazione dell'espressione genica alla siccità e al freddo. Gli elementi cis che sono coinvolti nella risposta sono segnati nei box. Mentre i fattori di trascrizione sono nei cerchi o negli ovali. I piccoli cerchi neri indicano la necessità della fosforilazione come modificazione ai TF in risposta allo stress. La parte superiore della figura indica la cascata del segnale che viene attivata in maniera rapida e veloce subito dopo lo stress (ICE, DREB2, NCED), mentre nella parte sottostante i fattori che rispondono in maniera più lenta e che probabilmente sono coinvolti una fase più lenta e adattativa della risposta allo stress (AREB/ABF, MYB, MYC, CBF-BREB). Tratta da Shinozaki et al (2003)

Lo stress da freddo, salinità e siccità indebolisce l'equilibrio osmotico cellulare ed è chiaro che questi fattori di trascrizione così come i geni indotti da stress possono collaborare per aiutare la pianta a risanare la sua normale fisiologia.

1.3 LE ARANCE

L'arancio [(*Citrus sinensis* L. Osbeck)] è un albero da frutto appartenente al genere *Citrus* (famiglia Rutaceae), il cui frutto è detto arancia. È un antico ibrido, probabilmente tra il pomelo ed il mandarino, ma da secoli cresce come specie autonoma e si propaga per innesto e talea.

Regno: *Plantae*
Divisione: *Magnoliophyta*
Classe: *Magnoliopsida*
Sottoclasse: *Rosidae*
Ordine: *Sapindales*
Famiglia: *Rutaceae*
Genere: *Citrus*
Specie: *C. sinensis*



Figura 16- Classificazione botanica dell'arancia; particolare di arancia con fiore di zagara

La sua patria è la Cina (come testimoniano alcuni documenti scritti fra il 1200 e il 1400 d.C.) e sembra che sia stato importato in Europa appena nel secolo XIV dai marinai portoghesi.

1.3.1 Componenti principali del frutto

Il frutto, botanicamente un esperidio sferoidale, è costituito dalle seguenti parti fondamentali: il pericarpo, che comprende: il flavedo (parte esterna colorata della buccia), l'albedo (parte bianca interna della buccia): e la polpa, o endocarpo, suddivisa in spicchi e vescicole contenenti il succo ed i semi (fig. 17). I semi possono essere da 5 a 12 oppure mancare (frutti apireni) nelle cultivar più selezionate. Il flavedo è costituito principalmente da materiale cellulosico e contiene altri componenti quali:

- Oli essenziali: Terpeni, sesquiterpeni alifatici e derivati ossigenati, Terpeni e sesquiterpeni biciclici, Composti alifatici non terpenici, Idrocarburi aromatici, Esteri contenenti azoto.
- Costituenti del residuo non volatile dell'olio essenziale: Cere paraffiniche, Steroidi e triterpenoidi, Acidi grassi, Cumarine, psoraleni e flavoni.
- Componenti accessori: Pigmenti (carotenoidi, clorofille, flavonoidi), Principi amari (limonina), Enzimi (ossido reduttasi, proteasi, acetil-esterasi, fosfatasi).

L'albedo risulta anch'esso costituito principalmente da materiale cellulosico oltre che da:

- Sostanze pectiche: Pectina, Protopectina, Acido peptico, Acidi pectinici.
- Componenti accessori: Principi amari (limonina), Enzimi (ossido reduttasi, proteasi, acetil-esterasi, fosfatasi).

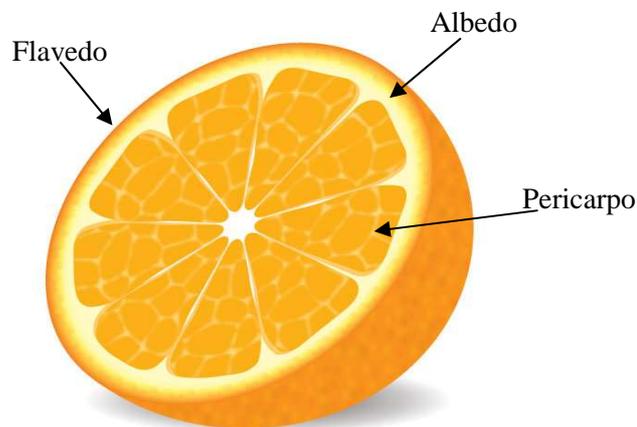


Figura 17- Le varie parti dell'arancia

La struttura della polpa risulta costituita da materiale cellulosico. Secondo il colore della polpa si distinguono cultivar bionde o sanguigne (quest'ultime, contrariamente alla norma, hanno polpa per nulla acida). Tra le cultivar

maggiormente commercializzate per le arance bionde si distinguono: Biondo comune, Navel, Washington Navel, Valencia late e Ovale-calabrese; mentre per le arance pigmentate: Moro, Sanguinello e Tarocco.

1.3.2 Origini e produzione di arance rosse siciliane

La produzione di arance a polpa rossa è tipica della parte della Sicilia orientale circostante l'Etna. In questa zona alcune varietà pigmentate del *Citrus Sinensis* (var. Moro, Tarocco e Sanguinello) hanno trovato le condizioni ambientali idonee per esprimere al meglio le loro caratteristiche genotipiche. Nonostante sia difficile ricostruire un dettagliato percorso mediante il quale gli agrumi, e quindi le arance rosse, siano pervenute in Sicilia, è possibile comunque delineare le principali tappe della diffusione degli agrumi dell'isola (Maccarone, 1997). Un mosaico della villa del Casale di Piazza Armerina testimonia, ad esempio, che nel periodo tardo-imperiale romano erano già presenti in Sicilia il cedro ed il limone. L'arancio amaro è stato introdotto in Sicilia dagli arabi nel corso del VII secolo e probabilmente fino al XVI secolo furono coltivate soltanto arance bionde e soprattutto per scopo ornamentale: per questo motivo ancora oggi le coltivazioni di agrumi sono chiamate dai siciliani "giardini". È soltanto nel XVII secolo che troviamo la prima descrizione dell'arancia rossa da parte del gesuita Ferrari nell'opera *Hesperides* (1646). L'autore descriveva per la prima volta un frutto di una varietà particolare di arance, *Aurantium indicum*, dalla polpa pigmentata (*purpurei coloris medulla*), portato in Sicilia da un missionario genovese di ritorno dalle Filippine. In ogni modo è soltanto agli inizi del XIX secolo che la produzione di arance rosse in Sicilia assume rilevanza primaria per l'agricoltura siciliana, produzione che viene aiutata dai fattori climatici intrinseci della zona quali temperature rigide di notte e un'esposizione a luce molto intensa di giorno. Nella nostra area,

inoltre, l'abbondante dose di insolazione permette la formazione di alti livelli di zucchero nei frutti, fondamentali per la formazione del sapore.

1.3.3 Proprietà salutistiche delle arance

Gli agrumi sono frutti di notevole interesse per le loro qualità organolettiche, le proprietà nutritive e terapeutiche. I principali composti chimici sono rappresentati da zuccheri semplici (saccarosio, glucosio e fruttosio), ossiacidi (citrico, malico, isocitrico e chinico) e sali minerali, prevalentemente di potassio. Sono inoltre presenti, in piccole quantità, gli α -amminoacidi liberi, tra i quali prevalgono la prolina, l'arginina e l'asparagina, diversi derivati degli acidi idrossicinnamici, specialmente del ferulico e del cumarico, l'esperidina, triacilgliceroli e fosfolipidi derivati principalmente dagli acidi insaturi linoleico e vaccenico e le vitamine A, B1, B2, C e PP. I semi sono costituiti da materiale celluloso con presenza di oli essenziali e proteine. La caratteristica nutrizionale delle arance, così come per gli altri agrumi, è la vitamina C, importantissima per il potenziamento delle difese immunitarie contro virus e batteri o agenti chimici. Tale vitamina impedisce che nitriti e nitrati assunti nell'alimentazione si trasformino in nitrosammine, composti cancerogeni. Questa vitamina entra in gioco anche in altre complesse funzioni biologiche dell'organismo umano: assicura una guardia attiva e continua contro i radicali liberi, influenza il metabolismo dei carboidrati e degli acidi grassi, favorisce l'assorbimento intestinale del ferro, minerale indispensabile per la formazione dei globuli rossi del sangue, stimola una migliore permeabilità della parete dei capillari, combattendone la fragilità. Infine, interviene nel processo di deposizione del calcio e di fosforo nelle ossa e nei denti. Accanto alla vitamina C, nelle arance sono presenti discrete quantità di vitamina A, modeste di vitamina B1 e B2 e i flavonoidi, pigmenti vegetali responsabili delle sfumature giallo-rosso della polpa. I flavonoidi sono chiamati vitamina C2. L'azione concomitante delle vitamine C e C2 esercita

un intervento rigeneratore sul collagene: tessuto di sostegno della cute, il cui cedimento può portare alla formazione di pieghe, rughe, smagliature ed inestetismi vari. La presenza degli acidi precedentemente citati, inoltre, non ha azione acida, ma, al contrario, avviando una serie di reazioni chimiche contribuisce a neutralizzare varie sostanze tossiche, come l'acetone nei bambini, e a ridurre l'acidità nelle urine. Condizione questa essenziale per impedire la formazione di calcoli renali a base di acido urico, come può avvenire nella gotta. L'arancia contiene discrete quantità di calcio, selenio, potassio e magnesio, in oltre modeste quantità di fosforo, ferro e sodio, completano la famiglia dei minerali delle arance. Dall'arancia si ricavano varie essenze: l'essenza od olio essenziale di arancia si ottiene per spremitura delle bucce, che la contengono abbondantemente in sacche oleifere sottocutanee. Il colore rosso delle arance pigmentate è dovuto alla presenza di pigmenti idrosolubili appartenenti alla classe dei flavonoidi chiamati antocianine. Il componente quantitativamente più rappresentato è la cianidina 3-O-glucoside ed un secondo componente, presente in tracce, è la delphinidina 3-O-glucoside (Rimari *et al.*, 1998). L'interesse rivolto verso i prodotti alimentari contenenti antocianine, e in particolare nei confronti delle arance rosse, è legato ai loro molteplici effetti terapeutici per la salute umana, e ad un loro possibile impiego come fonte di coloranti naturali per i cibi (Ross. *et al.*, 2002). Le antocianine sono coinvolte in natura in vari processi fisiologici: la pigmentazione di varie parti delle piante, per attrarre gli impollinatori e gli insetti deputati alla dispersione dei semi, la protezione della pianta dall'eccesso di irradiazione solare e la difesa della pianta dai microrganismi patogeni (Field *et al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2001). Le antocianine esercitano un ruolo ancora molto importante per le loro proprietà farmacologiche e antiossidanti. Esplicano attività farmacologica sulla fragilità capillare (proprietà epitelio-riparatrice) e sulla retina. Trovano impiego nella terapia oculistica, nella cura dell'ulcera, in angiologia per le proprietà epitelio-protettrici e modulatrici della resistenza e della permeabilità capillare e in tutte quelle condizioni fisiopatologiche

caratterizzate da un eccesso di produzione di radicali liberi. La capacità antiossidante delle antocianine è stata ampiamente studiata. Grace *et al.* (Grace *et al.*, 1996), nei loro studi, notarono che i livelli di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi cambiavano in relazione alla produzione fotoindotta di antocianine in *Mahonia repens*. Anche l'esposizione ad un potente agente ossidante come l'ozono fu dimostrato che induceva le antocianine (Foot *et al.*, 1996) suggerendo una loro funzione antiossidante. Probabilmente però le scoperte più convincenti arrivarono da Tsuda *et al.* (Tsuda *et al.*, 1994; Tsuda *et al.*, 1996) che nei loro lavori su sistemi di liposomi, microsomi e di membrana notarono che l'introduzione di antocianine spazzava via i radicali di O₂ e inibiva la perossidazione dei lipidi. Quindi, le antocianine, non solo conferiscono alle nostre arance una particolare colorazione, ma aumentano sensibilmente il loro valore biologico per via della loro capacità di bloccare i famigerati radicali liberi. Numerosi lavori scientifici dimostrano l'attività antiossidante ed antiradicalica dei componenti presenti nelle arance rosse di Sicilia. La cianidina-3-O-glucoside rappresenta circa il 97% delle antocianine presenti nelle arance rosse, a differenza delle altre fonti di antociani (sambuco, mirtillo, etc.) la cui composizione antocianosidica è molto variegata (presenza di differenti antocianine). L'attività antiossidante e radical scavenging della cianidina-3-O-glucoside è stata ampiamente evidenziata in diversi modelli sperimentali (Tsuda *et al.*, 1994; Amorini *et al.*, 2001). La cianidina-3-O-glucoside, oltre ad essere maggiormente rappresentata nelle arance pigmentate, è molto più attiva della vitamina C nel disattivare le specie radicali che ossigenate (fig. 18); la capacità antiossidante è legata alla sua struttura e in particolare alla facilità con la quale l'atomo di idrogeno del gruppo -OH, legato all'anello aromatico, può essere donato ad un radicale libero con successiva delocalizzazione dell'elettrone spaiato (Wang H *et al.*, 1997); inoltre la cianidina-3-O-glucoside risulta, tra le antocianine più diffuse nei frutti, quella dotata di maggiore attività antiossidante (Amorini *et al.*, 2001).

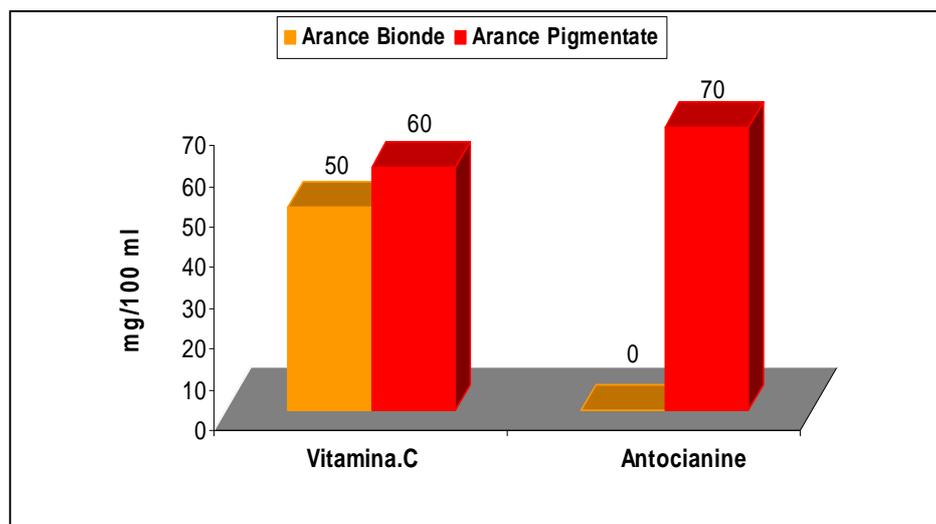


Figura 18: Contenuto medio di vit C e antocianine nei succhi di arance pigmentate e bionde (Maccarrone, 1997).

1.4 I FLAVONOIDI E LE ANTOCIANINE

1.4.1 La struttura chimica dei flavonoidi

Le antocianine sono dei pigmenti solubili in acqua, appartenenti alla vasta famiglia dei composti flavonoidi. A loro volta, quest'ultimi, rappresentano una sottoclasse della più ampia famiglia dei polifenoli. I flavonoidi sono presenti nella maggior parte dei vegetali terrestri vegetali (Manach *et al.*, 2004), impartendo loro la colorazione tipica della specie in questione. In particolare contribuiscono alla colorazione dei fiori, dei frutti e di molte altre parti vegetali dipingendole con varie tonalità: dal blu al porpora, dal rosso al cremisi, dall'arancio al giallo (che rende ragione del loro nome: dal latino *flavus*, giallo) e persino l'incolore. Questa immensa famiglia di composti organici svolge una miriade di funzioni tutte fondamentali per la sopravvivenza della pianta: proteggono la pianta dalle radiazioni UV, la difendono dai microrganismi patogeni, fungono da molecole segnale nelle interazioni pianta-microrganismo, contribuiscono alla fertilità della pianta e alla germinazione del polline, svolgono una fondamentale funzione

nell'attrazione degli impollinatori e degli insetti coinvolti nella dispersione dei semi. Ciò che rende universalmente così ampia e varia la famiglia dei flavonoidi è la radice chimica comune a tutti, ovvero il nucleo flavanico (fig. 19). Esso è costituito da due anelli benzenici a sei atomi di carbonio interconnessi da un terzo anello piranico in cui è contenuto un atomo di ossigeno. In base alle modificazioni chimiche apportate all'anello piranico da parte di particolari enzimi, i flavonoidi possono essere suddivisi in differenti classi strutturali come: flavoni, isoflavoni, flavanoni, flavanoli, e antocianine (Ross *et al.*, 2002); (fig. 20).

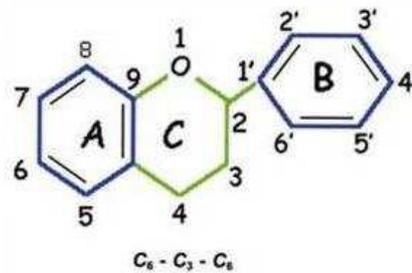


Figura 19- Nucleo flavanico

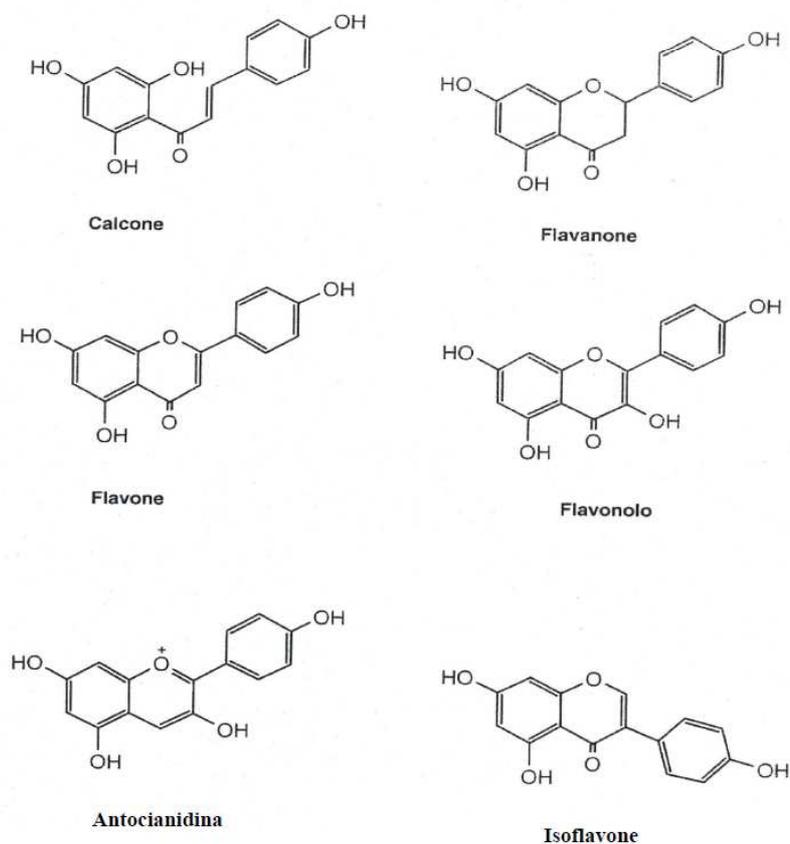


Figura 20 – Classi dei flavonoidi

Le antocianidine (es. cianidina e malvidina) sono i pigmenti idrosolubili responsabili del colore rosso, blu e violetto di fiori e frutta e si ritrovano principalmente nei frutti di bosco, nelle melanzane e nel vino rosso; i flavonoli (es. quercitina e quercitolo), si ritrovano nella cipolla, nei broccoli, nei porri, in numerosi frutti e bevande ottenute a partire dai vegetali in particolare il tè e il vino rosso. I flavanoli (catechine) sono contenuti in alimenti come la cioccolata, il vino rosso e il tè verde. I flavoni, categoria a cui appartengono la luteolina e la diosmetina, sono particolarmente abbondanti nel prezzemolo e nel sedano (Manach *et al.*, 2004).

1.4.2 La struttura chimica delle antocianine

Le antocianine (dal Greco *antos*, fiore, e *kyanos*, blu), metaboliti secondari e flavonoidi, sono dei pigmenti naturali idrosolubili, di colore rosso, porpora e blu, presenti soprattutto nelle cellule epidermiche della pianta, a livello dei vacuoli, in cui risiedono e colorano i tessuti (Rimari *et al.*, 1998). Nell'ambito dei frutti le antocianine sono espresse esclusivamente nell'arancio rosso e nei suoi ibridi e soprattutto nella polpa e nella buccia. Le antocianine sono chimicamente dei glicosidi, cioè dei composti costituiti da uno zucchero e da una parte non zuccherina detta aglicone, uniti da un legame glicosidico e derivano costituzionalmente dalla base del 2-fenilbenzopirosonio o flavilio nel quale l'ossigeno ne origina le proprietà basiche, essendo capace di combinarsi con gli acidi dando sali di ossonio. Tuttavia, il legame, e quindi la carica positiva, non è localizzata, per cui la formula della base di flavilio viene rappresentata con strutture di risonanza dove la carica può ipotizzarsi su un sostituente con la formazione di strutture chinoidi. Le glicosilazioni possono avvenire, con uno o più zuccheri, in posizione 3, 5, 7, 3', 4' e 5' (fig. 21).

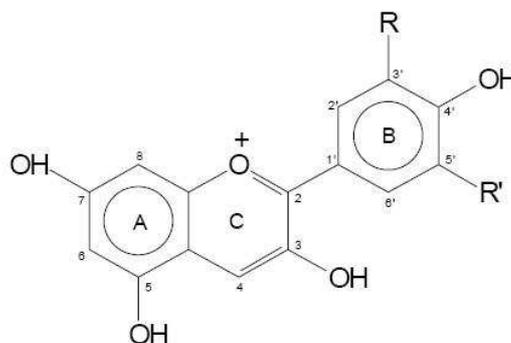


Figura 21 - 3,5,7,4'-tetraidrossi-2-fenil-benzopirilio
(Catione di flavilio)

<i>ANTOCIANIDINE</i>	<i>R</i>	<i>R'</i>
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Tabella 1 - *Le più comuni antocianidine*

I glucidi nei monoglucosidi sono generalmente legati in posizione 3, mentre nei diglucosidi sono legati in posizione 3 e 5. Gli zuccheri che comunemente costituiscono le antocianine sono glucosio, ramnosio, xilosio, galattosio, arabinosio, fruttosio e il disaccaride genziobiosio. Spesso la porzione glicosidica delle antocianine è acilata in una o più posizioni con derivati dell'acido cinammico. L'acilazione dei glucosidi svolge un ruolo importante nella stabilità delle antocianine. Le antocianidine sono, infatti, instabili in soluzioni acquose e meno solubili delle antocianine. La metossilazione avviene al C-3' e C-5'. Almeno una delle tre posizioni 5, 7, 4' dei gruppi ossidrilici interessati nelle glicosilazioni o metossilazioni deve sempre essere lasciata libera per la formazione della base chinoidale. Gli antociani presentano una variazione del colore in funzione del pH (fig. 22), in quanto possiedono gruppi ossidrilici fenolici acidi e nuclei ossigenati basici. Infatti, il gruppo antocianidinico in ambiente nettamente acido è rosso, mentre in mezzo debolmente acido scolora a causa della formazione di una pseudobase incolore.

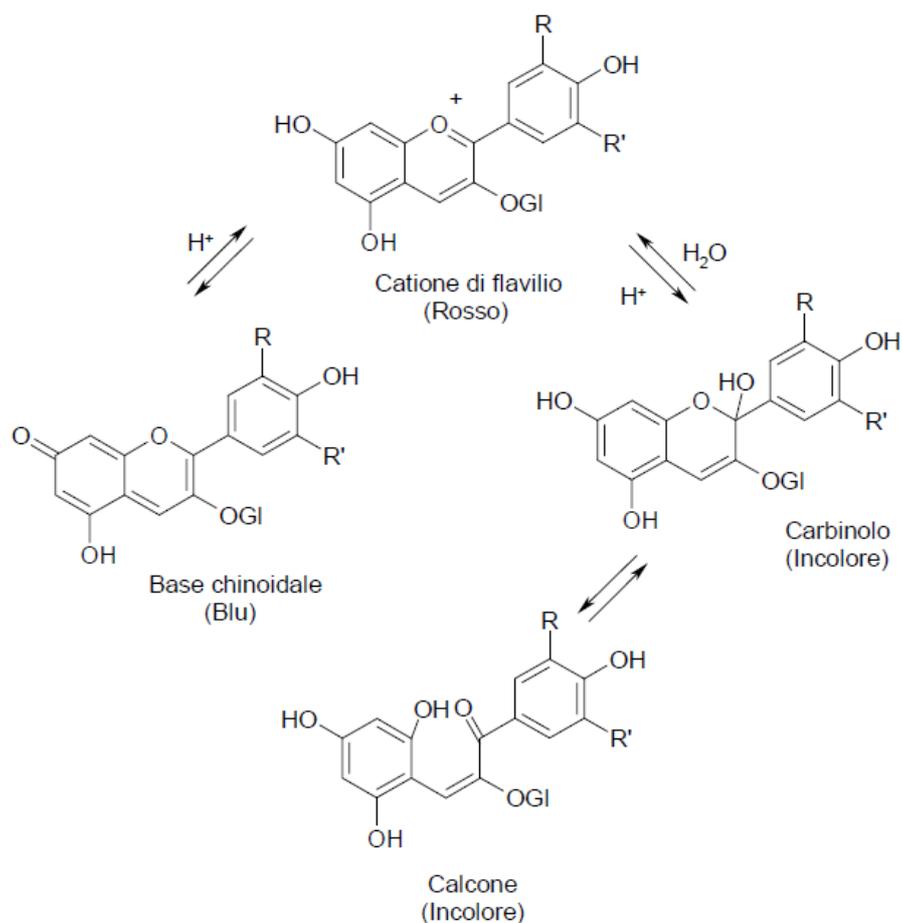


Figura 22 – Forme di equilibrio delle antocianine in soluzione acquosa.

Il forte potere colorante e l'assenza di tossicità fanno di questi eterosidi dei coloranti naturali per uso alimentare (E163) in grado di rimpiazzare i coloranti sintetici utilizzati nelle bevande, nelle marmellate e nei dolci, anche se una certa instabilità ne limita un'applicazione generale. Il colore rosso dei succhi di alcune varietà di arance è dovuto alla presenza di antocianine derivate principalmente dalla cianidina. Il cianidin-3-glucoside e il cianidin-3-(6-malonil)- β -glucoside (Maccarone *et al.*, 1998) sono i due pigmenti dominanti (fig. 23).

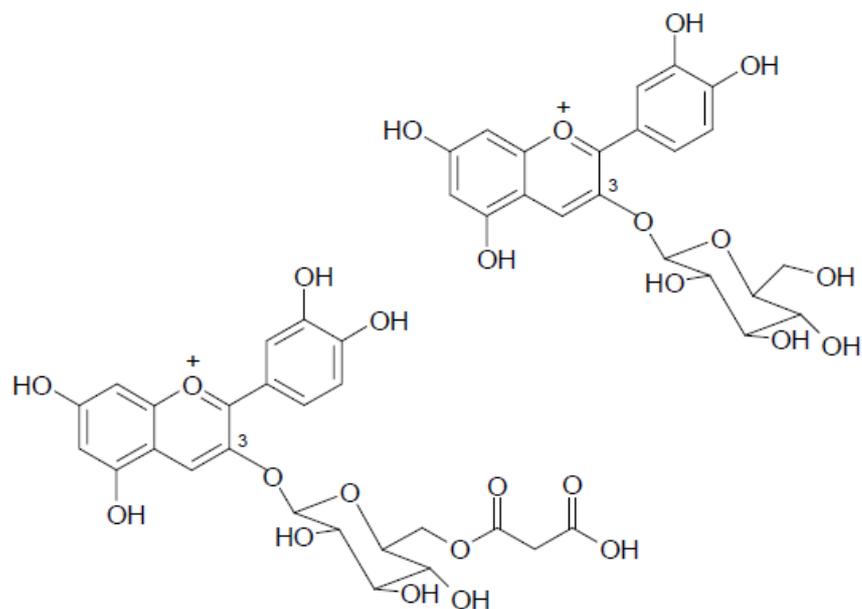


Figura 23 – *Cianidin-3- β -glucoside* e *Cianidin-3-(6''-malonil)- β -glucoside*

1.4.3 La biosintesi dei flavonoidi e delle antocianine

La biosintesi dei flavonoidi ha luogo nel citosol. Le proteine principali del pathway sono organizzate in complessi multienzimatici accentrati attorno a monossigenasi CytP450-dipendenti, sul lato del reticolo endoplasmatico a contatto con il citosol. Analisi biochimiche hanno indicato che i flavonoidi sono presenti anche nel nucleo, suggerendo un loro ruolo regolatore. Molti degli enzimi coinvolti nella biosintesi dei flavonoidi sono codificati da piccole famiglie geniche. Tali enzimi sono classificabili in due gruppi, ovvero enzimi che catalizzano reazioni del metabolismo fenilpropanico generale ed enzimi che catalizzano le reazioni che portano alle differenti classi di flavonoidi (Winkel-Shirley, 2002; Moore *et al.*, 2002). Tutti i flavonoidi possiedono uno scheletro base C6-C3-C6 composto da una unità C6 (anello A) e da una unità C6-C3 (anello B ed atomi di carbonio 2, 3 e 4). Gli atomi di carbonio all'interno dello scheletro base vengono originati da due distinti pathways. L'anello B con gli atomi di carbonio 2, 3 e 4, viene

fornito da un derivato dell'acido cinnamico, mentre l'anello A è il risultato della condensazione testa-coda di 3 unità acetato. I precursori dei flavonoidi derivano entrambi dalla biosintesi degli acidi grassi: il malonil-CoA si forma a partire da acetil-CoA e CO₂, una reazione catalizzata dall'enzima acetil-CoA carbossilasi (ACC); il p-cumaroil-CoA e gli analoghi esteri idrossicinnamici del CoA vengono forniti dal metabolismo fenilpropanoidico. Per ottenere un fenilpropano a partire da una molecola di fenilalanina occorre che avvenga una condensazione tra una molecola di fenilalanina e 4 molecole di coenzima-A (1 molecola di cumaroil coenzima-A e 3 molecole di malonil coenzima-A). Perché tale processo sia possibile è necessario che dapprima avvenga una reazione di deaminazione, catalizzata dalla fenilalanina ammino liasi (PAL) a carico della fenilalanina. Nella prima parte della biosintesi, la fenilalanina, è convertita in 4-cumaroilCoA. Questo composto può essere impiegato, attraverso vie metaboliche collaterali, nella produzione di lignine, cumarine e stilbene. Il cumaroil-CoA può, nella seconda parte del suo metabolismo, entrare nella cosiddetta via metabolica di biosintesi dei composti flavonoidi, un ampissimo gruppo di sostanze tra le quali si annoverano gli auronidi, i flavoni, gli isoflavonoidi, le protoantocianidine e le antocianine. L'enzima chiave della via biosintetica che conduce ad acido p-cumarico, è la *Fenilalanina-ammonio-liasi (PAL)*; essa catalizza la deaminazione della L-fenilalanina con conseguente formazione di quantità equimolari di acido trans-cinnamico e ione ammonio, il quale fornisce un legame tra metabolismo primario e metabolismo secondario. Lo ione ammonio generato dalla *PAL* viene incorporato in glutammina, attraverso la reazione catalizzata dalla glutammina sintetasi (*GS*) e, successivamente, in glutammato tramite la glutammina 2-ossiglutarato amminotrasferasi (*GOGAT*). Il glutammato così formato funge da donatore di azoto nella biosintesi degli amminoacidi aromatici, in particolare viene utilizzato nella formazione di arogenato, ed in seguito trasformato in fenilalanina e tirosina, viene reimmesso nel metabolismo dei composti flavonoidi. Il prodotto della deaminazione della fenilalanina,

l'acido trans-cinnamico, viene successivamente convertito in acido 4-idrossicinnamico sotto l'azione catalitica dell'acido cinnamico 4-idrossilasi (*CA4H*), un'ossidasi che richiede ossigeno molecolare ed NADPH come cofattori. L'acido p-cumarico, a sua volta, viene convertito nel suo corrispondente derivato attivato, il p-cumaroil-coenzima A tioestere, ad opera di una idrossicinnamato CoA ligasi (*4CL*), un enzima con una pronunciata specificità nei confronti dei derivati dell'acido cinnamico caratterizzati dalla presenza di un gruppo -OH libero sull'anello benzenico ed il quale richiede ATP e CoASH come cofattori. Dalle reazioni che conducono alla sintesi di acido trans-idrossicinnammico, ad acido cumarico e alla sua forma attiva Cumaroil-CoA, si dipartono vie metaboliche collaterali che conducono alla sintesi di cumarina e dei precursori della lignina. L'enzima che, invece, è specificatamente coinvolto nella biosintesi dei flavonoidi e quindi delle antocianine, è la *Calcone Sintasi (CHS)*. Esso rappresenta, infatti, il primo enzima specifico della via biosintetica delle antocianine (fig. 24), e catalizza la graduale condensazione di tre molecole di malonil-CoA con una molecola di p-cumaroil-CoA per formare un calcone. La neo-formata molecola di naringenina viene rapidamente isomerizzata dalla *Calcone Isomerasi (CHI)* al rispettivo flavanone, evitando l'accumulo di calconi nella pianta. In seguito la *Flavanone 3-idrossilasi (F3H)* catalizza la reazione di idrossilazione in posizione C-3 dei flavanoni a diidroflavonoli. Anche in questo caso una mutazione che porta alla perdita dell'attività di tale enzima blocca il proseguimento della biosintesi delle antocianine. Il diidroflavonolo diidrokampferolo (DHK), prodotto dall'idrossilazione della naringenina catalizzata dall'enzima F3H, può essere ulteriormente idrossilato o solamente in posizione 3', o contemporaneamente in posizione 3' e 5' dell'anello B. La prima reazione catalizzata dall'enzima Flavonoide 3'-idrossilasi (F3'H), porta alla creazione della diidroquercetina (DHQ) e infine alla formazione dei pigmenti con la struttura base della cianidina, mentre la seconda reazione è catalizzata dall'enzima Flavonoide 3'5'-idrossilasi (F3'5'H), responsabile

della conversione del DHK mediante idrossilazione alle posizioni 3' e 5'. L'enzima che catalizza la successiva riduzione stereospecifica dei diidroflavonoli in leucoantocianidine (flavan-3,4-dioli), utilizzando NADPH come cofattore, prende il nome di Diidroflavonol 4-reduttasi (DFR). Sono proprio le leucoantocianidine a rappresentare i precursori immediati per la sintesi delle antocianine. Questi composti sono anche precursori delle catechine e delle pro-antocianidine, le quali, sono coinvolte nei meccanismi di resistenza delle piante. Le leucoantocianidine vengono poi convertite in antocianidine dalla Antocianidina Sintasi (ANS), enzima che mostra una grande omologia con gli enzimi F3H e FLS (flavonolo sintasi). L'enzima UDP:Glucosio Flavonoide 3-O-Glucosil Transferasi (UFGT o 3GT), è responsabile del trasferimento di una molecola di glucosio dall'UDP glucosio, verso il gruppo -OH in posizione 3 dell'antocianidina. Dato che questo step è fondamentale affinché le antocianine, così stabilizzate, possano accumularsi come pigmenti all'interno dei vacuoli, l'UFGT è considerato un enzima indispensabile della via biosintetica che conduce alle antocianine. Gli enzimi della via dei fenilpropanoidi funzionano probabilmente come complessi multienzimatici che facilitano il diretto trasferimento e la canalizzazione degli intermedi tra i diversi siti attivi. Si verifica quindi una competizione fra i vari branch points all'interno di queste vie, gli intermedi sono altamente reattivi e potenzialmente tossici e le massime concentrazioni di questi intermedi sono molto basse. Questa organizzazione è legata alla necessità per queste vie metaboliche di rispondere velocemente ai segnali esterni ed interni per cambiare le quantità e i tipi di prodotti finali che devono essere sintetizzati. Gli enzimi PAL, CHI e UFGT sono localizzati nel citosol e sono debolmente associati con il lato citoplasmatico del reticolo endoplasmatico. Recenti esperimenti sembrano indicare che ci sia una diretta associazione tra gli enzimi CHS, CHI, F3H e DFR, e che alcuni degli enzimi funzionerebbero da ancoraggio sulle membrane per gli altri enzimi. La destinazione finale delle antocianine è il vacuolo o la parete cellulare; il trasporto di questi metaboliti richiede la

presenza della glutatione-S-transferasi (GST) e di una pompa ATPasica appartenente alla famiglia dei trasportatori (ABC transporter) (Winkel-Shirley, 2001).

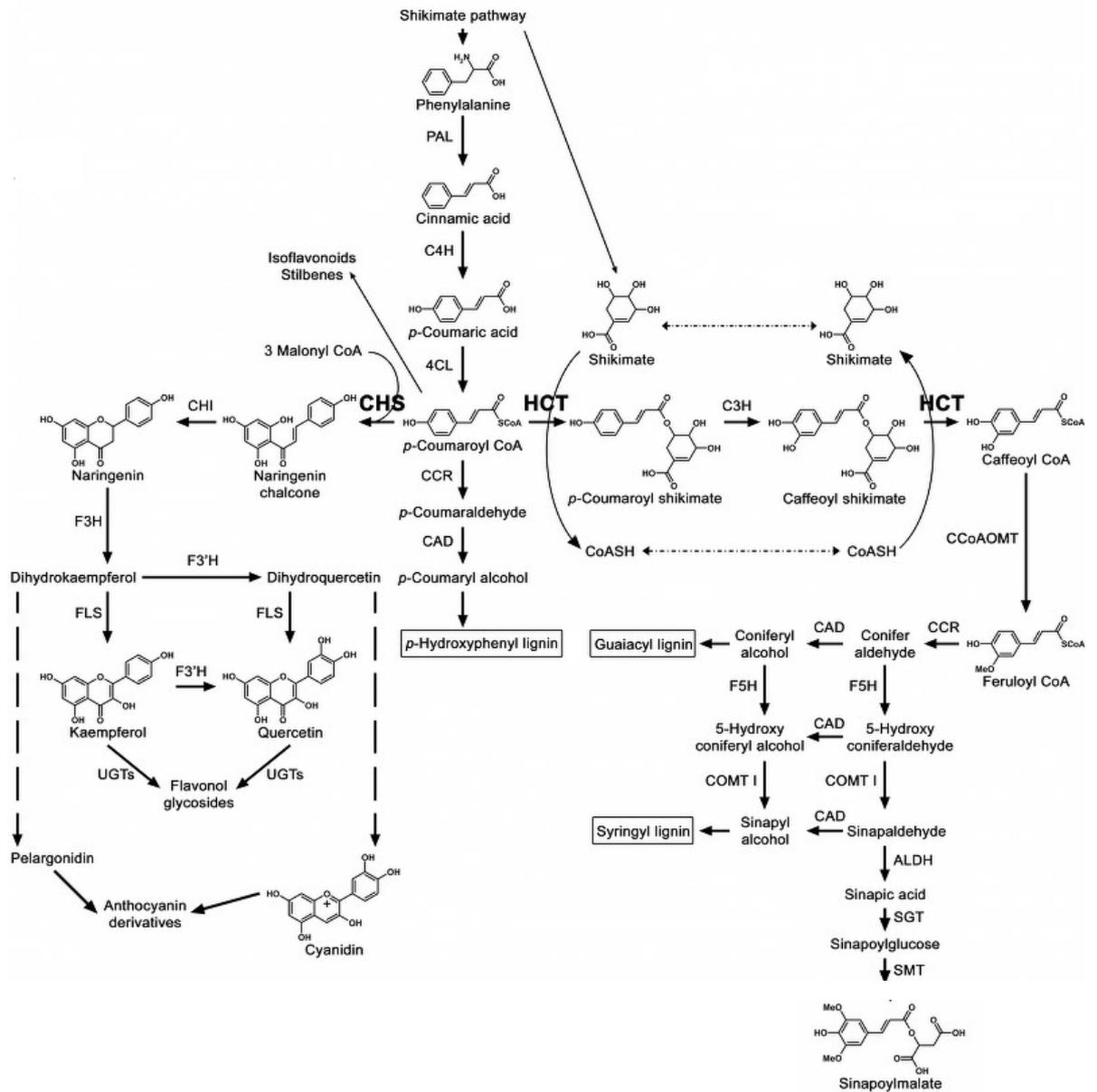


Figura 24 - Via biosintetica dei fenil propanoidi

1.4.4 Induzione ambientale della sintesi delle antocianine

Nelle cultivar pigmentate di differenti specie le antocianine possono essere presenti transitoriamente durante lo sviluppo, manifestandosi solo nei tessuti giovani o senescenti, oppure essere permanenti. Inoltre, possono essere transitorie in relazione ai cambiamenti ambientali, apparendo e scomparendo in base al fotoperiodo, alla temperatura o allo stress idrico. Uno dei fattori che maggiormente influenza la formazione di tale pigmento è la luce, anche se, in alcuni casi, ne accelera la degradazione (Maccarone *et al.*, 1987). La luce attiva la trasduzione del segnale e l'espressione dei geni coinvolti nella loro biosintesi (Mol *et al.*, 1996). Un altro fattore che influenza positivamente la biosintesi delle antocianine è costituito dalle basse temperature, in modo particolare l'escursione termica tra il giorno e la notte. In riferimento a questo, studi dimostrano che le basse temperature inducono la sintesi delle antocianine in piante di *Arabidopsis* (Graham, 1998; Leyva *et al.*, 1995), *Sorghum* (Shichijo *et al.*, 1993), *Poncirus* (Tignor *et al.*, 1997) e *Z. Mays* (Christie *et al.*, 1994), nelle foglie di *Cotinus* (Oren-Shamir *et al.*, 1997; Oren-Shamir *et al.*, 1997b) e *Pinus* (Krol *et al.*, 1995), nei ramoscelli di un anno di *Diospyros* (Leng *et al.*, 1993) e in cellule parenchimatiche di *Fagus sylvatica* (Schmucker, 1947). Poco, invece, si conosce sull'accumulo e la funzione di tali pigmenti all'interno dei frutti. È stato dimostrato che la temperatura di stoccaggio post-raccolta può influenzare i livelli di antocianine in piccoli frutti come le fragole (Kalt *et al.*, 1999), i mirtilli (Kalt *et al.*, 1999) e in diverse cultivar di mirtillo blu (Connor *et al.*, 2002). In quest'ultimo caso, è stato constatato che i contenuti di antocianine in mirtilli completamente maturi (100% grado di maturità) non cambiano significativamente quando i frutti sono soggetti da 3 a 7 settimane a basse temperature di stoccaggio durante il post-raccolta (Connor *et al.*, 2002). Inoltre, in base al tipo di cultivar, l'accumulo dei pigmenti potrebbe avvenire solo in frutti con un livello di maturità compreso tra il 50-75% (Connor *et al.*, 2002).

1.4.5 Importanza delle antocianine nella tolleranza allo stress

In condizioni di stress l'apparato fotosintetico normalmente non è in grado di utilizzare tutta l'energia derivante dalla luce: in questa situazione in cui il trasporto elettronico è rallentato, le clorofille eccitate allo stato di singoletto possono spontaneamente decadere allo stato di tripletto e quindi interagire con l'ossigeno molecolare generando specie altamente reattive, denominate ROS (Reactive Oxygen Species), in grado di portare alla rapida distruzione dei fotosistemi. Le piante superiori hanno evoluto diversi sistemi per garantire la dissipazione dell'energia di eccitazione, quando questa diviene eccessiva. Tra questi, le antocianine svolgono un ruolo chiave, in quanto sono direttamente coinvolte nella fotoprotezione. Nel 1984 Drumm-Herrel (Drumm-Herrel *et al.*, 1984) dimostrò che le antocianine proteggono le foglie dalla luce, in particolare dalla luce blu ad elevata energia che distrugge la clorofilla (Chalker-Scott, 1999); inoltre questi composti UV-assorbenti impediscono la morte cellulare proteggendo il DNA dalla dimerizzazione e dalla rottura (Dixon *et al.*, 1995). Anche gli stress nutrizionali si ripercuotono sul metabolismo dei flavonoidi. Si è notato che bassi livelli di fosfato, di azoto e di ferro comportano un aumento di antocianine nelle radici, anche se le ragioni sono poco chiare (Graham, 1991; Wojtaszek *et al.*, 1993; Marschner, 1991). Si è constatato, inoltre, che le basse temperature inducano la biosintesi di antocianine in *Arabidopsis* e si è quindi supposto che la sintesi di questi flavonoidi coinvolga geni COR (cold-regulated), anche se temperature di freezing ne bloccano la produzione (Christie *et al.*, 1994). Quando la temperatura scende drasticamente e oltrepassa il punto di congelamento, il suo effetto sui tessuti viene a realizzarsi attraverso il fenomeno della transizione di fase dei fluidi; previa rimozione delle sostanze nucleatrici, le piante hanno la possibilità di mantenere le proprie cellule non congelate in presenza di temperature ben al di sotto dello zero: il fenomeno prende il nome di "supercooling" e resta possibile fino alla temperatura di -38,5°C, tale limite termico inferiore può

essere ulteriormente abbassato dalle molecole di soluto contenute nella matrice cellulare. Questi elementi, nonché l'esistenza nei tessuti di barriere fisiche capaci di ostacolare la crescita dei cristalli di ghiaccio permettono alla pianta di evitare il congelamento fino all'estremo di -40°C (Pearce, 2001). L'induzione al supercooling dovuto all'incremento della concentrazione di soluti è stato riscontrato nelle cellule xilematiche, nei germogli floreali dormienti e nei tessuti fogliari (Chalker-Scott, 1992). In questi ultimi l'accumulo delle antocianine da parte delle cellule dell'epidermide sembra diminuire il potenziale osmotico e ritardare il congelamento tramite nucleatori di superficie, proteggendo così le foglie dalle gelate tardive primaverili. Oltre ai danni causati dalla formazione dei cristalli di ghiaccio nei tessuti delle foglie, le basse temperature determinano anche una diminuzione dei livelli di saturazione degli acidi grassi dei lipidi di membrana, rendendoli più sensibili ai danni causati dagli UV, essendo immediatamente ossidati dai radicali formati da tali raggi che sopravvivono alle basse temperature. Quindi le antocianine dell'epidermide sono doppiamente protettive nella prevenzione dei danni causati direttamente e indirettamente dalle basse temperature e dagli UV (Robinson, 1991). L'incremento della resistenza al gelo indotto osmoticamente potrebbe fornire una resistenza incrociata ad altri stress, soprattutto alla siccità, che induce anch'essa una migrazione dell'acqua determinando una disidratazione ed un'eventuale lisi cellulare. Anche in questo caso quindi piante che aumentano il contenuto di soluti (antocianine) nei vacuoli, diminuiscono il potenziale osmotico della foglia permettendo alla pianta di rimanere turgida anche in condizioni di basso potenziale idrico. Il meccanismo dell'induzione da freddo delle antocianine e il ruolo svolto dalla luce, non sono stati tuttavia del tutto chiariti ed è stata suggerita l'esistenza, tra i due fenomeni, di vie separate o sovrapposte (Chalker-Scott, 1999). L'accumulo di antocianine, quindi, nelle piante protegge la pianta dai danni causati direttamente o indirettamente dalle radiazioni UV, dalle basse temperature e dalla siccità. L'incremento delle antocianine nei tessuti quali

frutti o foglie tuttavia non può essere sempre considerato un fenomeno vantaggioso per la pianta; sebbene l'aumento delle antocianine in autunno è largamente documentato e accade, in molte piante legnose, con l'inizio dell'abbassamento delle temperature, diminuendo o scomparendo entro la primavera successiva, a conferma che la loro induzione protegge la pianta dai danni del freddo; la biosintesi delle antocianine tuttavia risulta particolarmente dispendiosa in quanto necessita l'ulteriore modificazione dei precursori flavononi. Allo stesso tempo, anche la loro eventuale degradazione potrebbe richiedere energia. Un altro costo potenziale dell'accumulo delle antocianine è la loro interferenza nella fotosintesi. A causa della capacità di assorbire luce blu e riflettere lunghezze d'onda rosse, le antocianine presenti negli strati superiori dell'epidermide o nel mesofillo delle foglie potrebbero teoricamente competere con la clorofilla e i carotenoidi nella captazione della luce. A conferma di ciò, si sono osservate riduzioni della fotosintesi nelle varietà a foglia rossa di *Coleus* (Burger *et al.*, 1996) e nel peperone (Bahler *et al.*, 1991).

1.4.6 Incremento delle antocianine nelle arance frigo conservate

Nell'ambito dei frutti di agrume maturi le antocianine sono espresse esclusivamente nell'arancio rosso e nei suoi ibridi e soprattutto nella polpa e nella buccia; la presenza di antocianine nelle foglie e nei fiori di alcuni agrumi (limone, *Papeda* ecc.) si ha solo nella prima fase di crescita. È stato dimostrato che la temperatura di stoccaggio nel post-raccolta può influenzare i livelli di antocianine in frutti piccoli come le fragole (Kalt *et al.*, 1999) e i mirtilli. In particolare si è visto che il contenuto in antocianine in mirtilli completamente con il 100% di livello di maturità non cambia significativamente se sono conservati a 4°C per 3-7 settimane, ma che invece l'aumento si ha nei frutti che hanno un livello di maturità compreso tra il 50-75% (Connor *et al.*, 2002). Studi fatti nel 2004 nel laboratorio di Biologia Molecolare (DACPA) della Facoltà di Agraria di Catania hanno

mostrato come le basse temperature inducano un maggior accumulo di antocianine nei vacuoli delle arance rosse Tarocco. In particolare si è visto che il loro contenuto in arance conservate a 4°C raggiunge dopo 75 giorni valori 8 volte più alti rispetto a quello in arance mantenute a 25°C. Inoltre, si è osservato che l'aumento dei livelli di antocianine nelle arance conservate a 4°C è sostenuto da un concomitante incremento dell'espressione dei geni codificanti per gli enzimi della via biosintetica di questi pigmenti, sia di quelli coinvolti in fase iniziale (PAL) che di quelli che intervengono alla fine della via metabolica (CHS, DFR, UFGT e GST). La real-time PCR ha mostrato, infatti, che l'espressione dei geni coinvolti è fortemente indotta dall'esposizione al freddo dato che il livello di tutti i trascritti aumenta di 40 volte rispetto ai campioni non sottoposti al trattamento. Altri studi hanno dimostrato che si ha un decremento della quantità di antocianine in arance rosse mantenute a 4°C per 45 giorni e poi riportate a 25°C, anche se, nonostante tale diminuzione, il contenuto resta comunque superiore al controllo. Lo stesso andamento è seguito dall'espressione dei geni che decresce mantenendosi comunque a livelli più alti del controllo. Al contrario, la quantità di trascritti PAL diventa trascurabile subito dopo il passaggio da 4°C a 25°C, questo indica che "early" geni e "late" geni, rispettivamente coinvolti nel primo e nell'ultimo step della biosintesi delle antocianine, potrebbero essere soggetti a differenti meccanismi di regolazione (Lo Piero *et al.*, 2005). L'induzione della produzione di antocianine con la frigoconservazione è un risultato molto importante, considerato che le arance possono essere conservate per lunghi periodi senza che ci sia alterazione sensoriale del frutto. Infatti, solo una conservazione per periodi superiori a tre mesi comporta la non edibilità del frutto in seguito alla formazione di composti maleodoranti come il vinilguaiacolo e il vinilfenolo (Lo Piero *et al.*, 2005). Essendo quindi il contenuto in antocianine un vero marker di qualità per tutti i vantaggi discussi in precedenza, questi risultati sono di grande interesse.

1.5 CONSIDERAZIONI PRELIMINARI E SCOPO DEL LAVORO

Un'intensa attività di ricerca condotta negli ultimi anni ha messo in luce come le basse temperature inneschino nelle piante cambiamenti metabolici e di espressione genica e come il *cold stress* influisca anche sull'accumulo di antocianine nella radice, nelle gemme e nel tessuto fogliare. La temperatura è quindi uno dei principali fattori esterni che influenzano l'accumulo di antocianine nei tessuti delle piante: le basse temperature in genere aumentano la loro concentrazione, mentre le elevate temperature la diminuiscono. Kliewer ha dimostrato che temperature diurne superiori a 30°C e notturne superiori a 35°C annullano la biosintesi delle antocianine e ha constatato che il range ottimale di temperatura per la loro sintesi è tra i 17 e i 26°C (Kliewer *et al.*, 1972). Diversi lavori hanno mostrato che in alcuni sistemi di piante, le basse temperature hanno determinato un incremento del livello di trascrizione di geni i cui prodotti sono enzimi chiave del percorso generale biosintetico dei fenil-propanoidi, come la fenilalanina ammonio liasi (PAL), o geni i cui prodotti catalizzano reazioni coinvolte nella biosintesi dei flavonoidi ed antocianine, come la calcione sintasi (CHS), la calcione isomerasi (CHI) e la deidro flavonol riduttasi (DFR) (Shvartz *et al.*, 1997). Tuttavia, le temperature possono influenzare non solo la sintesi, ma anche la stabilità delle antocianine. Perciò, la diminuzione della concentrazione di tali pigmenti ad elevate temperature deve essere ricondotta sia ad un decremento nella sintesi, che ad un aumento nella degradazione (Shaked-Sachray *et al.*, 2002; Oren-Shamir *et al.*, 2003). Inoltre gli sbalzi termici tra il giorno e la notte durante la fase di accumulo favoriscono la sintesi di tali pigmenti. La regolazione della biosintesi delle antocianine è stata particolarmente studiata in diverse piante, come *Arabidopsis* e mais e su alberi come la vite, il melo e i mirtilli, ma non approfonditamente nelle arance (*Citrus sinensis*). Lo Piero *et al.* (2005) hanno dimostrato che il contenuto di antocianine nella polpa di arance rosse aumenta sensibilmente durante un lungo periodo di conservazione a 4°C e

che questo incremento è associato all'induzione della trascrizione dei geni coinvolti nella loro sintesi (fig. 25 e fig. 26): il diidroflavonolo 4-reduttasi (DFR), l'antocianidina sintasi (ANS), l'UDP glucosio-flavonoide 3-O-glucosiltrasferasi (UFGT) e la glutatione transferasi (GST). Cotroneo *et al.* (2006) hanno invece verificato il livello di espressione mediante Real-time PCR e i risultati mostrano che i relativi trascritti sono espressi nelle arance rosse e sottoespressi nelle varietà bionde.

Alla luce dei risultati ottenuti da studi fatti negli ultimi anni su arance pigmentate, lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di confermare che il *cold stress* induce un aumento del contenuto di antocianine e di valutare come le basse temperature influiscono sul livello di espressione dei geni codificanti per gli enzimi della via biosintetica dei flavonoidi in arance Tarocco cultivar Sciara sia considerando i cambiamenti generati da un lungo periodo di esposizione a freddo (77 giorni) sia valutando la variazione del livello di espressione dei geni codificanti gli antociani nel breve periodo (15 giorni).

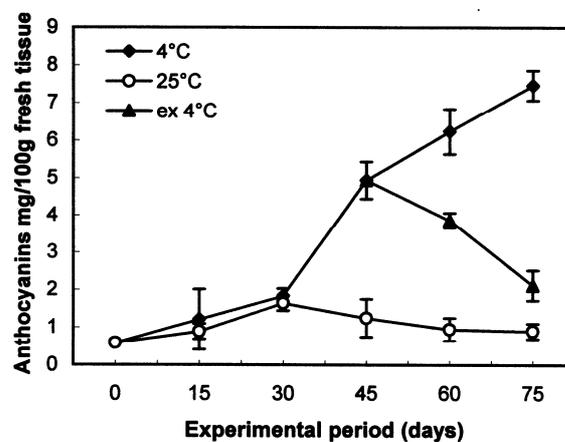


Figura 25– Accumulo di antocianine nei vacuoli di arance rosse durante l'esposizione a basse temperature.

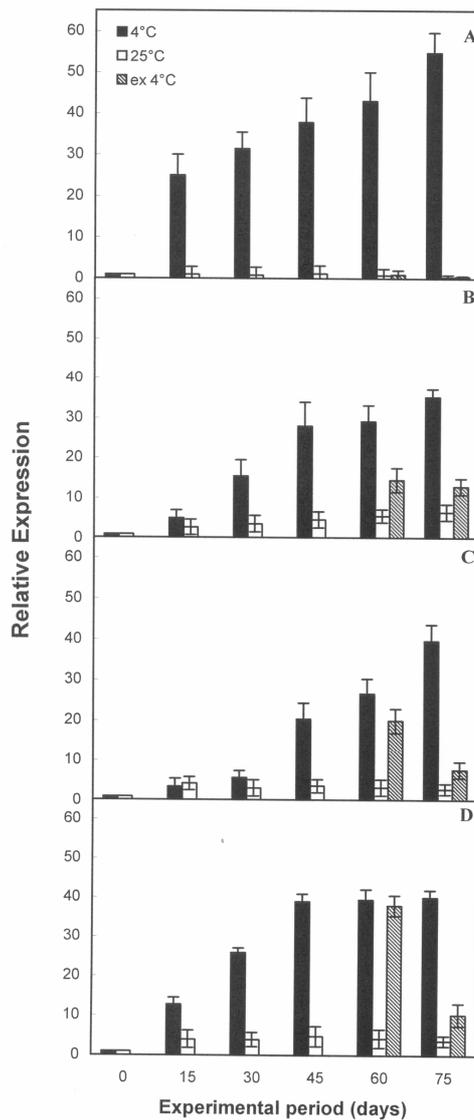


Figura 26– Espressione dei geni coinvolti nella sintesi delle antocianine durante il periodo di osservazione. Nell'ordine: PAL, CHS, DFR e UFGT.

Si è proceduto misurando il contenuto di antocianine in arance conservate a 4°C e a 25°C e al fine di approfondire le conoscenze sui geni che regolano la sintesi dei flavonoidi; è stata costruita una libreria sottrattiva da cDNA a partire da RNA totale che ci ha permesso di identificare trascritti differenziali presenti nella polpa frigoconservata rispetto a quelli di una stessa cultivar conservata a temperatura ambiente. Infine tramite Real-Time PCR è stata valutata l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi dei

flavonoidi, valutando come le basse temperature ne inducano un aumento rispetto al campione controllo (25°C) sia nel lungo che nel breve periodo. Accanto all'analisi della risposta generale alle basse temperature, si focalizzerà l'attenzione sul ruolo, ancora non ben definito, dell'acido abscissico nella trasduzione del segnale di stress da basse temperature e nella diversa concentrazione dell'ormone durante le fasi di stoccaggio. L'analisi della variazione di ABA nelle varie parti della pianta, con particolare riferimento al frutto, è indispensabile per comprendere esattamente i meccanismi di accumulo dell'ormone ed eventualmente rilevare processi di catabolismo e coniugazioni che l'organo in considerazione mette in atto durante l'acquisizione di tolleranza. L'identificazione e l'isolamento di geni *stress responsive* sono da considerarsi delle tappe indispensabili per il miglioramento della tolleranza allo stress da parte delle piante; infatti, essi rappresentano una fonte preziosissima di tratti genici favorevoli per la costituzione di organismi *cis-* o *trans-*genici con una più elevata tolleranza se non addirittura resistenza allo stress abiotico. Questo approccio al problema di costituire nuovo germoplasma è certamente meno *time consuming* del tradizionale *breeding*, particolarmente in specie arboree, costituite da piante molto grandi con lunghi periodi giovanili e da elevata eterozigosi.

CAPITOLO 2
MATERIALI E METODI

2.1 PIANO SPERIMENTALE

Le analisi di laboratorio sono state effettuate su campioni di arance Tarocco raccolte presso l'Azienda Agricola sperimentale in contrada Palazzelli di Scordia (CT) dell'Istituto Sperimentale per l'Agrumicoltura di Acireale appartenenti alla cultivar Sciara Nuccellara C1182. Il conferimento delle arance in laboratorio è avvenuto in due date: il 18 gennaio 2008 a seguito della quale si è proceduto ad analizzare i frutti per un periodo di circa 3 mesi e il 19/01/2010 per analizzare le arance nel breve periodo e specificatamente per 15 giorni. Una volta accertata la qualità dei frutti (assenza di marciumi, muffe e lesioni), questi sono stati lavati, sciacquati con acqua distillata, asciugati e conservati a temperatura ambiente tutta la notte. Il giorno seguente si è proceduto con il prelievo della polpa di alcune arance rappresentante il tempo 0, mentre le restanti sono state divise in due gruppi. Un gruppo è stato conservato al buio a 25°C, mentre l'altro gruppo è stato posto in camera fredda a 4°C. I prelievi della polpa sono stati differenti a seconda dell'esperimento: ogni tre settimane circa sono stati effettuati i prelievi della polpa conservata nelle due diverse condizioni per l'esperimento di lunga durata (77 giorni), ogni 3 giorni per l'esperimento nel breve periodo (15 giorni) (tab. 2) (tab. 3).

Prelievi	Data	Sciara 4°C	Sciara 25°C
<i>Tempo 0</i>	18/01/08	3 Arance	3 Arance
<i>I Prel.</i>	07/02/08	6 Arance	6 Arance
<i>II Prel.</i>	27/02/08	6 Arance	6 Arance
<i>III Prel.</i>	18/03/08	6 Arance	6 Arance
<i>IV Prel.</i>	04/04/08	3 Arance	3 Arance

Tabella 2 - Andamento sperimentale dei prelievi per il lungo periodo.

Prelievi	Data	Sciara 4°C	Sciara 25°C
<i>Tempo 0</i>	20/01/10	3 Arance	3 Arance
<i>I Prel.</i>	23/01/10	6 Arance	6 Arance
<i>II Prel.</i>	26/01/10	6 Arance	6 Arance
<i>III Prel.</i>	29/01/10	6 Arance	6 Arance
<i>IV Prel.</i>	01/02/10	3 Arance	3 Arance
<i>V Prel.</i>	04/02/10	3 Arance	3 Arance

Tabella 3 - Andamento sperimentale dei prelievi per il breve periodo.

2.2 PRELIEVO DELLA POLPA

Data l'instabilità dell'RNA che risulta facilmente degradabile dalle RNA-asi, enzimi presenti a varie concentrazioni all'interno di alcuni tipi di cellule e sulle dita, per analizzare l'RNA estratto dalla polpa di arancia è necessario isolarlo e purificarlo. Quindi, oltre all'utilizzo di reagenti in grado di denaturare le RNA-asi, è necessario utilizzare sempre guanti puliti durante tutte le fasi che riguardano l'estrazione dell'RNA. Tutta l'utensileria utilizzata per campionare la polpa dalle arance è stata pertanto trattata con DEPC (dietilpirocarbonato), un agente alchilante molto reattivo e cancerogeno che inibisce l'azione delle RNA-asi. Tutti gli utensili utilizzati durante la manipolazione di questo acido sono stati trattati con una soluzione di acqua distillata allo 0.1% di DEPC over-night. Al termine del trattamento, tutta l'attrezzatura trattata deve essere autoclavata al fine di inattivare il DEPC. Il prelievo della polpa di entrambe le cultivar avviene dapprima con l'eliminazione dell'epicarpo incidendo la buccia con uno scalpel-blade DEPC treated (trattato in DEPC e successivamente autoclavato). Il frutto è stato poi separato in spicchi con l'ausilio del blade e

la polpa, tagliata in piccoli pezzi, viene raccolta e distribuita in falcon sterili. Le falcon sono state riempite con differenti quantitativi di polpa: 0,5 g di polpa necessari per la successiva estrazione di RNA e 5 g di polpa necessari per la determinazione delle antocianine. Questo procedimento è stato eseguito per ogni prelievo riguardante sia l'esperimento del lungo periodo sia per quello del breve periodo. Le falcon sono state poi etichettate e conservate a -80°C.

2.3 DETERMINAZIONE DELLE ANTOCIANINE

Le antocianine presenti nella polpa di arancia sono la cianidina-3-O-glucoside, la cianidina-3,5-diglucoside, la peonidina-5-glucoside, la delphinidina-3-glucoside e la petunidina-3-glucoside.

La cianidina-3-O-glucoside è la più abbondante e costituisce circa il 97% delle antocianine totali, per tale ragione un suo dosaggio colorimetrico rappresenta una stima abbastanza accurata delle antocianine totali.

Le soluzioni di antocianine presentano colori che dipendono direttamente dal pH. Le soluzioni acide contenenti queste sostanze sono di color rosso e si decolorano man mano che il pH aumenta. La massima decolorazione si osserva per valori di pH 4,5. Il colore varia dal malva al blu, per pH maggiori di 4,5. Il colore giallo appare successivamente in mezzo neutro o alcalino. Brouillard *et al.* hanno mostrato che questi colori sono la risultante degli equilibri fra quattro gruppi di strutture:

1. il catione flavilio, di color rosso, possiede un deficit elettronico. In base alla posizione che assume la carica (+) sono possibili 6 formule;
2. la base chinonica, di colore blu, presenta una funzione chetonica aromatica, formata a partire dagli OH fenolici. Sono possibili tre formule limiti che derivano dai cationi flavilio corrispondenti e non sono in equilibrio di mesomeria;
3. il carbinolo incolore può essere caratterizzata da una funzione alcolica nella posizione due (AOH₂);

4. i calconi di colore giallo molto pallido, che derivano dalle strutture precedenti, dopo apertura dell'eterociclo, possono presentare la funzione chetonica in posizione due e possono esistere sotto due forme *cis* e *trans* (Brouillard *et al.*, 1978).

Tali proprietà vengono sfruttate per dosare spettrofotometricamente il contenuto di antocianine totali in due estratti acquosi di polpa di arancia rossa, uno a pH = 1,0 e l'altro a pH = 4,5, misurandone l'assorbanza a 510 nm. La differenza tra le assorbanze registrate nelle due soluzioni risulta, infatti, proporzionale al contenuto in antocianine del campione.

Questa tecnica di determinazione sfrutta la legge di Lambert-Beer secondo la quale:

$$\mathbf{Abs = \varepsilon L C} \quad \text{da cui} \quad \mathbf{C = Abs / (\varepsilon L)}$$

- Abs = Assorbanza
- ε = coefficiente di estinzione molare della cianidina-3-O-glucoside (26900)
- L = cammino ottico (1 cm)
- C = concentrazione

Il protocollo per la determinazione delle antocianine prevede una fase di estrazione della cianidina seguita dal dosaggio colorimetrico.

In un mortaio vengono polverizzati 2g di polpa conservata a -80°C, utilizzando azoto liquido (- 196°C). Si procede pesando un'aliquota di 1 g in una eppendorf da 2 ml ed aggiungendo 1 ml di acqua bidistillata. Dopo aver vortexato per circa 15 minuti, si centrifuga a 13000 RPM per 20 minuti e si trasferisce il surnatante contenente le antocianine idrofile in nuove eppendorf da 1,5 ml.

Si divide il surnatante in 2 eppendorf sterili da 1,5 ml contenenti 250 µl di due tamponi a diverso pH (pH = 1 e pH = 4,5) preparati precedentemente, come segue:

- **4X TAMPONE, pH = 1**

- 5,96 g di KCl in 100ml di acqua (soluzione A)

- 6,8 g di HCl al 37% in 100 ml di acqua (soluzione B).

Il tampone a pH = 1 è costituito da 25 ml di A e 67 ml di B.

- **4X TAMPONE, pH = 4,5**

- 6,56 g di CH₃COONa-HCl in 100 ml acqua, pH = 4,5.

Alle due eppendorf contenenti i tamponi si aggiunge un quantitativo totale di surnatante e di acqua bidistillata pari a 750 µl. La proporzione tra acqua bidistillata e antocianine dipende dal grado di colorazione del surnatante. Si preparano due bianchi costituiti da 250 µl di ciascun tampone e da 750 µl di acqua bidistillata e si procede con le letture allo spettrofotometro delle assorbance a 510 nm (massima assorbance delle antocianine). Si può effettuare anche una lettura a 700 nm per evidenziare un'eventuale torbidità del campione (assorbimento delle impurità).

L'assorbance del campione è stata calcolata secondo la formula:

$$\Delta \text{ Abs} = \text{ Abs a pH} = 1,0 - \text{ Abs a pH} = 4,5 \text{ (a 510 nm)}$$

Nel caso in cui il campione presenti torpidità:

$$\Delta \text{ Abs} = (\text{ Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{ Abs}_{700 \text{ nm}}) \text{ pH} 1,0 - (\text{ Abs}_{510 \text{ nm}} - \text{ Abs}_{700 \text{ nm}}) \text{ pH} 4,5$$

$$\Delta \text{ Abs} = \text{ Abs pH} 1,0 - \text{ Abs pH} 4,5$$

La % in peso (% w/w) delle antocianine monomeriche nel campione originale è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\% (w / w) = \Delta \text{ Abs} / (\epsilon \cdot L) \cdot M_w \cdot DF \cdot (V / w_t)$$

Dove:

- $\Delta Abs = Abs_{pH=1} - Abs_{pH=4,5}$
- $\varepsilon = \text{coeff. d'estinzione molare della C3G} = 26.900$
- $L(\text{cammino ottico}) = 1 \text{ cm}$
- $M_w = P.M. \text{ della C3G} = 449,2$
- $DF = \text{fattore di diluizione} (1000 \mu\text{l Volume Tot.} / 100 \mu\text{l Volume Surnatante})$
- $w_t = \text{peso iniziale della polvere in mg}$
- $V = \text{volume finale in ml}$

A questo punto i dati si riportano in un grafico che rappresenta la quantità di antocianine (mg/100g) in funzione del tempo (giorni). In tal modo si valuta il loro andamento alle diverse temperature (4°C e 25°C) durante il periodo d'osservazione.

2.4 ESTRAZIONE, QUANTIFICAZIONE E CONCENTRAZIONE DELL'RNA

2.4.1 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione dell'RNA totale dalla polpa viene eseguita utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen), una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato che mantiene integro l'RNA, mentre distrugge le cellule e dissolve i componenti cellulari. L'isolamento del RNA totale prevede una fase di omogeneizzazione del campione, seguita dalla separazione di fase, dall'estrazione dell'RNA e dal lavaggio.

Omogeneizzazione

Ad 1 grammo di campione si aggiungono 10 ml di Trizol e 2500 μg di glicogeno e si utilizza il frantumatore cinematico a velocità media per disgregare il tessuto fino a che non sono più visibili i grossi frammenti.

Questa operazione viene condotta mantenendo il campione in ghiaccio al fine di evitare la degradazione dell'acido nucleico che risulta particolarmente delicato. In seguito all'omogeneizzazione segue una breve centrifuga a 4000 RPM per 10 minuti per rimuovere materiale insolubile (membrane extracellulari, polisaccaridi e molecole di DNA ad alto peso molecolare). Il sovrantante è poi trasferito in falcon trattate ed incubato per 5 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleo-proteici.

Separazione di fase

Per ogni ml di Trizol si aggiungono 0.2 ml di cloroformio. Si agita vigorosamente per circa 15 secondi, si incuba a temperatura ambiente per 3 minuti e si trasferisce il contenuto in corex DEPC-treated e si centrifuga a 11500 RPM per 15 min a 4°C. La centrifugazione determina la formazione di tre fasi: una fase superiore acquosa contenente RNA, una fase intermedia di colore bianco contenente DNA, una fase inferiore fenolo-cloroformica contenente polisaccaridi, proteine, polifenoli, etc.

Il surnatante contenente l'RNA viene recuperato e travasato in un'altra corex RNA-asi free.

Precipitazione dell'RNA

L'RNA viene precipitato dalla fase acquosa superiore aggiungendo 0.5 ml di isopropanolo per ogni millilitro iniziale di reagente Trizol. Si incubano i campioni a temperatura ambiente per 10 min e si centrifugano a 11500 RPM per 10 min a 4°C. L'RNA precipita sotto forma di un pellet gelatinoso.

Lavaggio dell'RNA

Dopo aver rimosso il surnatante, il pellet di RNA viene lavato con 10 ml di etanolo al 75%. Una volta aggiunto l'etanolo, si agita il campione e si centrifuga a 9500 RPM per 5 minuti a 4°C. Si rimuove l'etanolo e si lascia asciugare il pellet per 5-10 minuti. Infine l'RNA viene risospeso con 900 µl di H₂O-DEPC treated e conservato a -80°C.

2.4.2 Quantificazione dell'RNA

L'RNA estratto viene analizzato allo spettrofotometro per determinarne la concentrazione ed evidenziare eventuali contaminazioni da fenolo o da proteine. Un'ulteriore quantificazione viene fatta mediante lettura fluorimetrica.

Quantificazione allo spettrofotometro

La lettura spettrofotometrica viene eseguita su RNA estratto diluito 1:20 in H₂O-DEPC treated. Per calibrare lo strumento si usa una soluzione standard di riferimento di H₂O-DEPC treated. Un'aliquota di RNA diluito viene caricata in una cuvetta di quarzo con un cammino ottico di 1 cm, che è stata trattata per circa un'ora con una soluzione di HCl-CH₃OH nel rapporto 1:1 e sciacquata con H₂O-DEPC treated. Dallo strumento si ottengono i valori di assorbanza a 260 nm (lunghezza d'onda specifica per l'acido nucleico) e a 280 nm (lunghezza d'onda delle proteine). Il rapporto tra le assorbanze $\Delta 260 / \Delta 280$ è necessario per conoscere il grado di purezza dell'RNA (un rapporto compreso tra 1,9 e 2 è indice di un'ottima purificazione). La quantità di RNA contenuto può essere stimata considerando che 1 unità di assorbanza a 260 nm corrisponde a 40 µg di RNA, quindi si può risalire alla concentrazione di RNA (µg/ml) mediante la formula:

$$40 (\mu\text{g/ml}) \times \text{Abs } 260 \times \text{FD}$$

Dove

Abs 260 = assorbanza del campione a 260 nm

FD = fattore di diluizione.

I µg di RNA totale si ottengono attraverso la proporzione:

$$\mu\text{g RNA: } 1000 \mu\text{l} = \mu\text{g RNA totale: } \mu\text{l RNA estratto}$$

Quantificazione al fluorimetro

La quantificazione al fluorimetro viene fatta con il metodo "Quant-iT RNA Assay" (*Molecular Probes*), uno dei più sensibili sistemi di determinazione delle quantità di RNA in piccoli volumi. Lo strumento rileva una fluorescenza che è proporzionale al contenuto di acido nucleico presente

nella cuvetta, grazie alla presenza in soluzione di un colorante fluorescente specifico per RNA.

Il kit è composto da:

- 8 soluzioni standard aventi concentrazioni rispettivamente di 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ng/μl necessari per la costruzione di una curva di taratura che rappresenta la variazione del valore di assorbanza in funzione della concentrazione di RNA (μg/ml);
- una soluzione B ed una soluzione A (fluoroforo) da miscelare in rapporto 1:200 per la formazione della master.

Il quantitativo di master da aggiungere alla soluzione standard (10 μl) ed ai campioni (10 μl diluizione 1:10) è di 400 μl.

Il fluorimetro è impostato con lunghezza d'onda d'eccitazione di 630 nm e lunghezza d'onda d'emissione di 680 nm.

Dopo aver letto i valori di assorbanza di ciascuna soluzione standard a concentrazioni crescenti e aver costruito la curva di taratura con un range di sensibilità da 0 a 100 ng, si procede con la lettura dell'assorbanza dei campioni. I valori registrati di fluorescenza ci permettono di stimare la concentrazione di RNA (ng/μl) di ciascun campione utilizzando la curva di taratura costruita:

$$FI = k C + b;$$

$$C (\mu\text{g/ml}) = (FI - b)/k;$$

$$C.\text{eff.} (\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{Conc.} (\mu\text{g} / \text{ml}) * \mu\text{l RNA} * FD$$

dove:

- *C. eff.:* concentrazione effettiva (ng/μl)
- *Conc.:* concentrazione in μg/ml
- *μl RNA:* volume di RNA (μl)
- *FD:* fattore di diluizione

Affinché la concentrazione dell'RNA stimata si avvicini a quella reale è necessario che il valore di R^2 sia prossimo all'unità.

2.4.3 Analisi elettroforetica dell'RNA totale

La qualità dell'RNA totale estratto viene inoltre saggiata elettroforeticamente. L'analisi dell'RNA totale estratto è avvenuta tramite separazione su gel di agarosio in MOPS 10 X (2,5% agarosio, 20 mM MOPS 10X (pH=7), 6% w/v formaldeide, 1 mM EDTA).

La preparazione dei campioni è stata effettuata miscelando:

1,5 µg di RNA Totale

1: 10 di volume di MOPS 10X

3: 10 di volume di gel Loading Buffer (50% glicerolo, 0,25% Xilen Cianolo, 0,25% Blu di Bromofenolo, 10 mM EDTA pH=8)

In seguito al miscelamento i campioni vengono incubati a 70°C per 10 minuti ed infine caricati su gel. Il gel è stato sottoposto prima ad una precorsa a vuoto per 5 minuti e successivamente al caricamento dei campioni ad una corrente di 100 V per circa 3 ore in una soluzione di MOPS 1X a pH= 7 (20 mM MOPS pH=7, 1 M sodio acetato, 1 mM EDTA 0,5M pH=8). In ogni gel sono stati caricati un "DNA Ladder 1Kb plus" (Invitrogen) ed un "0,5-10 Kb RNA Ladder" (Invitrogen) composti da diverse miscele di bande a lunghezza nota (fig. 27) dalla cui migrazione sarà possibile risalire alla lunghezza d'onda delle bande di RNA totale. La purezza del campione viene confermata dalla corsa elettroforetica in quanto l'RNA totale presenta solo due bande ben visibili: 18S e 28S.

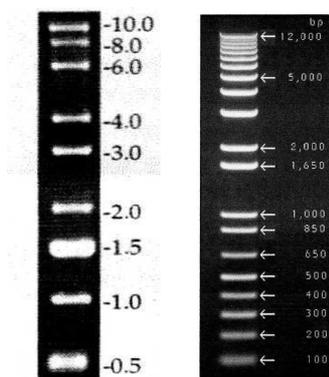


Figura 27- Tipica migrazione di 0,5-10 RNA Ladder (sx) e DNA Ladder 1Kb plus (dx)

Dopo la corsa il gel viene immerso in una soluzione di Etidio Bromuro (1µg/ml), subendo così un processo di colorazione, e lasciato in agitazione ad una velocità di circa 40 RPM overnight. Il giorno successivo quindi è possibile fotografare il gel con l'ausilio di un transilluminatore a raggi UV.

2.4.4 Concentrazione dell'RNA

Al fine di aumentare la conservabilità dell'RNA totale estratto si procede con la precipitazione in pellet dell'acido nucleico. Si aggiunge 1/10 del volume di 3M CH₃COO⁻Na⁺ (pH 5,2) e 2,5 volumi di etanolo freddo al 95%. I campioni vengono incubati a -20°C per circa 30 minuti e in seguito centrifugati a 13000 RPM per 10 minuti alla temperatura di 4°C. Si elimina il surnatante e si lascia asciugare air-dry per circa 5 minuti consentendo la completa evaporazione dell'etanolo. L'acido nucleico così concentrato viene conservato a -80°C.

2.5 CONVERSIONE DI RNA TOTALE IN mRNA CON “Oligotex mRNA Batch Protocol”

L' “Oligotex mRNA Batch Protocol” (Qiagen) permette l'isolamento di poly A⁺ mRNA da RNA totale. La procedura per l'isolamento e la purificazione di poly A⁺ mRNA è resa possibile dal fatto che molti mRNA eucariotici posseggono una coda di poly-A di 20-250 adenosine. Di contro, rRNA e tRNA (che compongono per circa il 95% l'RNA totale della cellula) non sono poliadenilate. La coda di poly-A quindi può essere sfruttata per la separazione e l'isolamento selettivo di mRNA (che ammonta a circa 1-5% dell'RNA totale). PolyA⁺ mRNA può essere purificato grazie all'ibridizzazione della coda poly-A con un oligomero dT legato ad una matrice a fase solida. Le specie rRNA e tRNA, non possedendo la coda di poly-A, non si legano all'oligo-dT e possono quindi essere facilmente

rimossi. Dato che l'ibridizzazione richiede una condizione iniziale di alta concentrazione salina, il poly A⁺ mRNA può essere poi eluito grazie all'abbassamento della forza ionica (riducendo così la tensione dello scheletro fosforico) e dalla destabilizzazione dell'ibrido dT: A.

L'RNA totale di partenza viene prima quantificato per stabilire le quantità di soluzioni da utilizzare (tab. 4)

Total RNA	Add RNase-free water to:	Buffer OBB (µl)	Oligotex Suspension (µl)	Prep size
≤ 0,25 mg	250 µl	250	15	Mini
0,25-0,50 mg	500 µl	500	30	Midi
0,50-0,75 mg	500 µl	500	45	Midi
0,75-1,00 mg	500 µl	500	55	Midi
1,0-1,5 mg	650 µl	650	85	Maxi
1,5-2,0 mg	650 µl	650	115	Maxi
2,0-2,5 mg	650 µl	650	135	Maxi
2,5-3,0 mg	650 µl	650	175	Maxi

Tabella 4- Protocollo per "Oligotex mRNA Batch".

Al campione di RNA totale vengono aggiunte le appropriate quantità di Buffer OBB (20 mM Tris-Cl, pH= 7,5; 1 M NaCl; 2 mM EDTA; 0,2% SDS) ed Oligotex Suspension [10% (w/v) Tris-Cl, pH=7,5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% SDS; 0,1% NaN₃].

Successivamente il campione viene incubato prima per 3 minuti a 70°C (questo passaggio permette la denaturazione della struttura secondaria dell'RNA), e poi a 25°C per 10 minuti (permettendo così l'ibridizzazione tra l'Oligo dT₃₀ dell'Oligotex Suspension e la coda di poly-A dell'RNA). In seguito all'incubazione il campione viene centrifugato a 13000 RPM per 2 minuti ed il sovrantante viene rimosso. Il pellet è poi risospeso in 1 ml di Buffer OW2 (10 mM Tris-Cl pH=7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) e nuovamente centrifugato a 13000 RPM per 2 minuti. Il lavaggio della resina deve poi essere ripetuto una seconda volta con completa rimozione del surnatante. L'estrazione dell'mRNA viene eseguita con l'aggiunta di 30 µl di

Buffer OEB (5 mM Tris-Cl pH= 7,5) preriscaldato a 70°C. Il pellet viene risospeso e centrifugato alla massima velocità per 2 minuti. Il sovrinatante contenente il Poly A⁺ mRNA deve essere poi trasferito in un'epENDORF pulita. Per assicurarsi di estrarre completamente il Poly A⁺ mRNA dalla resina si esegue un'ulteriore eluizione aggiungendo 30 µl di buffer OEB ad "Oligotex Suspension". In seguito alla centrifugazione il sovrinatante viene poi riunito.

2.6 SINTESI DEL cDNA

2.6.1 Trasformazione dell'mRNA in cDNA tramite "SuperScript™ III Two-Step qRT-PCR Kit".

Il kit SuperScript™ III Two-Step qRT-PCR rappresenta un sistema Real-Time quantitativo RT-PCR (qRT-PCR) che permette un semplice, sensibile e riproducibile rilevamento e quantificazione dell'RNA. Il protocollo prevede l'utilizzo di (quantitativi per reazioni):

- 10 µl RT Reaction Mix (SuperScript III RT e RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease inhibitor).
- µl RT Enzyme mix (oligo(dT)₂₀, 10 mM MgCl₂ e dNTPmix
- 1 µg mRNA
- H₂O DEPC TREATED fino ad un volume di 20 µl

La miscela viene pipettata ed incubata a 25°C per 10 minuti ed in seguito a 42°C per 50 minuti.

La reazione viene terminata portando i campioni a 85°C per 5 minuti ed infine ponendo gli stessi in ghiaccio

Si aggiunge 1 µl (2U) di *E. coli* RNase H e si incuba a 37°C per 20 minuti.

2.6.2 Sintesi del cDNA tramite “Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit”

L'RNA totale estratto dalla polpa è stato utilizzato come base per sintetizzare cDNA, un filamento complementare rispetto a quello di DNA originario dal quale è derivato l'RNA estratto. La produzione di DNA complementare è avvenuta utilizzando il metodo Super SMART cDNA Synthesis, un nuovo metodo sfruttato per la capacità di produrre cDNA di alta qualità a partire a RNA totale in quantità nell'ordine dei nanogrammi. Un primer modificato oligo(dT) (3'SMART CDS Primer IIA) innesca la reazione di First-Strand. Quando RT raggiunge l'estremità 5' dell'mRNA, l'attività trasferasica dell'enzima permette l'aggiunta di alcuni nucleotidi, principalmente deossicitidine, all'estremità 3' del cDNA. Lo SMART Oligonucleotide™, che possiede una sequenza Oligo(G) all'estremità 3', si appaia alla sequenza di deossicitine creando così un allungamento dello stampo. Il risultante cDNA a singola catena contiene sia la sequenza terminale in 5' completa dell'mRNA sia le sequenze che sono complementari allo SMART Oligonucleotide. Le sequenze SMART e Poly A servono quindi come siti universali di priming per l'amplificazione del cDNA. Un controllo “Human skeletal muscle poly A⁺ (1µg/µl)” viene inoltre saggiato per evidenziare eventuali anomalie durante la procedura. Il controllo viene sottoposto agli stessi trattamenti dei campioni.

Il protocollo prevede le seguenti fasi:

- Sintesi della prima catena di cDNA
- Purificazione del cDNA
- Amplificazione del cDNA con LD PCR
- Purificazione del cDNA
- Digestione del cDNA con RsaI
- Purificazione del cDNA digerito

Sintesi della prima catena di cDNA

Per ogni campione si prepara la seguente reazione:

1 µg di RNA totale

7 µl 3' SMART CDS Primer II A (12µM)

7 µl SMART II A Oligonucleotide (12 µM)

H₂O DEPC TREATED fino ad un volume di 64 µl.

I campioni vengono poi incubati in un Termociclatore a 65°C per 2 minuti in seguito la temperatura viene ridotta a 42°C.

Ad ogni reazione vengono aggiunti 42 µl della seguente miscela:

20 µl 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl pH=8.3; 375 mM KCl; 30 mM MgCl₂)

2 µl DTT (100 mM)

10 µl 50X dNTP (10 mM)

2,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) + 2,5 µl H₂O DEPC TREATED

1 µl MMLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) + 4 µl H₂O DEPC TREATED

I campioni vengono quindi incubati a 42°C in termociclatore per 90 minuti.

Alla fine dell'incubazione si aggiungono 2 µl di 0,5M EDTA per bloccare la reazione.

Purificazione cDNA

Il cDNA così ottenuto deve essere isolato da nucleotidi non incorporati e da piccoli frammenti di cDNA (< 0,1 kb) utilizzando il metodo di purificazione "NucleoSpin Extract II" (Clontech).

Ogni campione viene miscelato con 212 µl di Buffer NT. La miscela viene poi caricata nella colonna NucleoSpin Extract II che subisce un processo di centrifuga a 14000 RPM per 1 minuto. L'eluato è scartato e la resina della colonna viene lavata aggiungendo 600 µl di Wash Buffer NT3 con successiva centrifugazione. L'eluizione del cDNA avviene mediante l'aggiunta di 50 µl di acqua PCR Grade, la colonnina viene prima incubata per 2 minuti in condizioni aerobiche ed infine centrifugata a 14000 RPM per 2

minuti. L'eluizione è poi ripetuta aggiungendo 35 µl di acqua PCR Grade ottenendo un volume finale di 85 µl.

Amplificazione ed Ottimizzazione del cDNA

L'amplificazione del cDNA ha lo scopo di produrre sufficiente cDNA da destinare alla procedura di Sottrazione Selettiva che di solito necessita circa 2 µg di cDNA Driver.

80 µl di campione vengono miscelati con 220 µl di una Master composta da:
172 µl di acqua PCR Grade

30 µl di 10X Advantage 2 PCR Buffer (40 mM Tricine-KOH pH=8,7; 15 mM KOAc; 3,5 mM Mg(OAc)₂; 3,75 µg/ml BSA; 0,005% Tween 20; 0,005% Nonidet-P40)

6 µl 50X dNTP (10 mM)

6 µl 5' PCR Primer II a (12 µM)

6 µl 50X Advantage 2 Polymerase Mix (1% Glicerolo; 0,3 mM Tris-HCl pH=8; 1,5 mM KCl; 1 µM EDTA)

La miscela di volume finale di 300 µl viene suddivisa in 3 tubi chiamati A, B e C di 100 µl ciascuno.

Si coprono i campioni con una goccia di olio minerale per evitare l'evaporazione e si pongono in un termociclatore alle seguenti condizioni:

95°C per 1 minuto	} X 15 CICLI
95°C per 5 secondi	
65°C per 5 secondi	
68°C per 6 minuti	

Alla fine dei primi 15 cicli vengono prelevati 30 µl di campione dal tubo C e trasferiti in una eppendorf che verrà denominata "Ottimizzazione". I campioni A, B e i 70 µl di campione del tubo C vengono, invece, conservati a 4°C.

Dal tubo “Ottimizzazione” si prelevano 5 µl che serviranno per un’analisi elettroforetica, mentre i restanti 25 µl vengono sottoposti ad ulteriori 3 cicli. Dal tubo “Ottimizzazione”, che ha subito 18 cicli, vengono prelevati 5 µl per analisi elettroforetica ed i restanti 20 µl vengono sottoposti ad ulteriori 3 cicli. Il procedimento procede fino a che il tubo “Ottimizzazione” subisce 30 cicli totali (fig. 28).

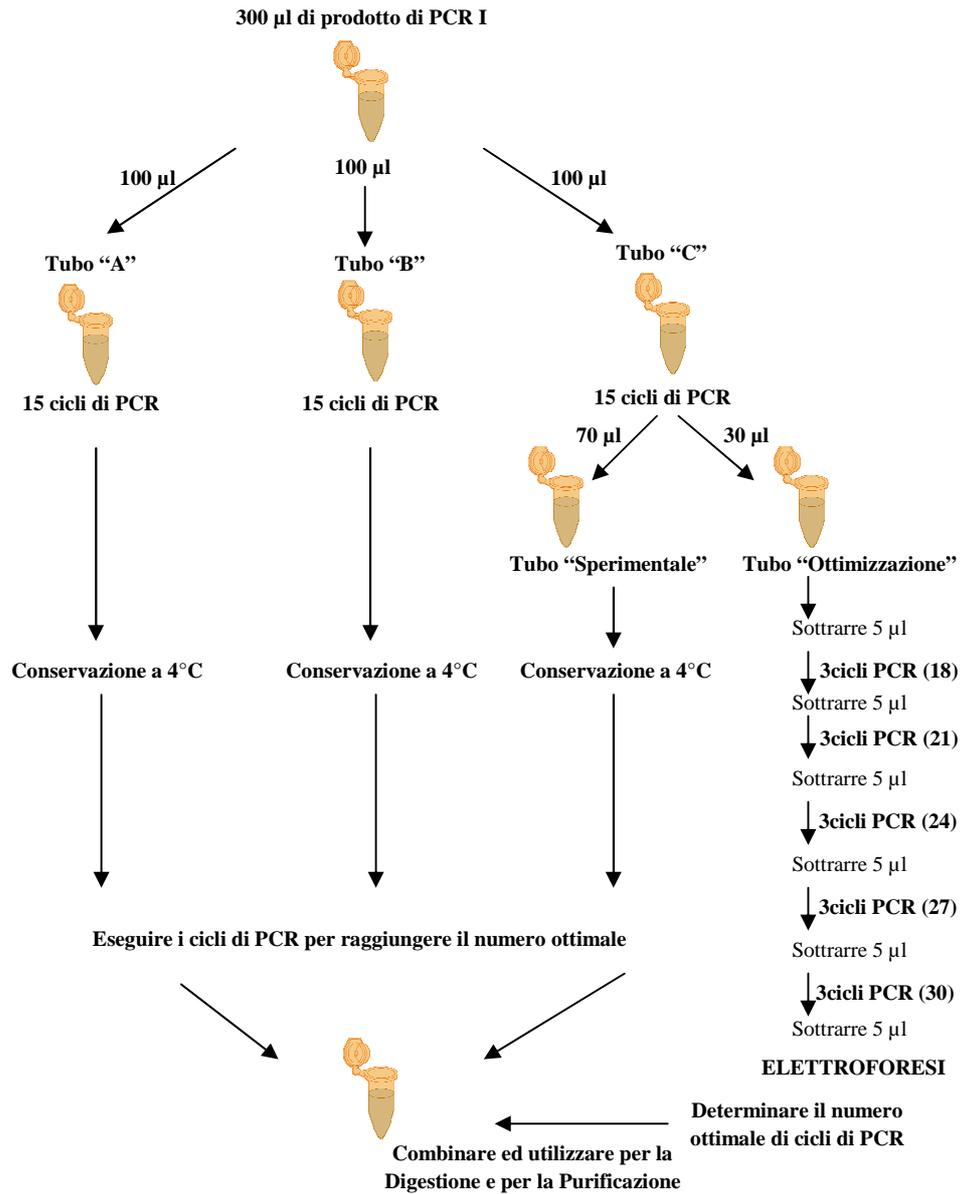


Figura 28– Schema di ottimizzazione dei cicli di PCR

Le aliquote da 5 μ l conservate vengono poi sottoposte ad analisi elettroforetica in gel all'1,2% di agarosio in 1X TBE Buffer (fig. 29).

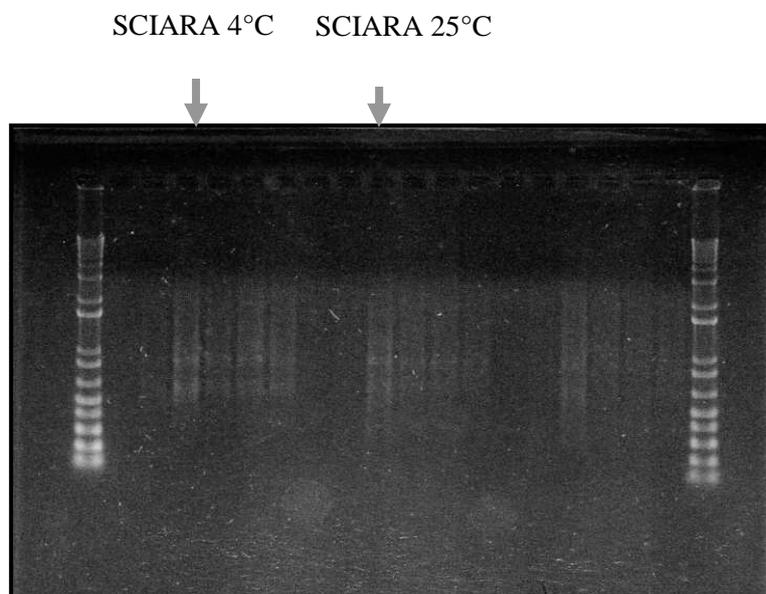


Figura 29 - Prodotti di PCR I che hanno subito 15, 21, 24, 27 e 30 cicli.

Pozzetto 2 = S 4°C 15 cicli
Pozzetto 3 = S 4°C 18 cicli
Pozzetto 4 = S 4°C 21 cicli
Pozzetto 5 = S 4°C 24 cicli
Pozzetto 6 = S 4°C 27 cicli
Pozzetto 7 = S 4°C 30 cicli

Pozzetto 8 = S 25°C 15 cicli
Pozzetto 9 = S 25°C 18 cicli
Pozzetto 10 = S 25°C 21 cicli
Pozzetto 11 = S 25°C 24 cicli
Pozzetto 12 = S 25°C 27 cicli

In base ad i risultati ottenuti si è deciso di effettuare un numero di cicli totale di 21 per i campioni Tarocco Sciara 4°C e 25°C. Infine sono stati aggiunti 2 μ l di EDTA a ciascun campione per bloccare la reazione.

Purificazione del cDNA

I campioni A, B ed i 70 μ l del tubo C vengono riuniti in un'unica eppendorf raggiungendo un volume finale di 270 μ l. Vengono prelevati 7 μ l di ogni campione per una analisi elettroforetica rappresentanti il Campione A (campione ottimizzato). Ad ogni campione viene aggiunto un egual volume di Fenolo:Cloroformio:Alcol Isoamilico (25:24:1). I successivi steps di

miscelamento e centrifugazione a 14000 RPM per 10 minuti permettono la separazione di fase. Il sovrinatante acquoso viene prelevato e parzialmente disidratato con l'aggiunta di 700 μ l di n-butanolo. Il procedimento con butanolo permette di concentrare il cDNA ad un volume di circa 40-70 μ l (un volume superiore a 70 μ l deve essere ulteriormente concentrato con l'aggiunta di butanolo mentre un volume inferiore a 40 μ l può essere corretto con l'aggiunta di acqua PCR Grade) mediante centrifugazione a 14000 RPM per 1 minuto e successivo scarto della fase acquosa. Il cDNA viene poi purificato utilizzando CHROMA SPIN-1000 Column (Clontech). La resina della colonna viene risospesa accuratamente per inversione e la colonna viene lasciata eluire per gravità. I campioni sono quindi caricati al centro della resina della colonna, si aggiungono 25 μ l di 1X TNE Buffer (10 mM Tris-HCl pH= 8; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA) e si lascia eluire completamente. L'aggiunta di 150 μ l di 1X TNE Buffer ed il suo drenaggio permette poi l'eluizione del cDNA purificato mediante l'aggiunta di 320 μ l di 1X TNE Buffer (10 μ l vengono conservati per l'analisi elettroforetica e rappresentano il CAMPIONE B). Per verificare eventuali residui di cDNA presenti nella resina si ripete una seconda eluizione con l'aggiunta di 75 μ l di 1X TNE Buffer, questo campione rappresenta il CAMPIONE C. (fig. 30)

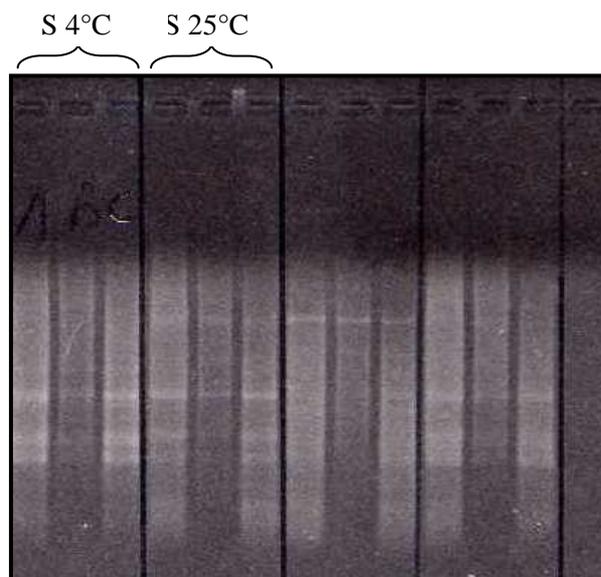


Figura 30- Purificazione del cDNA con CHROMA SPIN

Pozzetto 1 = S 4°C A	Pozzetto 4 = S 25°C A
Pozzetto 2 = S 4°C B	Pozzetto 5 = S 25°C B
Pozzetto 3 = S 4°C C	Pozzetto 6 = S 25°C C

Digestione del cDNA con RsaI

Questo passaggio genera frammenti più corti di cDNA con estremità libere necessari per la ligazione degli adattatori. Prima di procedere vengono messi da parte 10 µl di cDNA purificato per una successiva analisi elettroforetica (CAMPIONE D).

Ad ogni campione di cDNA purificato vengono aggiunti

36 µl di RsaI Restriction Buffer

1,5 µl di RsaI (10 U)

I campioni vengono poi incubati a 37°C per 3 ore e successivamente la reazione viene bloccata con l'aggiunta di 8 µl di 0,5 M EDTA. 10 µl di cDNA digerito vengono prelevati (CAMPIONE E). Al fine di confermare l'avvenuta digestione del cDNA i CAMPIONI D ed E vengono saggiati elettroforeticamente; prima della digestione il cDNA dovrebbe apparire come uno smear da 0,5-10 kb con bande brillanti rappresentanti l'abbondante mRNA, dopo digestione lo smear dovrebbe essere compreso tra 0,1-2 kb (dato non mostrato).

Purificazione del cDNA digerito

Il cDNA digerito viene purificato utilizzando il kit QIAquick PCR Purification kit" (QIAGEN).

A 300 µl di campione vengono aggiunti 1500 µl di Buffer PB. La miscela viene suddivisa in 3 aliquote da 600 µl ciascuna delle quali viene caricata in una colonnina e centrifugata a 14000 RPM per 1 minuto. L'eluato viene quindi scartato e la resina viene lavata mediante l'aggiunta di 750 µl di Buffer PE e successiva centrifugazione. Per eluire il cDNA vengono aggiunti alla colonna 50 µl di Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5).

Il cDNA così ottenuto viene poi precipitato con l'aggiunta di 187 µl di 4 M Ammonio Acetato e 1406 µl di etanolo al 95% e successiva centrifugazione a 14000 RPM per 20 minuti. Il sovrantante viene poi rimosso e vengono aggiunti 500 µl di etanolo all'80%. I campioni vengono centrifugati per 10

min a 14000 RPM, il sovrinatante viene scartato e si lasciano asciugare in air-dry per 10 min.

I campioni sono stati risospesi in 6,7 μ l di acqua PCR Grade. Un'aliquota di 1,2 μ l di cDNA è stata aggiunta ad 11 μ l di PCR Grade (diluizione 1:10) per formare il CAMPIONE G. Un'analisi elettroforetica viene effettuata sui CAMPIONI E (cDNA digerito) e G (cDNA digerito e purificato) per stimare la percentuale di prodotto di PCR RsaI-digerito rimane dopo la purificazione e la precipitazione in etanolo (Fig. 31).

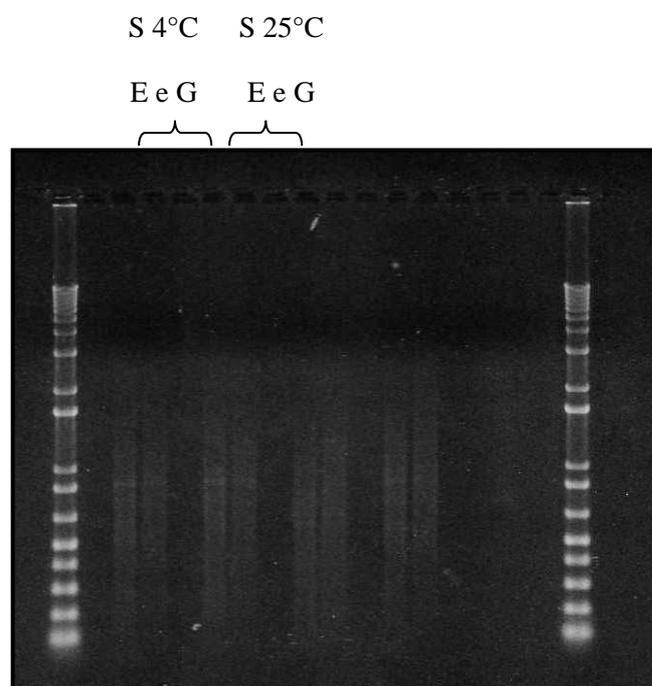


Figura 31- Gel elettroforetico del cDNA digerito e del cDNA purificato

Pozzetto 4 = S 4°C – campione E

Pozzetto 7 = S 25°C – campione E

Pozzetto 5 = S 4°C – campione G

Pozzetto 8 = S 25°C – campione G

2.7 COSTRUZIONE DELLA LIBRERIA SOTTRATTIVA

L'obiettivo del lavoro sviluppato durante il dottorato di ricerca ha riguardato l'identificazione dei geni differenzialmente espressi nella polpa di arancia pigmentata Tarocco Sciara, frigoconservata rispetto a quella conservata a temperatura ambiente, e a tal proposito si è scelto di costruire una libreria sottrattiva di cDNA in modo da identificare trascritti differenziali presenti nella polpa che subisce stress da freddo. Successivamente, si è effettuato il monitoraggio del pattern di espressione dei geni differenzialmente espressi a freddo precedentemente identificati, ed in particolare tutti i geni implicati nella biosintesi delle antocianine e in quella dell'ABA. Il monitoraggio dell'espressione genica è stato condotto in due momenti diversi e con due tempistiche differenti: in una prima analisi sono state valutate le modifiche genetiche che il frutto ha messo in atto per sfuggire ad una situazione di stress da freddo protrattosi nel tempo, e più precisamente per un periodo di 77 giorni; in seconda analisi si sono valutate le variazioni di espressione dei geni coinvolti sia nella biosintesi delle antocianine sia nella biosintesi dell'acido abscissico concentrando l'attenzione sui primi 15 giorni di conservazione alle basse temperature. Per ottenere sequenze di cDNA differenzialmente espresse è stato utilizzato il metodo della ibridazione soppressiva sottrattiva (*Suppression Subtractive Hybridization, SSH*), la cui attuazione è stata resa possibile dall'impiego del *PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit* (BD Biosciences). Questa metodologia permette di ottenere librerie di cDNA arricchite di trascritti presenti soltanto in uno dei due campioni comparati (Diatchenko *et al.*, 1996a) e presenta la peculiarità di riuscire ad isolare anche sequenze poco espresse (Diatchenko *et al.*, 1996b). La tecnica della SSH comprende due ibridazioni sottrattive, seguite da due reazioni di PCR. Nella figura 32 è rappresentato il processo della SSH: ci riferiamo con il termine "tester" al cDNA ottenuto dall' RNA totale isolato dalla polpa frigoconservata e con il termine driver" al cDNA ottenuto dall'mRNA della polpa conservata a temperatura ambiente.

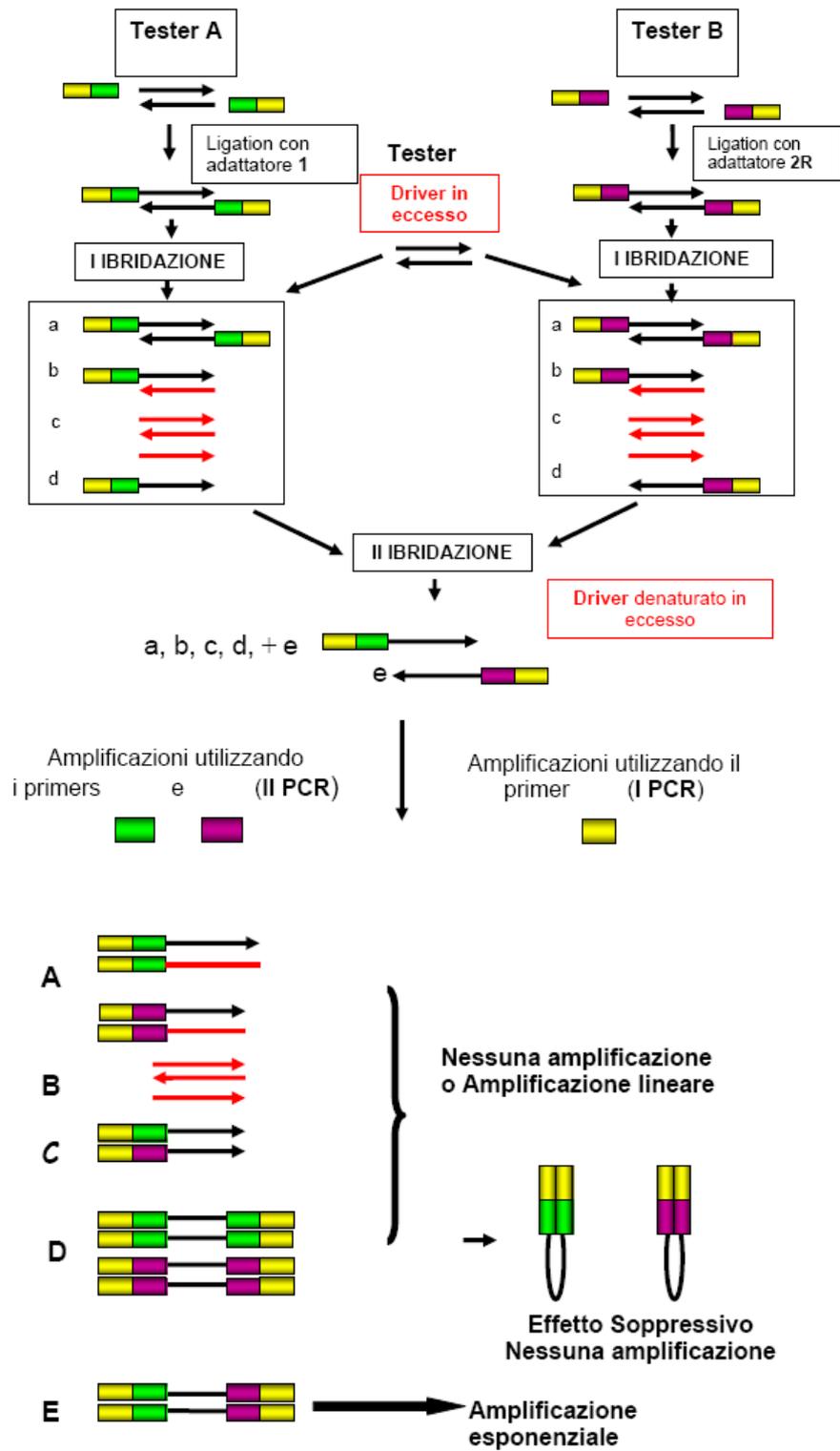


Figura 32 - Fasi della PCR-Select cDNA Subtraction

Come abbiamo detto precedentemente, il “tester”, contenente trascritti specifici e differentemente espressi, (Sciara 4°C) e il “driver” (Sciara 25°C) sono stati sintetizzati a partire da 1 µg di RNA totale, utilizzando il Super SMART PCR cDNA synthesis kit (BD Biosciences Clontech). Entrambi i cDNA sono stati digeriti con l’enzima di restrizione Rsa I, che produce frammenti blunt-ended (estremità non coesive), richiesti per la successiva *ligation* agli adattatori. Il cDNA del “tester” è stato suddiviso in due aliquote ed a ciascuna è stato legato un diverso adattatore: 1 e 2R. Gli adattatori, mancando del gruppo fosfato al 5’, si legano solo all’estremità 5’ del cDNA. Sono seguite due ibridazioni sottrattive successive. La prima è stata effettuata aggiungendo a ciascun “tester” denaturato, “driver” in eccesso. Durante questa fase la maggior parte dei trascritti del “tester” non differenziali si lega al “driver” e la rimanente frazione del “tester”, che rimane a singolo filamento risulta arricchita di sequenze differenzialmente espresse. Il cDNA non ibridizzato rappresenta quindi geni che sono espressi nel “tester” ed assenti nel “driver”, cioè geni espressi in seguito a stress da freddo. La seconda ibridazione è stata effettuata unendo i prodotti della prima ibridazione e aggiungendo “driver” denaturato in eccesso. Durante questo passaggio, oltre ad arricchirsi di sequenze differenzialmente espresse, la frazione a singolo filamento del *tester 1* ibriderà con la stessa frazione del *tester 2R*, formando una popolazione di sequenze differenzialmente espresse a doppio filamento caratterizzate dal fatto di essere asimmetricamente fiancheggiate dai due adattatori. Questo, insieme all’effetto soppressivo, rende possibile la loro amplificazione selettiva tramite due PCR successive utilizzando come primers sequenze complementari ai due adattatori (Federighi, 2006). La prima e la seconda amplificazione sono necessarie per isolare e arricchire rispettivamente i trascritti espressi differentemente. Il cDNA sottratto è stato utilizzato per generare la libreria.

2.7.1 Ligazione degli adattatori ai tester

Prima di legare gli adattatori ai “tester” (cDNA RsaI polpa Sciara 4°C), si procede preparando il controllo muscolo scheletrico “tester” cDNA, ottenuto diluendo 5 µl di φX174/Hae III Control DNA (150ng/ml) con 1 µl di controllo muscolo scheletrico cDNA. Non essendoci omologia tra il cDNA del muscolo e il genoma del fago tagliato dall’enzima di restrizione *Hae III*, dalla sottrazione tra “tester” (cDNA muscolo e genoma fago) e “driver” (cDNA muscolo), otterremo nell’analisi del gel elettroforetico solo bande relative al fago.

5,5 µl di cDNA digerito e purificato rappresentano il materiale di partenza. 1 µl viene utilizzato per la quantificazione allo spettrofotometro, mentre i restanti 4,5 µl sono diluiti con 2,5 µl di acqua PCR grade (volume finale 7 µl).

Per ciascun “tester” cDNA e per il controllo si prepara una master costituita da: 3 µl di acqua sterile, 2 µl di 5X Ligation buffer (250 mM Tris-HCl pH 7,8, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,25 mg/ml BSA) e 1 µl di T4 DNA Ligase (400 U). Per ciascun campione si prepara una miscela di reazione descritta nella seguente tabella (tab. 5).

	1	2
Componenti	Tester 1-1 (µl)	Tester 1-2 (µl)
Tester cDNA diluito	2	2
Adattatore 1 (10 µM)	2	-
Adattatore 2R (10 µM)	-	2
Master mix	6	6
Volume finale	10	10

Tabella 5 - Miscela della reazione di ligation

In un tubo pulito si miscelano 2 µl del *tester 1-1* e 2 µl di *tester 1-2*; a ligation avvenuta, questo campione rappresenterà il “tester” *controllo non*

sottratto 1-c. Si completa la fase di ligation dando uno spin ai “tester” ed ai campioni non sottratti ed incubandoli overnight a 16°C. Lo stesso viene eseguito per il controllo (muscolo scheletrico). In seguito ad incubazione, si aggiunge a ciascun campione 1 µl di EDTA/glicogeno per fermare la reazione di ligation, si incuba per 5 minuti a 72°C per inattivare la ligasi. Si preleva 1 µl dal controllo 1-c e si diluisce in 100 µl di acqua. Questa diluizione verrà poi analizzata durante la fase di PCR Amplificazione. I “tester” cDNA legati agli adattatori e il controllo 1-c vengono conservati a -20°C.

2.7.2 Analisi dell'efficienza della ligatione

Prima di procedere con l'ibridizzazione, è stato necessario verificare l'avvenuta ligation tra il “tester” cDNA e gli adattatori. 1 µl di *tester 1-1* (cDNA legato all'adattatore 1) e 1 µl di *tester 1-2* (cDNA legato all'adattatore 2R) sono stati diluiti con 50 µl di acqua sterile. In quattro tubi separati si sono preparate delle miscele con i volumi descritti nella tabella 6.

Componenti	Tubi (µl)			
	1	2	3	4
Tester 1-1 (legato all'adattatore 1)	10	10	-	-
Tester 1-2 (legato all'adattatore 2R)	-	-	10	10
PAL (o G3DH o GST-U) 3' Primer (10 µM)	1	1	1	1
PAL (o G3DH o GST-U) 5' Primer (10 µM)	-	1	-	1
PCR Primer I (10 µM)	1	-	1	-
Volume totale	12	12	12	12

Tabella 6 - Miscela analisi della ligation

Il PCR Primer I è specifico per entrambi gli adattatori ma può operare solo con il primer forward gene-specifico. I primers gene specifico sono stati disegnati sulle 600 bp del gene PAL (Fenilalaninammonio-liasi) omologhe

al 100% con il gene *Citrus sinensis*. Se i due primers gene-specifico si attaccano all'inserto da amplificare, si avranno bande da 600 bp, indice della presenza di cDNA; se invece saranno il primer forward gene-specifico e il primer PCR I a funzionare, le bande saranno di 700 bp, prova che la ligation è avvenuta.

PALfor 5'-GAT TTG AGA CAT TTG GAG GA-3'

PALrev 5'-ATG GAT GAA GCT CTC CAC TA-3'

Per verificare la ligation del controllo scheletrico cDNA, abbiamo utilizzato come primers gene-specifico, i primers G3PDH (Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) forniti dal kit. Anche in questo caso bande di 700 bp indicano l'avvenuta ligation, mentre bande di 520 bp dimostrano che il cDNA non è stato degradato.

G3PDH 5' 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH 3' 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Si prepara una master mix per ciascun tubo costituita da (tab. 7):

Componenti	(µl per Rxn)
Acqua sterile	9,5
10X PCR reaction buffer	2,5
dNTP Mix (10mM)	0,5
50X BD Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5
Volume totale	13

Tabella 7 - PCR master mix (analisi della ligation)

Si aggiunge la master a ciascun tubo, si miscela e si ricopre con una goccia di olio minerale. Si incuba la miscela di reazione per 5 minuti a 75°C in un termociclatore per estendere gli adattatori. Si procede mantenendo i campioni a 94°C per 30 secondi, seguiti da 25 cicli di PCR alle seguenti condizioni:

94°C per 30 secondi
 55°C per 1 minuto
 68°C per 2,5 minuti

} 25 cicli

Successivamente 20 µl di ciascun campione sono stati analizzati in un gel al 2% di agarosio (fig. 33).

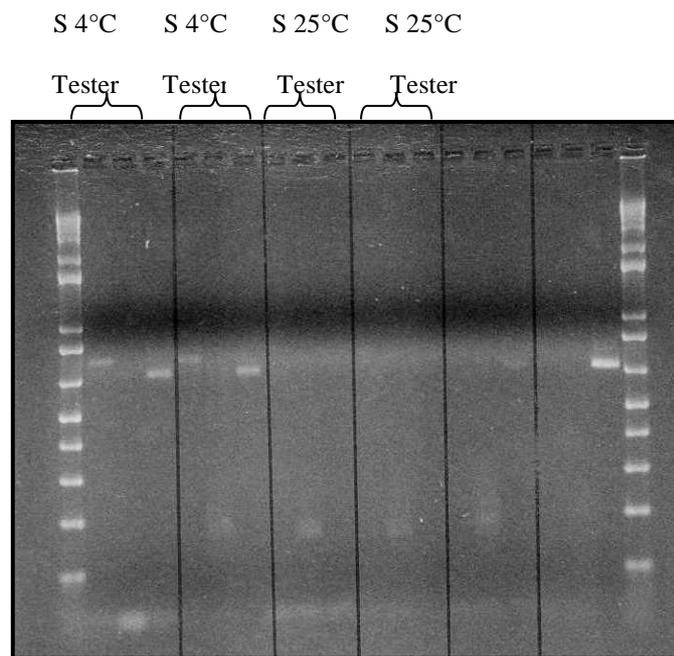


Figura 33- Analisi dell'efficienza della ligazione

Pozzetti 2, 3 e 4 = S 4°C – Tester 1-1 Pozzetti 8, 9 e 10 = S 25°C – Tester 1-1

Pozzetti 5, 6 e 7 = S 4°C – Tester 1-2 Pozzetti 11, 12 e 13 = S 25°C – Tester 1-2

2.7.3 Prima ibridizzazione

In questa fase si aggiunge ad entrambi i “tester” un eccesso di “driver” (polpa 25°C), segue la denaturazione ad alte temperature, l’appaiamento e l’ibridizzazione. Il “driver” utilizzato con un volume di 3 µl, è stato diluito con 1 µl di acqua PCR grade (volume finale 4 µl). In due tubi puliti si miscelano i reagenti della tabella 8.

	1	2
Componenti	Tester 1-1 (µl)	Tester 1-2 (µl)
Rsa I-digested driver cDNA	1,5	1,5
Tester 1-1 legato all’ adattatore 1	1,5	-
Tester 1-2 legato all’ adattatore 2R	-	1,5
4X Hybridization Buffer	1,0	1,0
Volume finale	4,0	4,0

Tabella 8- Miscela I Ibridizzazione

Si ricoprono i campioni con una goccia di olio minerale e si incuba a 98°C per 1,5 minuti e a 68°C per 8 ore.

2.7.4 Seconda ibridizzazione

In questa fase i campioni della I ibridazione sono stati miscelati ed un eccesso di “driver” denaturato viene aggiunto per arricchire ulteriormente le sequenze differenzialmente espresse. 1 µl di “driver” cDNA viene miscelato con 0,25 µl di 4X Hybridization Buffer e viene ricoperto con una goccia di olio minerale. Si incuba a 98°C per 1,5 minuti al fine di denaturare il “driver”. Per miscelare i campioni che hanno subito la prima ibridizzazione con l’eccesso di “driver”, si procede come segue: si setta la micropipetta a 15 µl e si preleva il campione (*tester 1-2* ibridizzato), ponendo attenzione a non aspirare l’olio minerale, si rimuove la pipetta dal tubo, si fa entrare un po’ di aria, si preleva allo stesso modo l’eccesso di “driver”. In questo modo

nel puntale saranno presenti sia il *tester 1-2* ibridizzato sia il “driver” denaturato, separati da una piccola bolla d’aria. Si trasferisce la miscela nel tubo contenente il campione *tester 1-1* (volume finale 9,25 µl) . Si miscela per pipettamento e si incuba a 68°C over-night. Il giorno dopo si aggiungono 50 µl di Dilution Buffer (20 mM HEPES pH 6,6, 20 mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH 8), si miscela e si riscalda il campione a 68°C per 7 minuti.

2.7.5 Amplificazione PCR

Per amplificare i geni differentemente espressi, il cDNA è sottoposto a due amplificazioni. Nella prima, solo il cDNA con i due adattatori legati alle estremità viene amplificato; nella seconda, il Nested PCR primer è utilizzato per ridurre il background e arricchire di sequenze differentemente espresse. Si prelevano 10 µl di campione che ha subito le due ibridizzazioni e 10 µl di campione 1-c (diluito in 100 µl) e si portano ad un volume di 25 µl, aggiungendo una master costituita dai reagenti riportati in tabella 9.

Componenti	(µl per Rxn)
Acqua sterile	10
10X PCR reaction buffer	2,5
dNTP Mix (10 mM)	0,5
PCR Primer I (10 µM)	1,5
50X BD Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5
Volume totale	15

Tabella 9- Miscela PCR primaria

Il PCR primer I funziona sia da forward che da reverse, per questo si utilizza un solo primer. A questo punto, si ricopre ciascun campione con 50 µl di olio minerale, si incuba per 5 minuti a 75°C per estendere gli adattatori, e si effettuano 30 cicli alle seguenti condizioni:

94°C per 25 secondi
 64°C per 30 secondi
 71°C per 1,5 minuti

} 30 cicli

8 µl di prodotto di PCR sono messi da parte per l'analisi elettroforetica, 1 µl tal quale invece viene utilizzato per la II PCR Amplification ed è addizionato a 24 µl di master che contiene i reagenti della tabella 10.

Componenti	(µl per Rxn)
Acqua sterile	18,5
10X PCR reaction buffer	2,5
dNTP mix (10 mM)	0,5
Nested PCR Primer I (10 µM)	1,0
Nested PCR Primer 2R (10 µM)	1,0
50X BD Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5
Volume totale	24

Tabella 10 - Miscela PCR secondaria

I campioni vengono miscelati al vortex, ricoperti di una goccia di olio minerale e sottoposti a 15 cicli di PCR, alle seguenti temperature:

94°C per 30 secondi
 68°C per 30 secondi
 72°C per 1,5 minuti
 72°C per 5 minuti

} 30 cicli

L'ultimo step di 5 minuti a 72°C favorisce il posizionamento di adenine nelle estremità dei prodotti di PCR (fig. 34). L'adenilazione consentirà il clonaggio all'interno del plasmide pGem.

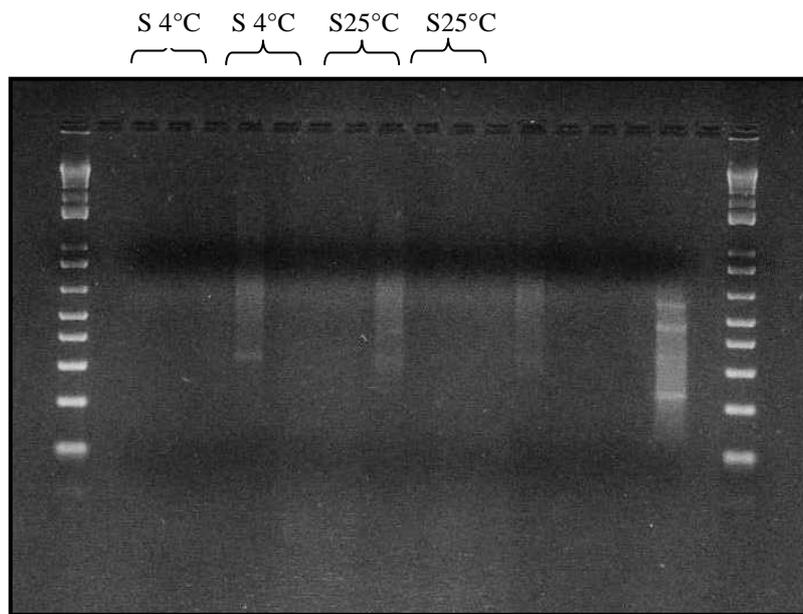


Figura 34 - PCR I e II dei campioni S 4°C, S 4°C 1-c, S 25°C, S 25°C 1-c

Pozzetto 3 = S 4°C PCR I

Pozzetto 7 = S 25°C PCR I

Pozzetto 4 = S 4°C PCR II

Pozzetto 8 = S 25°C PCR II

Pozzetto 5 = S 4°C 1-c PCR I

Pozzetto 9 = S 25°C 1-c PCR I

2.8 TRASFORMAZIONE DEI BATTERI COMPETENTI

Il cDNA differenzialmente espresso è stato inserito in un vettore di clonaggio (plasmide pGEM-T easy Vector) e trasformato in *E. coli* al fine di analizzare la libreria sottrattiva di cDNA.

2.8.1 Ligazione

Il vettore pGEM-T easy Vector (Promega) è stato mescolato con l'inserto (prodotto di PCR Amplification secondaria) in un rapporto di 1:4 in una soluzione costituita dal 2 Rapid Ligation Buffer e dalla ligasi del fago T4 (tab.11). La miscela è stata incubata over-night a 4°C.

Componenti	(µl per Rxn)
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5
pGEM	1
Prodotti di PCR secondari	4
T4 DNA Ligase	1
Volume totale	11

Tabella 11 – Miscela di ligazione

2.8.2 Trasformazione delle cellule competenti

Successivamente il plasmide ricombinante (11µl) viene inserito, attraverso il processo di trasformazione, all'interno di cellule ospiti JM109 High Efficiency Competent Cell (Promega), lasciando incubare per 30 minuti in ghiaccio. Si effettua poi lo shock termico da 42°C per 50 secondi a 0°C per due minuti. Il termoshock rende i batteri più permeabili al DNA plasmidico. Le cellule sono cresciute in 950 µl di terreno SOC Medium (2 g Bacto-Tryptone, 0,5 g Bacto East Extract, 1 ml NaCl 1M, 0,25 ml KCl 1 M, 1 ml Mg²⁺ stock, 1 ml glucose 2M; V = 100 ml) ed incubate per 1 h e 30' a 37°C in agitazione in modo da permetterne la crescita e consentire ai batteri trasformati di esprimere il gene per la resistenza all'antibiotico. In seguito 1000 µl di sospensione batterica sono stati piastrati su Petri-LB-Amp contenente antibiotico, X-Gal e IPTG e incubati *overnight* a 37°C.

PREPARAZIONE DEL TERRENO LB Agar – Amp (500 ml):

- 7,5g di agar
- 5 g di Bacto – Tryptone
- 2,5 g di Yeast extract
- 2,5g di NaCl
- Acqua distillata a volume
- pH 7,0 con NaOH

Si sterilizza in autoclave e quando raffreddato, si aggiungono 100 µg/ml di Ampicillina, 0,05 mM di IPTG 100 mM e 80 µg/ml di Xgal.

2.8.3 Screening delle colonie trasformate

Sulle colonie cresciute è stato eseguito uno *screening visivo* che consente di distinguere le colonie bianche positive alla trasformazione, e quindi contenenti il vettore in cui è avvenuta l'inserzione del frammento di interesse, da quelle blu-azzurre costituite da batteri che hanno inglobato vettori richiusi su se stessi o che non hanno ricevuto il plasmide (fig. 35).

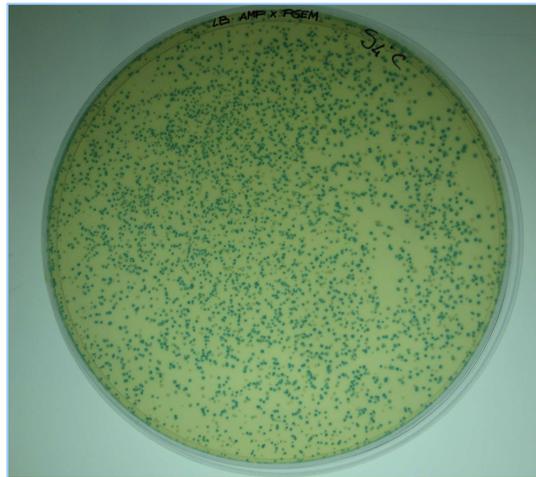


Figura 35- Colonie trasformate (Sciara 4°C)

2.8.4 Estrazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico trasformato in cellule competenti è stato estratto e purificato utilizzando Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen). I cloni (colonie bianche) sono stati inoculati in 6 ml di Brodo LB medium e ampicillina (100 µg/ml) e fatti crescere a 37°C su agitatore rotante per una notte.

L'isolamento plasmidico è stata effettuato utilizzando il kit di estrazione PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit che permette di isolare DNA plasmidico di ottima qualità da cellule di *E. coli* in 30-45 minuti. Le cellule sono lisate utilizzando una procedura alkaline/ SDS. Il lisato è applicato in una colonna con membrana di silice che selettivamente lega il DNA plasmidico. Dopo aver rimosso i contaminanti grazie al lavaggio con due Wash Buffers, il plasmide è eluito con TE Buffer e successivamente precipitato. I plasmidi precipitati sono stati successivamente sequenziati presso la MG Biotech e le sequenza ottenute sono state analizzate tramite il programma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e confrontate con le sequenze contenute in banca dati GenBank. Una volta identificate le sequenze si è proceduto costruendo i primers necessari all'amplificazione dei frammenti tramite RT-PCR. I primers sintetizzati specificatamente su sequenze note di enzimi sono riportate nella tabella 12.

ENZIMA	PRIMERS
Aldeide Ossidasi (AOXfor)	5'-AGTGAGCGAGGTGGAAGTA-3'
Aldeide Ossidasi (AOXrev)	5'-TCTGTCCTAAATCAACAGCAG-3'
Fosfomevalonato chinasi (PMKfor):	5'-GAGAGTTGGACTGTTGGGTA-3'
Fosfomevalonato chinasi (PMKrev):	5'-TGATGACGAGATCATCAGAC-3'
Farnesil difosfato sintase (FDPSfor):	5'-GGAATTTCAAACAGCTTCAGG-3'
Farnesil difosfato sintase (FDPSrev):	5'-GAACAATGCGACGATGAAGT-3'
Fosfoenolpiruvato traslocatore (PEPtrfor)	5'-TCAGTTTGGTGTGGGAAC-3'
Fosfoenolpiruvato traslocatore (PEPtrrev)	5'-CGGCAAAATAGCTGCAAG-3'
Isopentenil pirofosfato sintase (IPPSfor):	5'-CGAATTCAAAGACTCCATCT-3'
Isopentenil pirofosfato sintase (IPPSrev):	5'-CCTCATGTTTGAAGACGAAT-3'
2-deidro-3-deossifosfoeptonato aldolasi (DAHPfor)	5'-TAGCACAGCTGCTAAACTTG-3'
2-deidro-3deossifosfoeptonato aldolasi (DAHPrev)	5'-GATTAGCTCACAGCAACCTC-3'
Corismato mutasi (CORISmutfor)	5'-AACTGAAAAACTTCACTCCAA-3'
Corismato mutasi (CORISmutrev)	5'-CTGCATAGGTGGCAACA-3'
Fenilalanina-ammonioliasi (PALfor)	5'-GATTTGAGACATTTGGAGGA-3'
Fenilalanina-ammonioliasi (PALrev)	5'-ATGGATGAAGCTCTCCAC TA-3'
CumaroilCoA for	5'-TCGACATCCCCGCTCTTG-3'
CumaroilCoA rev	5'-AAATATAAAGTGACGGTTGCG-3'
Calcione sintasi (CHSfor)	5'-TCTATCGACGGGCATCTTC-3'
Calcione sintasi (CHSrev)	5'-TGCCTCGGTTAGGCTTTTC-3'
Citrato liasi (CITRLYASEfor)	5'-TTCAACCATCTCTGATGACA-3'

Citrato liasi (CITRLYASErev)	5'-GGAAATAACATCACCCACAC-3'
Antocianidina sintasi (ANSfor):	5'-GGG TGACTGCTAAATGTGTT-3'
Antocianidina sintasi (ANSrev):	5'-CAAGTCCCCTGTGAAGAATA-3'
Diidroflavinolo reduttasi (DFRfor)	5'-GCTGTTTCGTGCTACTGTTC-3'
Diidroflavinolo reduttasi (DFRrev)	5'-GGCTAAATCGGCTTTCCATA-3'
UDP-glucosio:flavonoide 3-O-glucosiltrasferasi (UFGTfor)	5'-TCTTCAGCACTCCGCAATC-3'
UDP-glucosio:flavonoide 3-O-glucosiltrasferasi (UFGTrev)	5'-TCCATCGGATACGTCGTAAG-3'
Glutazione S Traseferase (GSTfor):	5'-GCAGCAAAGTATGCAAACC-3'
Glutazione S Traseferase(GSTrev):	5'-GTCATTGAAATTGTGTGCTTC-3'
Fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEP-CKfor)	5'-ACAAGCTGAGAATGTTGC-3'
Fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEP-CKrev)	5'-AAGTTGAGCTTGGAACAG-3'
Elongation factors (EFfor):	5'-GGCTAGGTACGATGAAATTG-3'
Elongation factors (Efrev):	5'-GTTGTCACCCTCGAAACC-3'
9-cis-epossi carotenoide diossigenasi 1 (NCED1for):	5'-GATGACTTGCCTTATCACG-3'
9-cis-epossi carotenoide diossigenasi 1 (NCED1rev):	5'- ATGAGCTATCATCGTGGAC-3'
9-cis-epossi carotenoide diossigenasi 2 (NCED2for):	5'-ATAGCCTATCCGAAAGTTGA-3'
9-cis-epossi carotenoide diossigenasi 2 (NCED2rev):	5'- TCTCCATCAGCAGAAAATCT-3'
Transcription Factor CX (TF-Cxfor):	5'TGGATTTGCAAGCATATAATC-3'
Transcription Factor CX (TF-Cxrev):	5'-AAAGAACCCCCACGTAATAA-3'
Transcription Factor NAC-Like (TF-NACfor):	5'-ACTATTTGTGCCGTAATGC-3'
Transcription Factor NAC-Like (TF-NACrev):	5'- TTGGATACTTCCGATCCCTA-3'

Tabella 12 – Primers utilizzati per la RT-PCR

2.9 RT-REAL TIME PCR

2.9.1 Principi della RT-REAL TIME PCR

La reazione polimerasica a catena (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) viene utilizzata per amplificare un particolare frammento di DNA da una miscela complessa di materiale di partenza, chiamata DNA stampo, che in molti casi richiede un basso livello di purificazione. Il risultato della PCR è la produzione di tratti di DNA complementari, sulla base di quelli già esistenti (Wilson *et al.*, 2006). Perché una qualsiasi reazione di PCR possa avere luogo, devono essere presenti i seguenti reagenti: una quantità del segmento di DNA che si desidera riprodurre, le quattro componenti nucleotidiche del DNA, un tampone con una concentrazione ottimale di magnesio, una coppia di primers e la DNA polimerasi. I primers sono degli oligonucleotidi di sintesi a singolo filamento, solitamente lunghi dalle 20 alle 25 basi, complementari al DNA stampo e che assolvono a due funzioni. Primo, ibridandosi con lo stampo forniscono un'estremità 3' che può essere estesa dalla DNA polimerasi. Secondo, conferiscono la specificità alla reazione di amplificazione, poiché sono progettati in modo da fiancheggiare la sequenza bersaglio da amplificare. La PCR è un processo ciclico dipendente dalla temperatura, completamente controllato ed automatizzato in un thermal cycler. Nella prima fase, viene utilizzata una temperatura elevata (ad es. 95°C) per *denaturare* il DNA stampo a doppio filamento. Nella seconda fase, la temperatura è portata ad un valore inferiore (ad es. 50-60°C), consentendo ai primer di ibridarsi con il DNA stampo (*annealing*). Nella terza fase, la temperatura viene ulteriormente ridotta in modo da consentire la sintesi di nuovi filamenti di DNA (*estensione*). Nei dosaggi di PCR è comunemente utilizzata la Taq polimerasi, una DNA polimerasi termostabile isolata dal batterio *Thermus aquaticus*. Dopo un ciclo, il DNA bersaglio viene duplicato, ed i nuovi prodotti fungono quindi da stampo per la sintesi del DNA in tutti i cicli successivi. Per l'amplificazione del

bersaglio si eseguono solitamente dai 30 ai 40 cicli, determinando la formazione di un elevato numero di copie del DNA (fig. 36). Una volta che l'amplificazione è completa, i prodotti devono essere osservati tramite una serie di passaggi di rivelazione post-PCR. La metodica più comunemente utilizzata per questo scopo è l'elettroforesi su gel. Il gel può quindi essere colorato con il bromuro di etidio, ed i prodotti possono essere osservati utilizzando la luce ultravioletta.

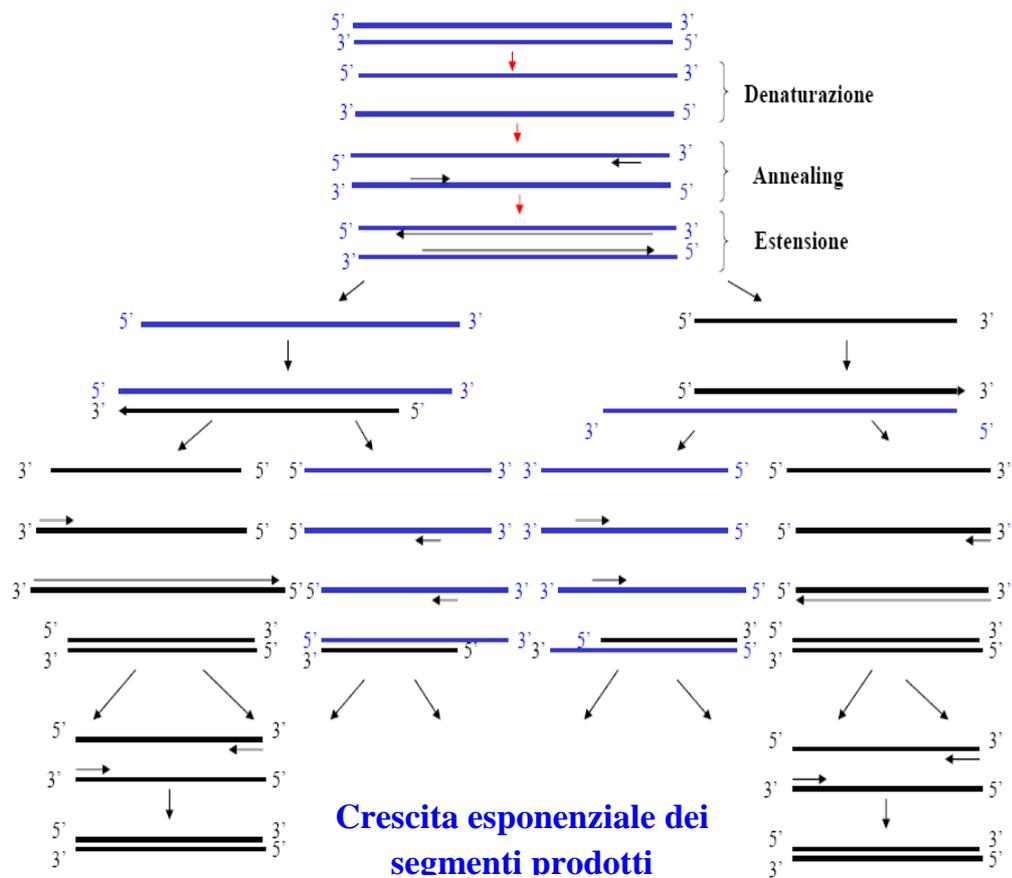


Figura 36 – Schema della PCR

La PCR “in tempo reale”, o PCR “a rivelazione simultanea”, o PCR cinetica, utilizza una strategia che consente di rilevare l’amplificato nel momento stesso in cui si forma (Heid *et al.*, 1996). Questa si basa sull’impiego di leganti fluorescenti, o di sonde marcate con composti fluorescenti, oppure di inneschi a marcatura fluorescente, che forniscono un segnale la cui intensità, misurabile in ogni singolo istante, è direttamente

correlata con la quantità di amplificato in quello stesso istante (Marin, 1999). Esistono due configurazioni del sistema di rivelazione: si possono utilizzare sonde sequenza-specifiche marcate con fluorofori oppure composti fluorescenti che si legano in modo aspecifico alla doppia elica del DNA, come il SYBR Green.

Il primo tipo di approccio è sicuramente molto più costoso. L'apprezzamento della quantità di acido nucleico è affidata alla rivelazione e conseguente quantificazione di un "reporter" fluorescente il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione. A tal proposito viene disegnata una sonda gene-specifica che si appaia nella zona compresa fra i due primers (forward e reverse); tale sonda contiene un colorante fluorescente (Reporter), solitamente di colore verde, all'estremità 5' ed un colorante quencher (letteralmente "spegnitore"), di colore rosso, all'estremità 3'. In condizioni di normale appaiamento sonda-stampo, il campione viene irradiato, l'energia fluorescente emessa dal colorante ad alta energia in 5' viene assorbita totalmente dal quencher a bassa energia. Fintantoché la sonda resta intatta la vicinanza tra reporter fluorescente e quencher annulla l'emissione del segnale di fluorescenza perché si verifica un trasferimento di energia dal primo al secondo. Nel momento in cui la DNA-polimerase, replicando lo stampo, incontra la sonda appaiata al suo interno, grazie alla sua attività esonucleasica 5'-3', comincia a degradarla (fig. 37). L'allontanamento tra reporter e quencher consente di rilevare l'emissione di fluorescenza del reporter dye. Questa incrementerà ad ogni ciclo proporzionalmente al tasso di degradazione della sonda. L'accumularsi del prodotto amplificato è rivelato monitorando per l'appunto l'incremento di fluorescenza del reporter. Più grande è il numero delle copie iniziali dell'acido nucleico di interesse, prima si osserverà un aumento significativo della fluorescenza. Un significativo incremento della fluorescenza, che superi il valore della linea di base entro i primi 3-15 cicli, indica la rivelazione di un prodotto di PCR che si è accumulato. L'operatore solitamente fissa una soglia di fluorescenza, ben al di sopra di quella di

base, il parametro CT (ciclo di soglia) viene quindi definito come il numero di cicli necessari perché l'emissione fluorescente superi tale soglia. Per valutare il livello di espressione genica tra i vari campioni è necessario confrontarlo con dati relativi all'espressione di un secondo gene scelto come controllo interno. Quest'ultimo deve essere caratterizzato da una certa abbondanza e costanza nell'espressione tra i diversi campioni, rispetto all'RNA Totale. Nel caso di studio su geni estratti da tessuti vegetali, si utilizza come gene-controllo (normalizer) il gene EF codificante per la proteina elongation factor (EF).

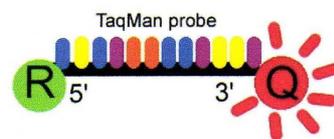


Fig 2.17- Sonda con reporter fluorescente in 5' e quencher in 3'.

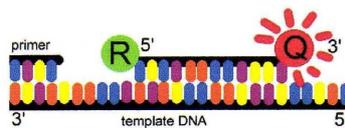


Fig 2.18- Appaiamento tra sonda e stampo.

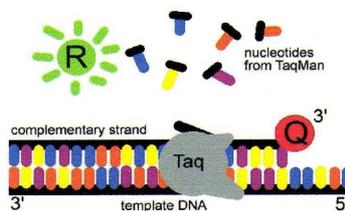


Figura 37- la Taq polimerasi, avanzando sullo stampo per sintetizzare il nuovo filamento complementare allo stampo, degrada, con la sua attività esonucleasica 5'-3', la sonda. Il reporter così sganciato dal quencher comincia ad emettere fluorescenza.

Il secondo approccio prevede l'utilizzo del SYBR Green, un composto organico aromatico (facente parte del gruppo delle cianidine) ed avente proprietà fluorofore, che si lega al DNA a doppio filamento, intercalandosi nella molecola di DNA. Man mano che la PCR produce DNA a doppio filamento, la fluorescenza aumenta in seguito al legame del colorante con i prodotti di amplificazione (Wittwer *et al.*, 1997). Il valore della fluorescenza

emessa è misurata ad ogni ciclo, ed è rappresentativo della quantità di prodotto sintetizzata fino a quel punto. Maggiore è la quantità del trascritto presente all'inizio della reazione, minore numero di cicli serviranno a raggiungere il punto in cui il segnale risulta essere statisticamente significativo, rispetto al segnale di fondo (Gibson *et al.*, 1996). Le molecole come il *Sybr green* (fig. 38) sono altamente fluorescenti solo quando sono intercalate nella doppia elica di DNA. Quando il DNA è in stato di singolo filamento le molecole di *Sybr green* non si legano alle basi del DNA e la fluorescenza emessa è molto bassa. A seguito della polimerizzazione da parte della Taq polimerasi le molecole di *Sybr green* si trovano intercalate nel DNA a doppia elica. Maggiore è il numero di molecole di fluoroforo intercalate maggiore è il segnale di fluorescenza (fig. 39).

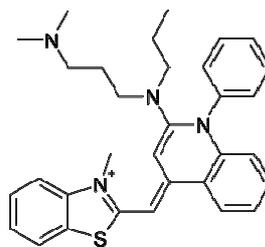


Figura 38-SYBR Green

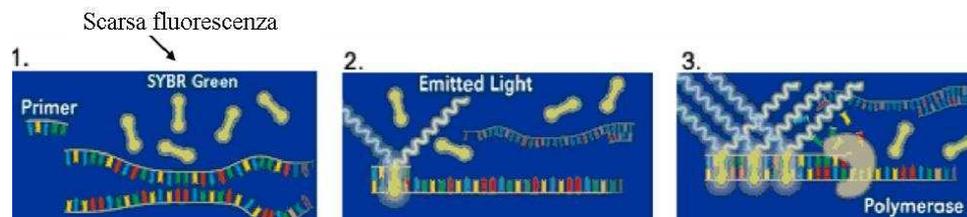


Figura 39 – Schema della RT-PCR con SYBR Green

I vantaggi dell'utilizzo del *Sybr green* sono l'estrema versatilità (può essere utilizzato con qualunque coppia di primers), l'economicità e l'intenso segnale di fluorescenza. Il metodo possiede tuttavia lo svantaggio di produrre un segnale non specifico poiché la molecola può legarsi anche a sequenze di DNA aspecifico, generando falsi positivi. L'ostacolo può essere parzialmente superato effettuando una curva di dissociazione (*melting*

curve) al termine della corsa di PCR. La curva di *melting* consiste in un aumento graduale della temperatura da 50°C, condizione in cui tutto il DNA è a doppia elica e la fluorescenza è massima, a 94°C, temperatura alla quale tutto il DNA è in forma dissociata e la fluorescenza è minima. Ogni frammento di DNA a doppia elica si dissocia ad una caratteristica temperatura, chiamata temperatura di *melting* (T_m), che è definita come la temperatura alla quale il 50% del DNA è in forma di singolo filamento. Alla temperatura corrispondente al T_m dei prodotti di PCR si noterà un flesso nella curva di *melting*. I flessi di fluorescenza, per comodità, vengono trasformati in picchi eseguendo la derivata prima con segno negativo della curva e quindi si potrà valutare se durante la PCR si sono formati prodotti aspecifici o secondari. Se i flessi di fluorescenza sono più di uno, si evince che nella reazione di PCR si sono formati amplificati aspecifici. A differenza di ciò che avviene in una PCR qualitativa o “*end-point*”, in cui l’amplificato viene apprezzato nella fase finale della reazione (*plateau* dovuto all’esaurimento dei nucleotidi e alla diminuita efficienza della Taq polimerasi), nella Real-time PCR la quantificazione avviene durante la fase esponenziale dell’amplificazione. Nella curva di amplificazione, ossia dal diagramma del segnale di fluorescenza ottenuto rispetto al numero di cicli, si possono distinguere tre fasi:

1. *Fase esponenziale*: ciascun prodotto di amplificazione raddoppia esattamente ad ogni ciclo di amplificazione.
2. *Fase lineare*: (alta variabilità) i componenti della reazione sono stati consumati; la reazione rallenta ed i prodotti si degradano.
3. *Fase di Plateau*: la reazione si ferma, non si creano più prodotti e se si attende troppo, essi si degradano (fig. 40).

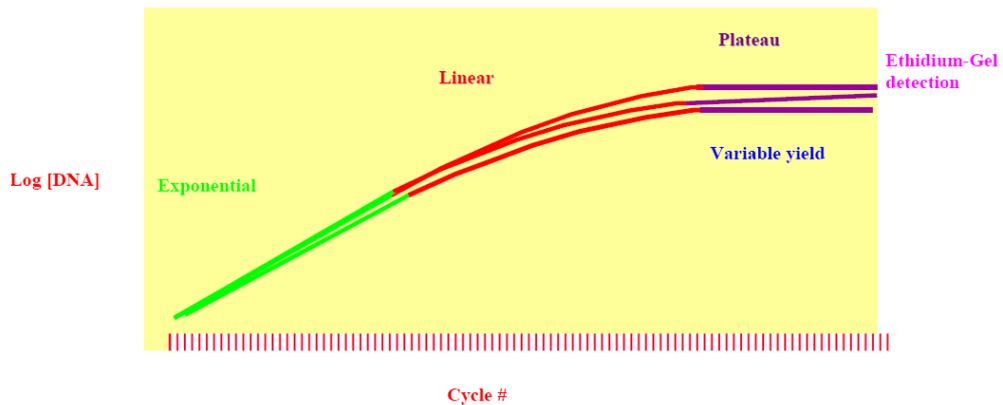


Figura 40 – Fasi della RT- PCR

I parametri che caratterizzano il grafico delle curve di amplificazione di un'analisi di Real-time PCR sono:

- linea di base (*baseline*): linea orizzontale che indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo di fluorescenza;
- linea di soglia (*threshold line*): linea parallela alla linea di base, che interpola le curve di amplificazione nella fase esponenziale (può essere posizionata automaticamente dal software o autonomamente dall'operatore);
- ciclo di soglia (*Ct*) (*threshold cycle*): ciclo di PCR misurato per ciascun campione, in cui la curva di amplificazione interseca la linea di soglia (fig. 41).

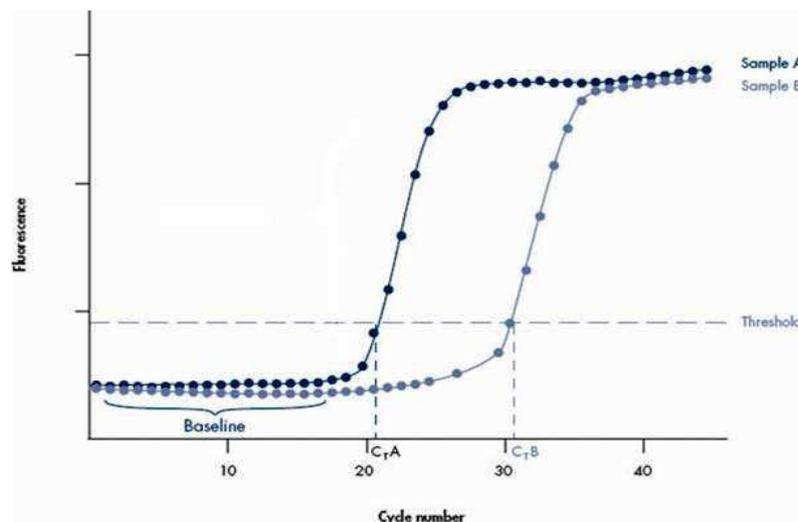


Figura 41 – Parametri della curva di amplificazione

2.9.2 Esecuzione della RT-REAL TIME PCR

Le RT-PCR sono state effettuate su cDNA predigerito e purificato con CHROMA SPIN COLUMN (10µl di Campione D) utilizzando una Master Mix composta da:

- 25 ng di cDNA stampo.
- 12,5 µl IQ SYBR GREEN Supermix
- 1 µl Primer for (100 pmol/µl)
- 1 µl Primer rev (100 pmol/µl)
- H₂O PCR GRADE a complement

Per un volume finale di 25 µl.

Le condizioni di RT-PCR per l'*aldeide ossidasi*, *2-deidro-3-deossifosfoeptonato aldolasi*, *antocianidina sintasi*, *elongation factors*, *Fosfomevalonato chinasi*, *Farnesil difosfato sintase* e *diidroflavonol 4-reduttasi* sono:

94°C per 2 minuti	} 45 cicli
94°C per 15 secondi	
54°C per 30 secondi	
72°C per 30 secondi	

Al variare dei primers la temperatura di appaiamento cambia:

- Per la *corismato mutasi* e *transcription factors-CX* la temperatura di annealing è di 51°C.
- Per la *fenilalaninaammonio-liasi*, *citrato liasi*, *isopentenil pirofosfato sintase*, *fosfoenolpiruvato traslocatore*, *transcription factor NAC-Like* e *fosfoenolpiruvato carbossichinasi* la temperatura di annealing è di 52°C.
- Per il *4-cumaroil CoA ligasi* e *calcone sintasi* la temperatura di annealing è di 56°C.
- Per l'*UDP-glucosio flavonoide 3-O-glucosiltrasferasi* la temperatura di annealing è di 55°C.

- Per il *glutathione-S-trasferasi* e *9-cis-epossi carotenoide diossigenasi 1* la temperatura di annealing è di 53°C.
- Per l'*9-cis-epossi carotenoide diossigenasi 2* la temperatura di annealing è di 52,5°C.

2.10 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) DI TIPO COMPETITIVO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ABSCISSICO

2.10.1 Preparazione dei campioni

I campioni di polpa conservati a -80°C vengono triturati in azoto liquido (-196°C), 1 g di campione polverizzato viene pesato e omogeneizzato in 10 ml di tampone di estrazione composto da: 80% Acetone, 0,5 g/l acido citrico, 20 mg/l idrossitoluene butilato (Hubick *et al.*, 1980). L'estratto viene centrifugato per 5 min a 3000 x g al fine di rimuovere materiale insolubile che precipita in forma di pellet. Il campione così ottenuto viene opportunamente diluito con TBS 1X (trizma base 3.03 g/l, cloruro di sodio 5.84 g/l, cloruro di magnesio 0.20 g/l e azide sodica 0.20 g/l-pH=7.5) e diviso in due frazioni: una tal quale che servirà a rilevare la concentrazione di ABA libera e quindi fisiologicamente attiva; e l'altra aliquota che subisce un processo di idrolisi per permettere di rilevare anche la concentrazione di ABA coniugato che viene liberato dal processo di idrolisi, ottenendo quindi la concentrazione di ABA totale nel campione. L'idrolisi dei campioni viene condotta trattando l'estratto per 1 ora a pH=11 a 60°C. Trascorsa l'incubazione gli estratti vengono neutralizzati.

2.10.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay “ELISA”

ELISA è l'acronimo dell'espressione inglese “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”.

La determinazione dell'ormone ABA è stata effettuata utilizzando il kit “Phytodetek® ABA Test Kit” (Agdia).

Il test per la quantificazione dell'acido abscissico nelle piante utilizza un anticorpo monoclonale anti-ABA (Weiler, 1984) ed è sensibile nel range di 0,0064-0,16 picomoli ABA/ml (Mertens *et al.*, 1985, Mertens *et al.*, 1983, Weiler, 1980, Weiler, 1979). Il principio del saggio sfrutta il metodo di misura basato sul legame di tipo competitivo dell'anticorpo. Il tracers diventa marcato legandovi covalentemente un enzima; la scelta dell'enzima da usare come marcatore dipende primariamente dalla sua applicazione, gli enzimi comunemente usati sono la fosfatasi alcalina, la glucosio-6-fosfato deidrogenasi, la β -glucuronidasi e la perossidasi. Nel kit utilizzato il marcatore è rappresentato da una fosfatasi alcalina che viene miscelata ai campioni e di conseguenza aggiunta nei micropozetti ricoperti di anticorpo. Una reazione di legame di tipo competitivo si instaura tra un quantitativo sempre costante di ABA-Tracer, una scarsa quantità di anticorpo e il campione con concentrazioni di ABA sconosciute. L'ABA nel campione compete con l'ABA-Tracer per il legame con il sito dell'anticorpo. L'ABA-Tracer non legato viene eliminato prima dell'aggiunta del substrato, di conseguenza il colore giallo prodotto è inversamente proporzionale alla quantità di ormone nella pianta. L'intensità del colore viene correlata alla concentrazione di ABA nel campione grazie alla costruzione di una curva standard.

Il protocollo prevede le seguenti fasi.

Preparazione dell'ABA-Tracer

L'ABA-Tracer deve essere diluito aggiungendo 1 ml di acqua distillata, si incuba per 5 minuti per permettere la completa risospensione del

liofilizzato. Si aggiungono poi 4 ml di Tracer Diluent (TBS) (Trizma base 3.03 g/l, cloruro di sodio 5.84 g/l, cloruro di magnesio 0.20 g/l e azide sodica 0.20 g/l-pH=7.5) e si agita vigorosamente.

Preparazione degli standard costituenti la curva

Le soluzioni standard posseggono un quantitativo conosciuto di ABA. Per la preparazione dei punti della curva si utilizza la forma di acido abscissico attiva e cioè 2-*cis*-(S)-ABA (Weiler, 1982, Weiler, 1981). La soluzione madre di acido abscissico ha una concentrazione di 0.1 μ mol ABA/ml (Stock Solution, SS). Le successive diluizioni sono state effettuate come mostrato in tabella 13.

Standard	ABA Solution	TBS Buffer	Picomoli ABA/ml	Dilution
A1= NSB	50 μ l SS	4.95 ml	1000	1:100
B1	200 μ l A1	1.80 ml	100	1:10
C1	500 μ l B1	2 ml	20	1:5
D1	500 μ l C1	2 ml	4	1:5
E1	500 μ l D1	2 ml	0.8	1:5
F1	500 μ l E1	2 ml	0.16	1:5
G1	500 μ l F1	2 ml	0.032	1:5
H1=B ₀	100 μ l TBS	-	-	-

Tabella 13

Preparazione della Substrate Solution

Una compressa di Substrato viene disciolta in 5 ml di Substrate Solution (cloruro di magnesio 0.1 g/l, azide sodica 0.2 g/l, dietilamina 97 ml/l-pH=9.8).

Ogni pozzetto della piastra ELISA è dedicato ad accogliere sia gli standard sia i campioni idrolizzati e non. In differenti pozzetti, quindi, si aggiungono 100 μ l di soluzioni standard, 100 μ l di campione tal quale e 100 μ l di campioni idrolizzati. È conveniente effettuare una prova in doppio per ogni soluzione (standard o campione che sia). Ad ogni pozzetto vengono aggiunti

100 µl di Tracer diluito. Dopo aver agitato delicatamente, la piastra viene incubata per 3 ore a 4°C in un contenitore umido. Dopo l'incubazione il contenuto dei pozzetti può essere rimosso. Seguono tre successivi step di lavaggio dei pozzetti con una soluzione di lavaggio "Wash Solution" (cloruro di sodio 8 g/l, fosfato di sodio dibasico 1.15 g/l, fosfato di potassio monobasico 0.20 g/l, cloruro di potassio 0.20 g/l, Tween-20 0.5 g/l, azide sodica 0.20 g/l-pH=7.4). Dopo aver rimosso ogni residuo di soluzione, si aggiungono ad ogni pozzetto 200 µl di "Substrate Solution". La piastra viene quindi incubata a 37°C per un'ora in un contenitore umido. A seguito dell'incubazione al fine di stoppare la reazione viene aggiunta, ad ogni pozzetto, una goccia (50 µl) di "Stop Solution" (idrossido di sodio 40 g/l). La lettura viene effettuata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm.

Per calcolare la percentuale di legame di ogni standard o campione viene utilizzata la seguente formula:

$$\% \text{Binding} = [(B \text{ O.D.} - \text{NSB O.D.}) / (B_0 \text{ O.D.} - \text{NSB O.D.})] \times 100$$

Dove:

B= campione o standard

NSB= 100 µl di A1 (100 picomoli ABA/ml) + 100 µl Tracer= 0% Binding

B₀= 100 µl di H1 (TBS Buffer) + 100 µl Tracer= 100% Binding

Plottando i dati ottenuti della % di legame in funzione della concentrazione di ABA (picomoli/ml) si ottiene una curva sigmoideale. La determinazione della concentrazione dell'ABA si ottiene dall'interpolazione della % di binding dalla curva standard.

È possibile inoltre ottenere una curva di standard di tipo lineare utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Logit} (B/B_0) = \text{Ln} [(B/B_0)/(100 - (B/B_0))]$$

CAPITOLO 3
RISULTATI E DISCUSSIONI

3.1 ESPERIMENTO NEL LUNGO PERIODO (77 GIORNI)

3.1.1 Effetto della frigoconservazione sul contenuto di antocianine nella polpa di Tarocco Sciara.

Il dosaggio delle antocianine su polpa Tarocco Sciara è stato eseguito secondo la metodologia descritta nel paragrafo 2.3. La cultivar considerata è a polpa mediamente pigmentata, condizione necessaria affinché si possa avere una modificazione del contenuto di antocianine in seguito a stress abiotici. Dal grafico che mostra come varia il contenuto di antocianine nei diversi prelievi si evince che la quantità di antocianine è strettamente legata alla temperatura di conservazione, a conferma di ciò che è stato osservato in lavori precedenti (Lo Piero *et al.*, 2005). Analizzando l'esperimento condotto si osserva che, in tutti i prelievi, il contenuto di antocianine nella polpa frigoconservata è sempre superiore a quello della polpa mantenuta a temperatura ambiente (fig. 42). Osservando l'andamento della curva a 25°C si nota un decremento del contenuto in antocianine nei vari prelievi rispetto al tempo zero (0.7 mg/100g). Nel caso delle arance frigoconservate si vede che tra il primo e il secondo prelievo i mg di antocianine/100g di polpa non variano, mentre aumentano nei prelievi successivi. In particolare in corrispondenza del quinto prelievo, dopo cioè 77 giorni dalla raccolta, il valore è il più elevato (1,320 mg/100g), e inoltre, il divario tra il contenuto di antocianine nella polpa conservata a 4°C rispetto al controllo è massimo. I risultati relativi all'ultimo prelievo (04/04/08) indicano, infatti, che il contenuto di antocianine nelle arance frigoconservate è quasi tre volte maggiore di quello del controllo. Per tale ragione si è scelto di utilizzare la polpa del 4 aprile 2008 di Sciara 4°C e 25°C come materiale di partenza, dalla quale è stato estratto l'RNA totale che è stato convertito in cDNA per la costituzione della libreria sottrattiva. La libreria di cDNA permette l'identificazione di geni specificatamente espressi nelle arance

frigoconservate. A tale scopo, la polpa a 4°C e quella a 25°C del 04/04/08 hanno rappresentato rispettivamente il “tester” e il “driver”.

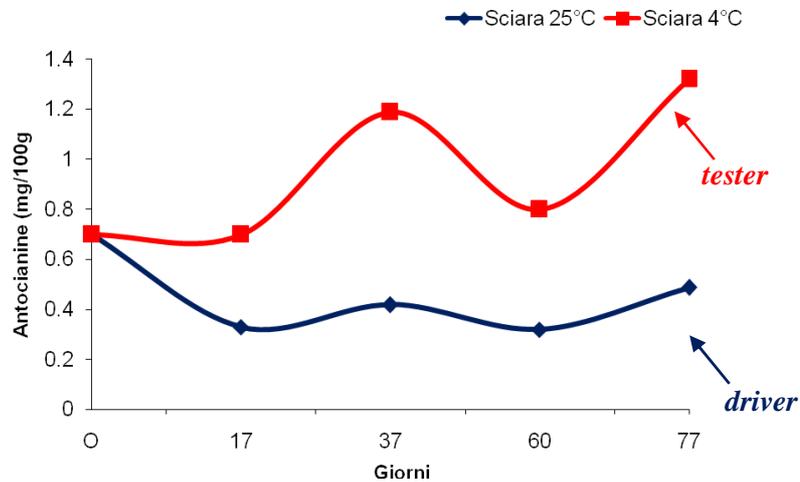


Figura 42 - Effetto della frigo-conservazione (4°C) sul contenuto di antocianine nella polpa d'arancia Sciara

3.1.2 Analisi del contenuto di RNA nella polpa di Tarocco Sciara esposta a due differenti temperature di conservazione.

Come è stato descritto nel paragrafo 2.3.2, l'RNA totale estratto nei cinque prelievi è stato quantificato al fluorimetro con il metodo “Quant-iT RNA Assay” (*Molecular Probes*). Queste misurazioni sono state effettuate al fine di valutare come varia il contenuto di RNA totale nella polpa di arance conservate alle due differenti temperature nel corso del periodo sperimentale (77 giorni). Dal grafico (fig. 43) si nota che nei primi 40 giorni (I e II prelievo) in entrambi i casi si ha un leggero incremento di RNA totale. Inoltre si può osservare che l'aumento di RNA totale, nella prima metà del periodo sperimentale, è più marcato nel caso delle arance frigoconservate. Al terzo prelievo si ha il picco massimo per entrambi campioni, con un contenuto superiore di RNA nel caso di arance mantenute a temperatura ambiente. Dopo il sessantesimo giorno (III prelievo), si osserva un

decremento di entrambe le curve ed in corrispondenza dell'ultimo prelievo il contenuto di RNA dei due campioni è quasi coincidente.

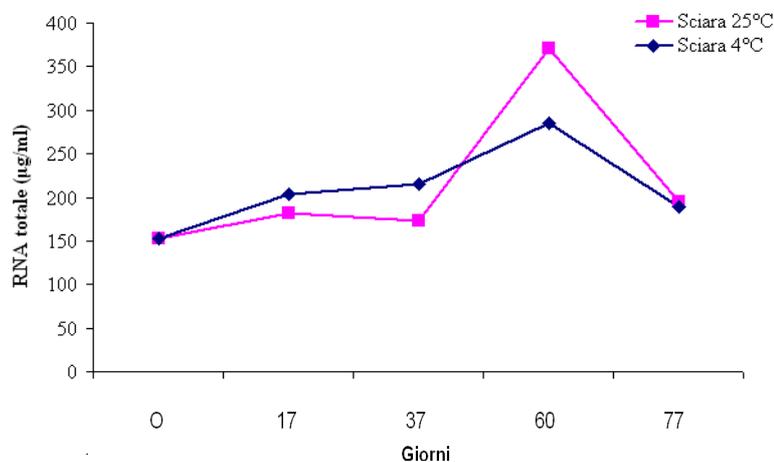


Figura 43 – Variazione del contenuto di RNA totale nella polpa di arance Sciara conservate a 4°C e a 25°C.

3.1.3 Classificazione dei trascritti differenziali

La costruzione e l'analisi dei cloni sono state eseguite come descritto nella parte metodologica. La libreria sottrattiva di cDNA ottenuta è costituita da 519 cloni. In base alla loro funzione questi sono stati classificati in 15 classi. Le classi funzionali e le relative percentuali sono mostrate nella seguente figura (fig. 44).

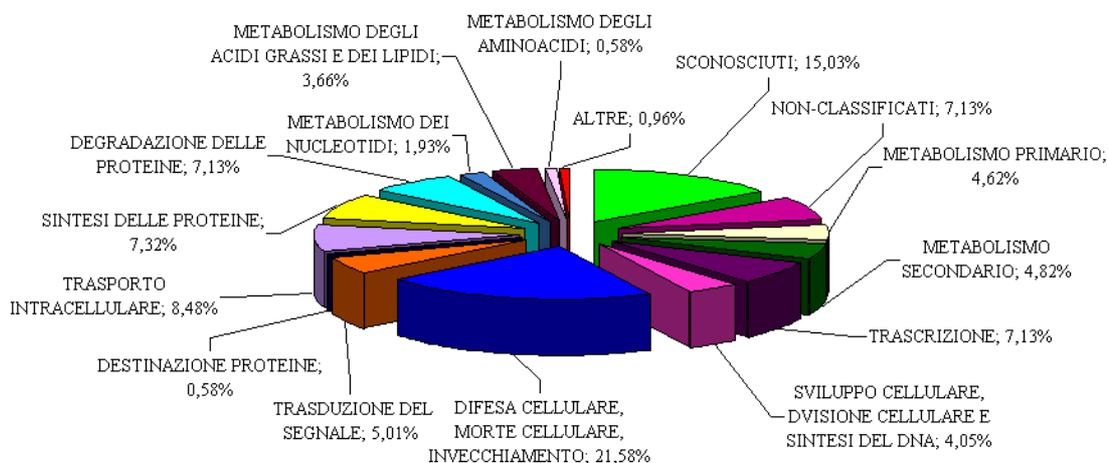


Figura 44 – Classificazione funzionale dei cloni

Metabolismo primario e secondario

Il 4,62% dei cloni identificati sono geni che codificano per enzimi implicati in reazioni che portano alla sintesi di proteine, carboidrati, lipidi e acidi nucleici, composti che essendo essenziali per la vita e il benessere della pianta, sono definiti metaboliti primari. La porzione più abbondante dei geni isolati (1,16%) è costituita da proteine che legano le clorofille. Questi complessi multiproteici costituiscono i fotosistemi della membrana tilacoidale e durante la fase luminosa del processo fotosintetico assorbono l'energia radiante e la trasformano in energia chimica con produzione di O₂, ATP e NADPH. Alcuni dei geni isolati, come il fruttosio-bisfosfato aldolasi, il piruvato chinasi e il gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, sono coinvolti nella glicolisi; altri come la fosfoenolpiruvato carbossichinasi intervengono nella gluconeogenesi.

Il 4,82% dei cloni sono geni che codificano per reazioni del metabolismo secondario, cui sottendono le reazioni correlate alla vita d'interrelazione con l'esterno. Nel caso specifico, quasi tutti i cloni isolati codificano per enzimi che intervengono nella biosintesi dei flavonoidi come la calcione sintasi, la fenilalanina ammonio liasi, la 4-Cumaroil-CoA ligasi, antocianidina sintetasi e altri enzimi chiave della sintesi delle antocianine. Inoltre sono stati individuati geni che codificano per enzimi che intervengono nella sintesi dei carotenoidi, anch'essi metaboliti secondari.

Fattori di trascrizione

Del 7,13% dei cloni catalogati in questa classe funzionale, circa la metà è rappresentata da fattori di trascrizione, proteine che legano il DNA in una regione specifica di un promotore o di un enhancer, regolando poi la trascrizione. L'1,75% è costituito da zinc finger proteins (domini a dita di zinco) che contengono ripetizioni di residui di cisteina e istidina che legano ioni zinco e si ripiegano in strutture ad ansa (dita) che legano il DNA. Il resto è costituito da coattivatori e da proteine che contengono bromodomini.

Sviluppo cellulare, divisione cellulare e sintesi del DNA

Il 4,05% dei cloni appartiene a questa categoria. In particolare abbiamo isolato geni che codificano per proteine che costituiscono il citoscheletro come la tubulina, fattori che depolimerizzano l'actina, pectinesterasi, arabinogalattano-proteine.

Difesa cellulare, morte cellulare e invecchiamento

La porzione più abbondante di cloni, il 21,58%, appartiene a questa classe funzionale. In particolar modo sono state isolate proteine coinvolte nella difesa cellulare in risposta agli stress abiotici, come le deidrine (6,7%), le metallothioneine (1,9%) e le tioredoxine (2,9%). Le deidrine sono proteine che svolgono un ruolo chiave nella prevenzione dei danni cellulari in condizioni di stress abiotico. Le metallothioneine (MTs) hanno una funzione essenziale nell'omeostasi dello zinco intracellulare a causa della loro elevata affinità per lo zinco, che è a sua volta fondamentale per la risposta immunitaria e l'attività antiossidante. Le tioredoxine infine sono proteine che agiscono come antiossidanti facilitando la riduzione di altre proteine. L'1,73% è costituito dalle glutatione transferasi (GST), localizzate soprattutto nel citosol, dove le loro funzioni catalitiche includono la coniugazione e la risultante detossificazione da erbicidi, la riduzione di idroperossidi organici formati a causa di stress ossidativo e l'isomerizzazione del maleilacetoacetato, un passo fondamentale nel catabolismo della tirosina. Le GST hanno anche ruoli non catalitici, legando flavonoidi naturali nel citosol prima della loro deposizione nel vacuolo.

Trasduzione del segnale

Il 5% dei cloni intervengono nei meccanismi di trasduzione del segnale in cui un segnale extracellulare viene trasdotto modificando il comportamento della cellula bersaglio. La trasduzione avviene tramite recettori, proteine di membrana, o proteine solubili che possiedono una grande affinità per una seconda molecola, detta ligando (ad esempio un'altra proteina, un acido

nucleico, o una molecola a basso peso molecolare). Gli eventi che seguono il legame del ligando al recettore vanno sotto il nome di "cascata di trasduzione del segnale". Per generare una risposta cellulare specifica il segnale deve essere trasferito all'interno della cellula: questo avviene grazie all'azione di una serie di piccole molecole: i secondi messaggeri. Questi vengono generati conseguentemente all'attivazione del recettore, diffondono rapidamente e trasportano il segnale ad altre parti della cellula. Sono state isolate proteine chinasi, proteine fosfatasi, MAP chinasi, recettori associati a proteine, proteine che legano il calcio e l'ATP.

Trasporto intracellulare

L'8,48% dei cloni è rappresentato da geni che codificano per proteine coinvolte nel trasporto di soluti all'interno della cellula (acquaporine, poroproteine, proteine trasportatrici, fosfoenolpiruvato traslocatore). Queste si distinguono in proteine canale e proteine trasportatrici. Le prime formano un poro attraverso il doppio strato lipidico della membrana permettendo il passaggio di soluti; le seconde legano la molecola che devono trasportare e subiscono un cambiamento conformazionale che permette il trasferimento della molecola dall'altro lato della membrana.

Sintesi e degradazione delle proteine

Il 7,32% di cloni è rappresentato da proteine ribosomiali, *initiation factors* che sono proteine che legano piccole subunità di ribosomi durante l'inizio della traduzione ed *elongation factors* che sono proteine che intervengono negli steps successivi.

Il 7,13% è costituito da cloni che appartengono alla classe della degradazione delle proteine, un processo importante quanto la loro sintesi. Infatti, molti processi cellulari, quali la regolazione del ciclo e della divisione cellulare, lo sviluppo e il differenziamento, la risposta cellulare allo stress e agli stimoli extracellulari, la modulazione dei recettori e dei canali ionici di membrana, la riparazione del DNA e la regolazione

trascrizionale, sono controllati tramite una rapida degradazione di proteine regolatrici specifiche. Sono state isolate proteasi, proteosomi e proteine che si legano all'ubiquitina, che si lega tramite legame covalente alla proteina indirizzandola verso la sua degradazione.

Metabolismo degli acidi grassi

Il 3,65% dei cloni è costituito da geni che codificano per enzimi che intervengono nel metabolismo degli acidi grassi, come le desaturasi. Come abbiamo visto nei paragrafi precedenti l'acclimatazione determina l'attivazione di geni codificanti per desaturasi, provocando così l'aumento nella proporzione di acidi grassi insaturi e quindi un calo nella temperatura di transizione.

3.1.4 RT-REAL TIME PCR

Nei campioni Tarocco Sciara, il contenuto di antocianine nella polpa frigo-conservata assume un andamento crescente fino alla fine del periodo sperimentale, con livelli di antocianine più elevati di quelli del controllo durante tutto il periodo sperimentale e con un più evidente divario nel contenuto di antocianine osservabile in corrispondenza dell'ultimo prelievo. Al termine del periodo sperimentale il cDNA "tester" Tarocco Sciara 4°C mostra livelli di espressione molto più elevati del suo controllo a 25°C di tutti i geni coinvolti nella biosintesi delle antocianine, come mostrato nella tabella 14.

	Espressione Relativa di Sciara 4°C normalizzata al Controllo 25°C $2^{-\Delta\Delta CT}$
2-deidro-3deossifosfoeptonato aldolasi (DAHP)	21 ± 0.7
Corismato mutasi (CM1)	>1000 (nd [*])
Fenilalanina ammonio liasi (PAL)	855 ± 11
4-CumaroilCoA ligasi (4CL)	52 ± 1.1
Calcone sintasi (CHS)	245 ± 6
Antocianidina sintasi (ANS)	85 ± 1.5
Diidroflavinolo reductasi (DFR)	89 ± 1.5
UDP-glucosio:flavonoide 3-O- glucosiltrasferasi (UFGT)	192 ± 6
Glutazione-S-trasferasi (GST)	154 ± 3

Tabella 14

^{*}nd: not detectable at 25°C

Sono stati anche esaminati i livelli di espressione dei processi a monte della via dello Shikimato. Nel citosol della cellula, infatti, l'enzima Citrato liasi catalizza la formazione di Ossalacetato e AcetilCoA a partire da Citrato, ATP e CoA. Parte dell'acetilCoA appena formato viene trasferita all'interno del plastide entrando a far parte nei processi di biosintesi degli acidi grassi, degli steroli e dei composti isoprenoidi. Una porzione però viene trasformata in MalonilCoA. L'enzima Calcone Sintasi (CHS) catalizza la formazione di calconi, che entrano nella via biosintetica dei flavonoidi, a partire da MalonilCoA e p-CumaroilCoA. L'Ossalacetato formatosi viene decarbossilato ad opera dell'enzima Fosfoenol piruvato carbossichinasi (PEPCK) formando fosfoenolpiruvato (PEP). Parte del PEP sintetizzato entra nel ciclo glicolitico, mentre parte viene trasportata, dal carrier

Fosfoenol piruvato Traslocatore (PEPtr) all'interno del plastide intervenendo nella sintesi della fenilalanina. Come si evince dalla tabella 15, gli enzimi chiave di questo ciclo sono sovraespressi nel campione frigoconservato rispetto al controllo a temperatura ambiente.

	Espressione Relativa di Sciara 4°C normalizzata al Controllo 25°C $2^{-\Delta\Delta CT}$
Citrato liasi	1052 ± 13
Fosfoenolpiruvato/fosfato traslocatore (PEPtr)	48 ± 0.8
Fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK/ATP)	50 ± 1.1

Tabella 15

Tra i cloni della genoteca contenente i trascritti specificatamente espressi a 4°C sono stati identificati i cDNA codificanti per la fosfomevalonato chinasi (PMK), per l'isopentenilpirofosfato isomerasi (IPPS) e per la farnesildifosfato sintetasi (FDPS). Come è possibile osservare nella tabella 16, anche questi enzimi risultano sovraespressi nel campione mantenuto a 4°C rispetto al controllo mantenuto a temperatura ambiente.

	Espressione Relativa di Sciara 4°C normalizzata al Controllo 25°C $2^{-\Delta\Delta CT}$
Fosfomevalonato chinasi (PMK)	1722 ± 20
Farnesil difosfato sintasi (FDPS)	1 ± 0.1
Isopentenil pirofosfato isomerasi (IPP)	8 ± 0.2

Tabella 16

Questi enzimi intervengono nella via metabolica dei composti isoprenoidi che rappresentano i precursori dei carotenoidi e dell'acido abscissico (ABA). Nelle piante l'ABA deriva sia dal C₄₀-*cis*-epossicarotenoide sia dalla 9'-*cis*-neoxantina e/o 9-*cis*-violaxantina, che sono trasformate dalla 9-*cis*-epossicarotenoide diossigenasi (NCED) in xantossina, il diretto precursore C₁₅ dell'ABA (fig. 9; pag. 22). E' stato ultimamente accertato che l'NCED è l'enzima chiave nella regolazione della biosintesi dell'ABA (Zacarias *et al.*, 2006). Gli stessi autori hanno isolato due geni codificanti per l'NCED in *Citrus sinensis*, NCED1 e NCED2. Inoltre, essi hanno osservato che l'espressione di NCED1 aumenta nelle foglie di arancio in condizioni di stress idrico e nei frutti durante la maturazione, mentre il gene NCED2, nelle stesse condizioni, non si esprime; questi dati suggeriscono che NCED1 gioca un ruolo primario nella biosintesi dell'ABA sia nelle foglie sia nei frutti, mentre NCED2 sembrerebbe svolgere un ruolo sussidiario (Zacarias *et al.*, 2006). Allo scopo, quindi, di valutare il ruolo svolto dall'ABA in condizioni di stress da basse temperature, ed essendo, inoltre, disponibili in banca dati le sequenze relative ai geni codificanti per l'aldeide ossidasi (AOX), per NCED1 e NCED2 (fig. 45) da *Citrus sinensis* abbiamo eseguito degli esperimenti di PCR quantitativa in real time per monitorare l'espressione dei suddetti geni durante tutto il periodo

sperimentale, anche se essi non risultavano essere specificatamente contenuti nella genoteca sottrattiva. Nella figura 45 sono riportati gli andamenti dell'espressione relativa dei geni rispetto al tempo zero alle due temperature; i valori di espressione a 25°C di tutti i geni si mantengono intorno a valori simili rispetto al tempo zero con variazioni statisticamente non significative. L'enzima aldeide ossidasi (AOX) ha mostrato livelli di espressione abbondanti e costantemente espressi durante il periodo sperimentale (dato non mostrato). Ciò ci ha indotto ad utilizzarlo come gene normalizzante l'espressione dei geni che invece subivano una regolazione (*down-* o *up-* regulation) imposta dalle condizioni di stress. Nella fig. 45 sono illustrati i risultati delle analisi ottenute nel caso dei geni NCED1 e NCED2. Come si può osservare, l'espressione del gene NCED1 viene fortemente indotta a 4°C raggiungendo un valore pari a 8 volte superiore rispetto al controllo in corrispondenza del II prelievo. I valori si mantengono mediamente intorno a 5 volte superiori al tempo zero anche durante il successivo III prelievo ed alla fine del periodo sperimentale diminuiscono mostrando livelli di poco superiori al controllo. Per converso, l'espressione di NCED2 è *down-regulated* dalle condizioni di stress imposte; l'espressione relativa di questo gene rispetto al tempo zero, infatti, diminuisce costantemente durante tutto il periodo sperimentale fino ad essere quasi nulla in corrispondenza dell'ultimo prelievo.

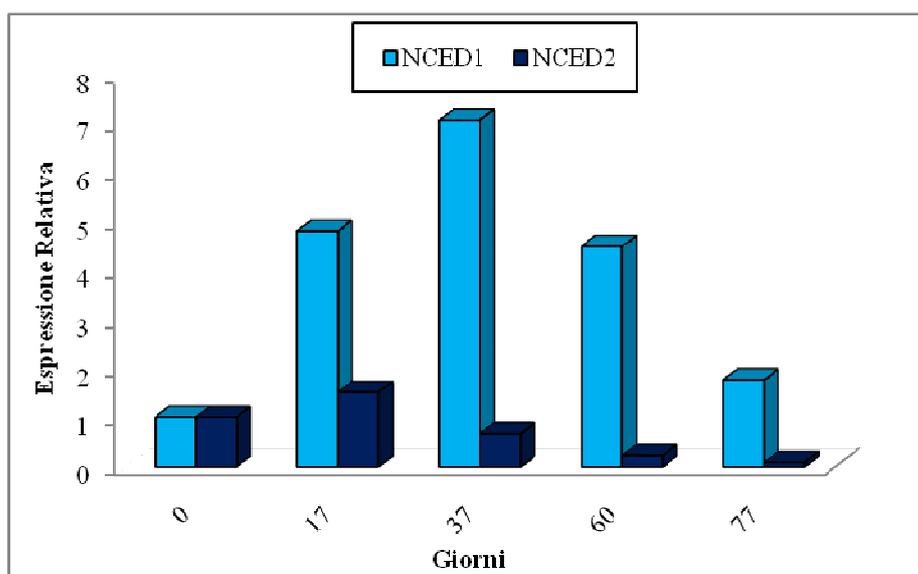


Figura 45 – Livelli di espressione di NCED1 e NCED2 in campioni Tarocco Sciarra conservati a 4°C (i valori di espressione a 25°C sono stati omessi in quanto si mantengono intorno a valori simili rispetto al tempo zero con variazioni statisticamente non significative).

Questi risultati evidenziano il ruolo primario che svolge il gene NCED1, rispetto al gene NCED2, nella sintesi dell'ABA in polpa di arancia rossa in condizioni di stress da basse temperature, confermando quanto già osservato da altri autori in foglie di arancio soggette a deidratazione (Zacariàs *et al.*, 2006). Inoltre, l'induzione di NCED1, enzima chiave della via biosintetica che conduce all'ABA, e degli altri geni posti molto a monte di questo pathway (PMK e IPP), sembrerebbero suggerire che la risposta allo stress da basse temperature sia di tipo ABA-dipendente. Questa conclusione sarebbe suffragata dal fatto che i fattori di trascrizione DREB1/CBF che mediano la risposta ABA-indipendente non sono stati isolati nella genoteca sottrattiva. Infine, è di rilevante interesse riportare che nel promotore del gene *cor* (cold regulated) codificante per la diidroflavanol-4-reduttasi (DFR) (Lo Piero *et al.*, 2005) isolato dalla polpa di arance rosse, sono presenti diversi *cis element* per il legame di G-box binding factors (via ABA-dipendente), mentre non sono stati riscontrati segnali di riconoscimento dei fattori CBF/DREB1 (via ABA-indipendente) (fig. 46).

I fattori di trascrizione di tipo G-Box hanno *cis-element* (cioè le zone riconosciute sul promotore dei geni attivati) simili a quelli dei fattori ABRE (vedi Introduzione), che tipicamente intervengono nella via ABA-dipendente.

3.1.5 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay “ELISA”

Si è valutata anche la concentrazione di ABA nel tessuto e la sua variazione nel periodo sperimentale. In particolare si è valutata la concentrazione di acido abscissico totale (comprendente la frazione fisiologicamente attiva e quella coniugata). Come mostrato nel grafico (fig. 47) i campioni frigoconservati mostrano una concentrazione più elevata di acido abscissico durante tutto il periodo sperimentale rispetto alla concentrazione rilevata nei campioni mantenuti a 25°C, inoltre si osserva che al 17° giorno (1° prelievo) la concentrazione di ABA nei campioni refrigerati raggiunge valori massimi (130 picomoli/ml), diminuendo poi fino a valori simili a quelli riscontrati al tempo 0. Si è valutato poi quale era la frazione di ABA libero e attivo nella polpa (fig. 48) e la frazione di ABA coniugato e quindi biologicamente inattiva (fig. 49).

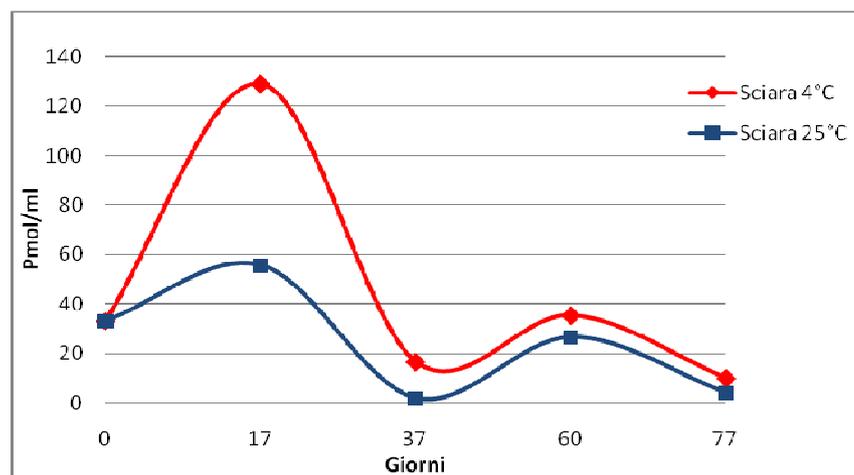


Figura 47- Livelli di concentrazione di acido abscissico (ABA) totale in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e 25°C.

Come si evince dalle figure 48 e 49 la frazione maggiore di acido abscissico nella polpa di Tarocco Sciara è sotto forma coniugata (circa il 50%), quindi

biologicamente inattiva. Tuttavia, è possibile notare come, in corrispondenza del 37° giorno, momento in cui è stata notata una maggiore espressione dei geni codificanti per NCED1, la frazione di ABA legato nel campione frigo conservato è scarsa (7 picomoli/ml) mentre la concentrazione di ABA fisiologicamente attiva ha valori di circa 15 picomoli/ml, suggerendo l'ipotesi che la risposta allo stress da freddo nell'arancia rossa possa essere di tipo ABA-dipendente.

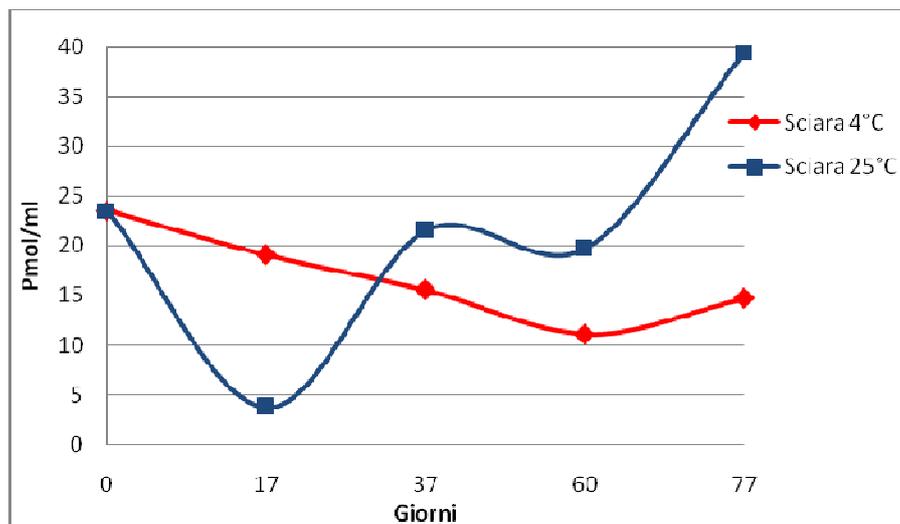


Figura 48- Livelli di concentrazione di acido abscissico (ABA) fisiologicamente attivo in campioni Tarocco Sciarra conservati a 4°C e 25°C.

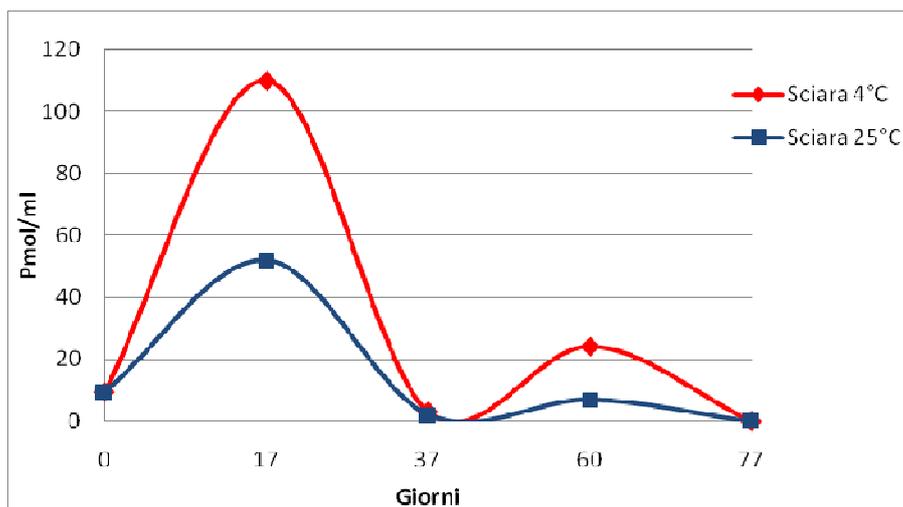


Figura 49- Livelli di concentrazione di acido abscissico (ABA) coniugato in campioni Tarocco Sciarra conservati a 4°C e 25°C.

3.2 ESPERIMENTO NEL BREVE PERIODO (15 GIORNI)

3.2.1 Effetto della frigoconservazione sul contenuto di antocianine nella polpa di Tarocco Sciara.

Il dosaggio delle antocianine su polpa Tarocco Sciara è stato eseguito a partire da arance prelevate in Gennaio 2010. Anche nell'esperienza basata sul monitoraggio nel breve periodo, si conferma che la quantità di antocianine nei diversi prelievi è strettamente legata alla temperatura di conservazione, a conferma di ciò che è stato osservato nel lavoro precedente. Si osserva che, in tutti i prelievi, il contenuto di antocianine nella polpa frigoconservata è sempre superiore a quello della polpa mantenuta a temperatura ambiente (fig. 50). Osservando l'andamento della curva mostrante il contenuto in antocianine nei campioni conservati a 25°C, si nota una concentrazione di pigmenti sempre costante per tutto il periodo sperimentale con valori simili a quelli del tempo 0 (0.6 mg/100 g). Nel caso delle arance frigo conservate è possibile notare che dopo 6 giorni di trattamento alle basse temperature il contenuto in antociani quadruplica (2 mg/100 g) per poi ridiscendere fino a valori più bassi ma sempre superiori rispetto ai valori registrati per il controllo a 25°C.

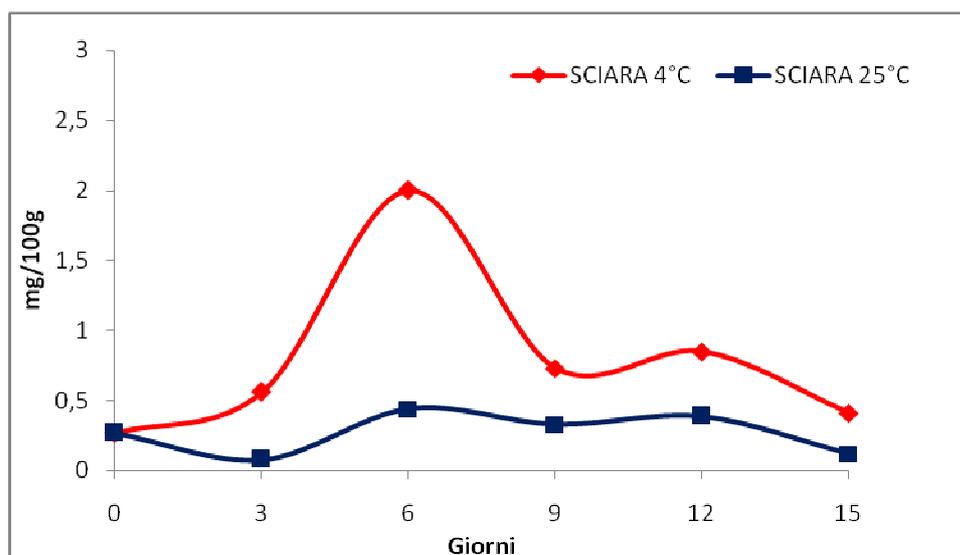


Figura 50- Effetto della frigo-conservazione (breve periodo) (4°C) sul contenuto di antocianine nella polpa d'arancia Sciara

3.2.2 RT-Real Time PCR

In seguito alla determinazione del contenuto in antocianine nei campioni durante tutto il periodo sperimentale, si è deciso di valutare come l'espressione di tutti i geni coinvolti nella biosintesi delle antocianine variasse in relazione al tempo e alla temperatura di conservazione. Tutti gli enzimi coinvolti nella produzione delle antocianine mostrano livelli di espressioni molto più elevati nella polpa frigo conservata, ed inoltre i maggiori livelli di espressione si riscontrano dopo 12 e 15 giorni di frigoconservazione. Nel caso specifico della fenilalanina ammonio liasi, che è il primo enzima della via biosintetica delle antocianine, è possibile notare che l'enzima è espresso 252 volte in più rispetto al tempo 0 dopo 15 giorni di conservazione a 4°C, mentre l'espressione del gene in campioni conservati a temperatura ambiente si mantiene costante durante il periodo sperimentale (fig. 51).

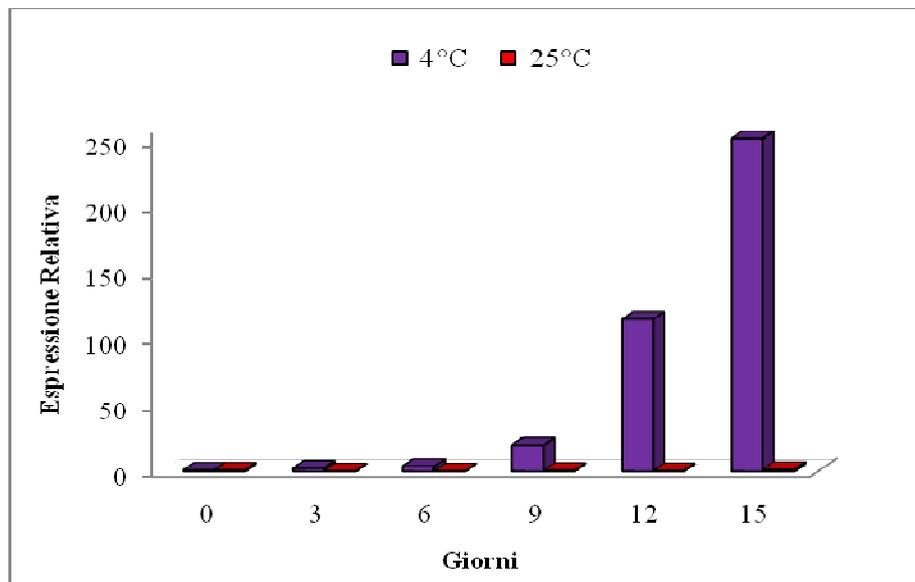


Figura 51 – Livelli di espressione di PAL in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

Anche l'enzima 4-cumaroilCoA è sovraespresso alle basse temperature registrando una massimo di espressione dopo 12 giorni di conservazione (24 volte) rispetto al tempo 0 come mostrato nella figura 52.

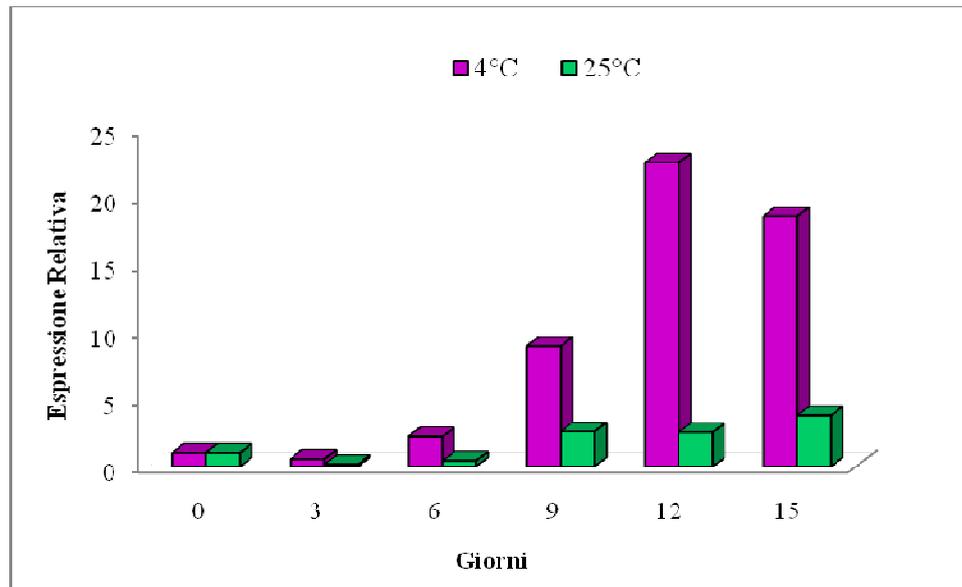


Figura 52– Livelli di espressione di 4-CL in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

Come si evince dal grafico (fig. 53), l'enzima Calcione Sintasi (CHS) è sovraespresso nei campioni a 4°C mantenendo valori elevati alla fine del periodo sperimentale (12° e 15° giorno).

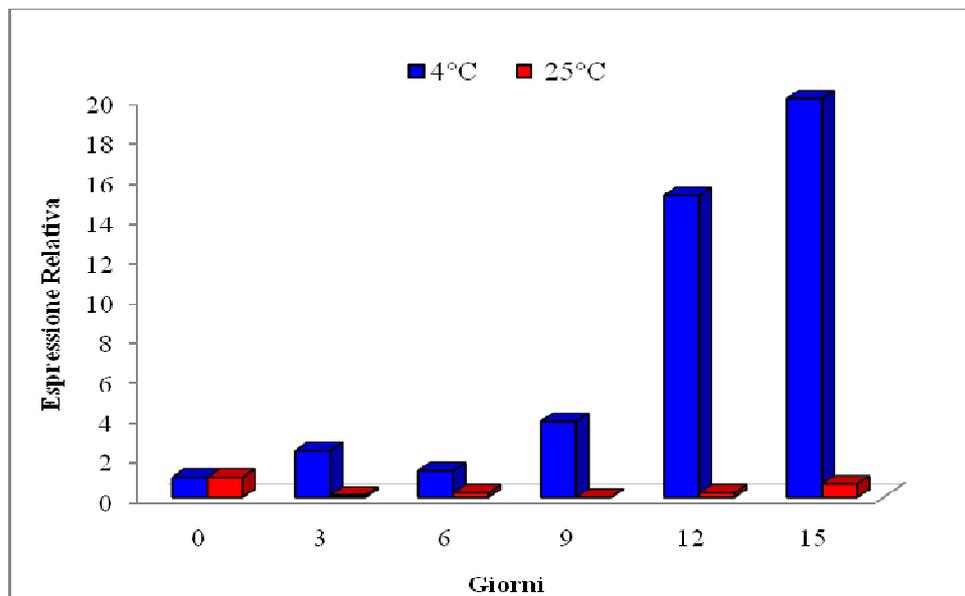


Figura 53 – Livelli di espressione di CHS in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

L'analisi di espressione per i geni DFR, ANS, UFGT, GST mostra risultati simili (fig. 54), (fig. 55), (fig. 56) (fig. 57).

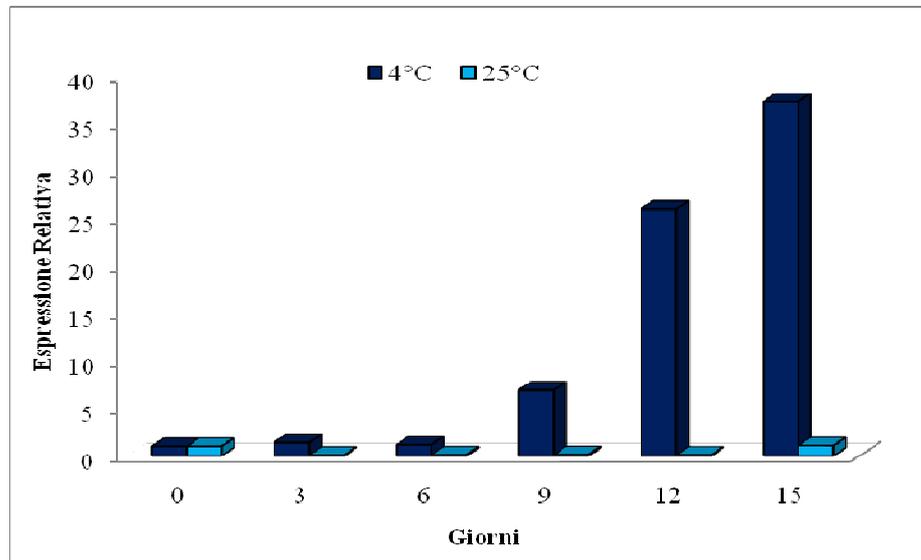


Figura 54– Livelli di espressione di DFR in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

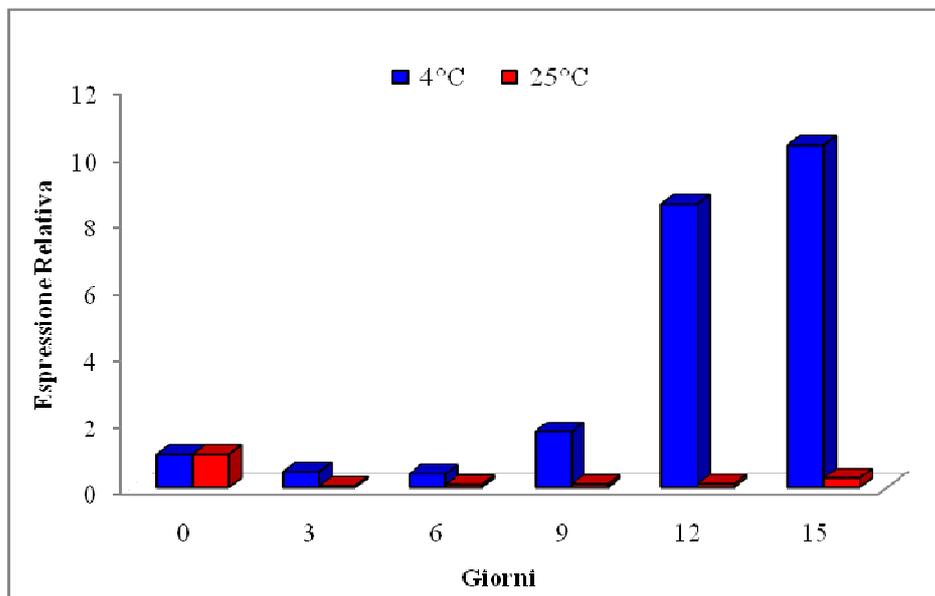


Figura 55– Livelli di espressione di ANS in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

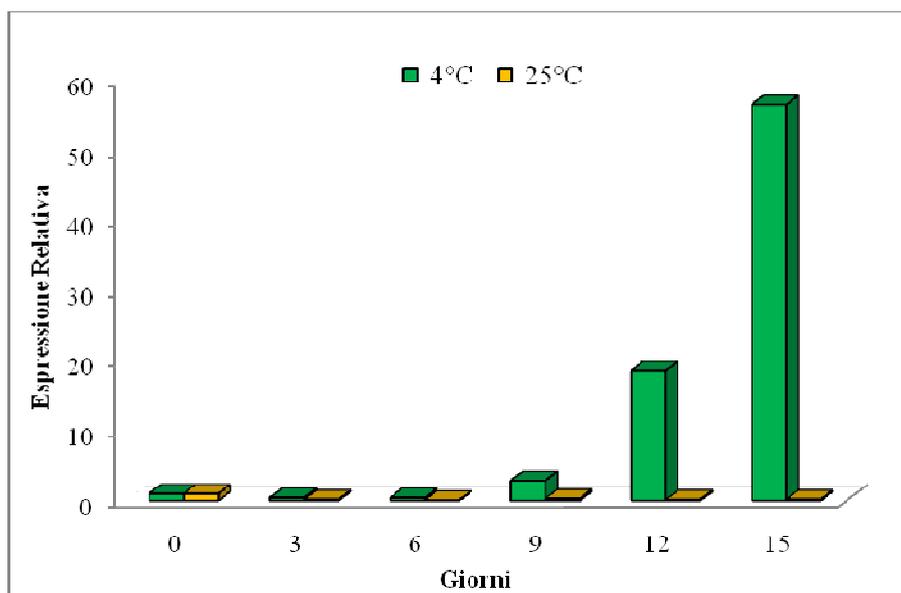


Figura 56– Livelli di espressione di UFGT in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

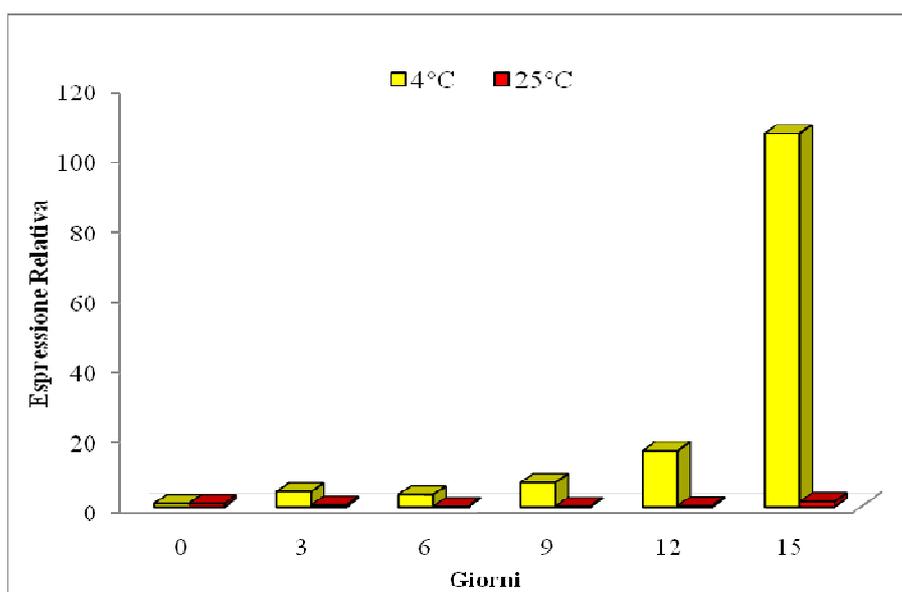


Figura 57– Livelli di espressione di GST in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

La maggiore espressione degli enzimi coinvolti nella biosintesi delle antocianine si verifica tra il 4° ed il 5° prelievo, cioè dopo 12 e 15 giorni di stoccaggio delle arance; tuttavia, l'incremento di espressione di questi geni non è accompagnato da un' aumentata sintesi delle antocianine nella polpa di arancia. Si nota, infatti, che la concentrazione di antocianine è massima

dopo 6 giorni di trattamento (2° prelievo) ed in seguito diminuisce (fig. 52 pag. 135). È possibile però ipotizzare che l'aumentata espressione dei geni nelle ultime fasi dell'esperimento nel breve periodo possa servire al frutto come fase preparatoria per una nuova sintesi antocianica. L'analisi comparativa dei dati ottenuti durante la conservazione prolungata (esperimento nel lungo periodo) e la conservazione breve, sembrerebbe suggerire, infatti, che la netta attivazione dei geni indotta dal freddo osservabile alla fine della breve conservazione (V prelievo/15 giorni) possa essere messa in relazione all'innalzamento dei livelli di antocianine registrati durante la conservazione prolungata (I e II prelievo/17 e 37 giorni) (fig. 45 pag 115). E' probabile, infine, che il picco nel contenuto di antocianine osservato al II prelievo/sesto giorno della breve frigoconservazione possa essere ricondotto ad un'induzione dei geni coinvolti nella loro sintesi che si dovrebbe verificare in stretta successione all'imposizione dello stress (poche ore dopo lo stress), e che non è stata ancora oggetto di analisi.

È stata inoltre studiata la variazione di espressione dei geni che intervengono nella via metabolica dei composti isoprenoidi e che rappresentano i precursori dei carotenoidi e dell'acido abscissico (ABA): PMK, FDPS e IPPS, oltre che gli enzimi chiave della via biosintetica dell'ABA, l'NCED1 e l'NCED2. Sia gli enzimi fosfomevalonato chinasi sia l'isopentenil pirofosfato isomerasi dimostrano un andamento simile, essendo fortemente espressi dopo 15 giorni (fig. 58) (fig. 59); mentre l'enzima farnesil difosfato isomerasi risulta non espresso (dato non mostrato).

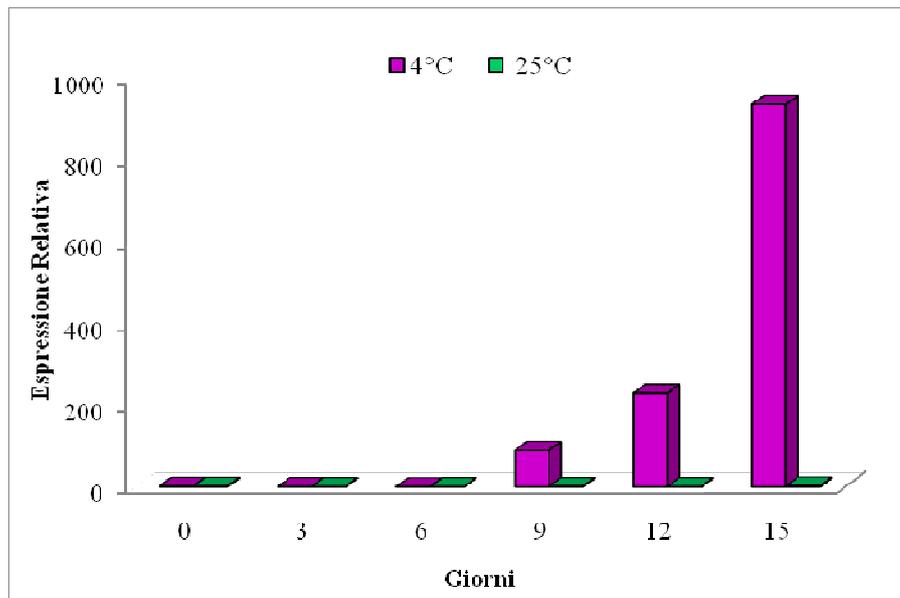


Figura 58 – Livelli di espressione di PMK in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

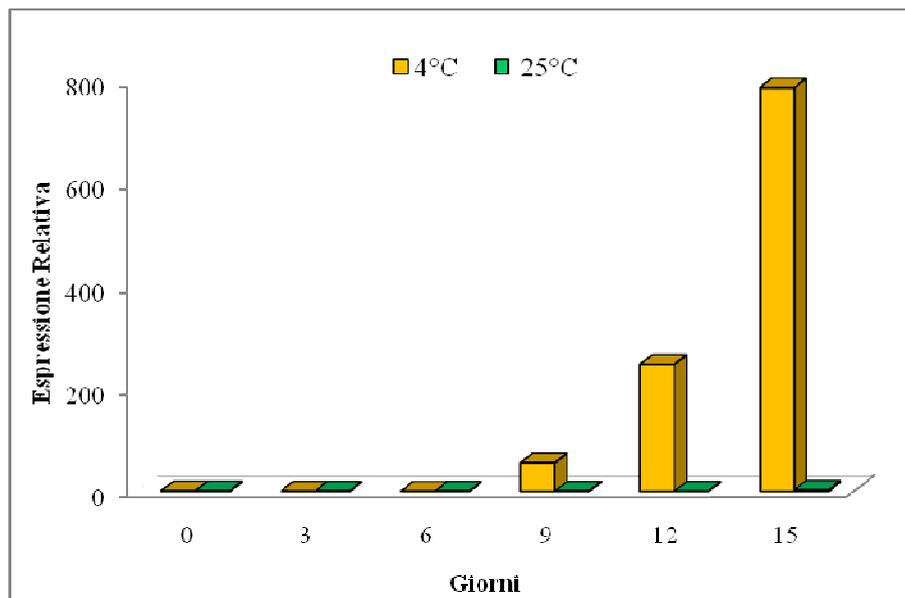


Figura 59– Livelli di espressione di IPPS in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

Anche gli enzimi chiave della via biosintetica dell'ABA risultano maggiormente espressi nei campioni frigo conservati ed ancora una volta l'enzima NCED1 risulta svolgere un ruolo chiave nella sintesi dell'ABA rispetto all'enzima NCED2 (meno espresso) (fig. 60), (fig. 61).

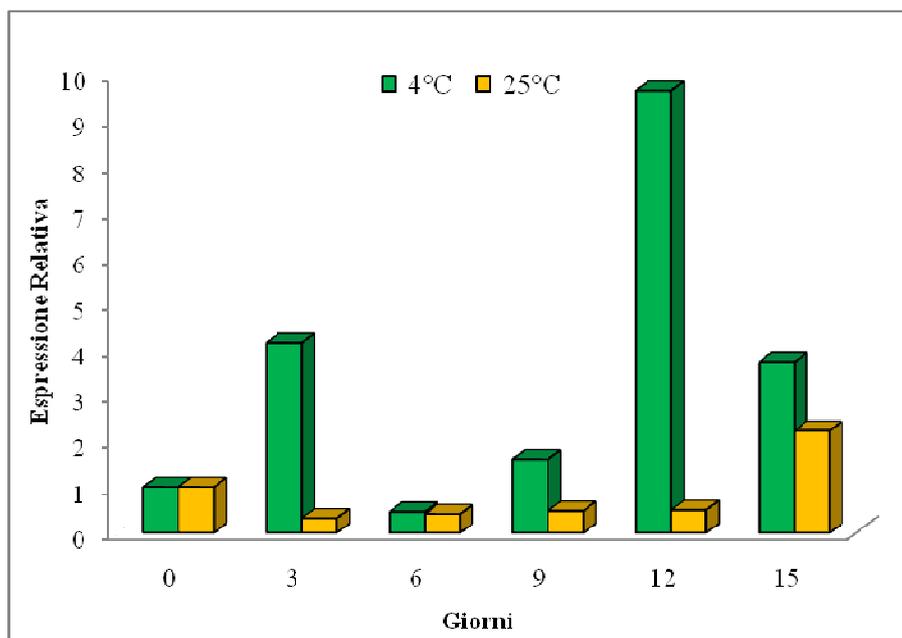


Figura 60– Livelli di espressione di NCED1 in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

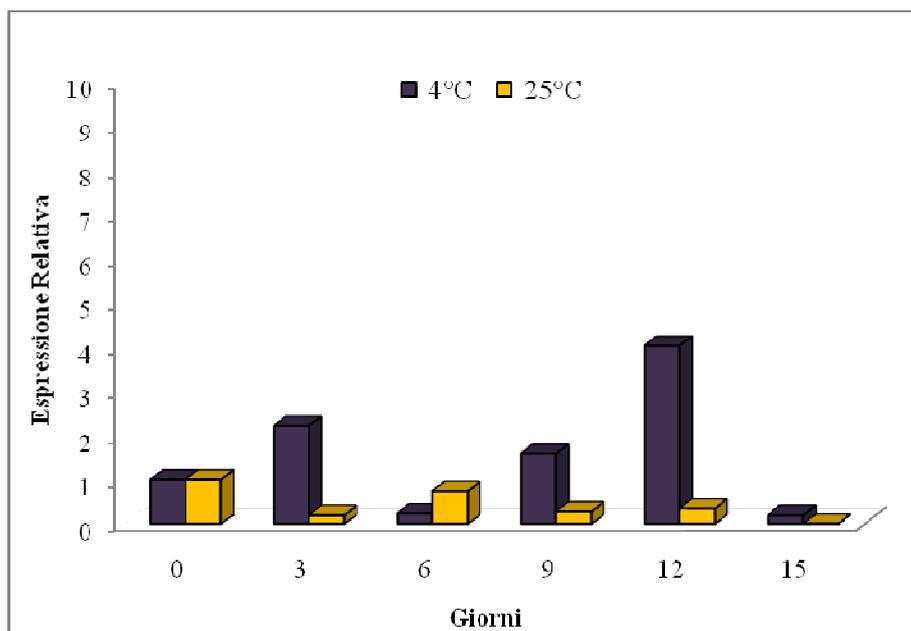


Figura 61– Livelli di espressione di NCED2 in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e a 25°C

In definitiva, l'espressione dei geni coinvolti nella via metabolica di sintesi dell'acido abscissico, sia quelli che agiscono durante le prime fasi della via biosintetica (PMK, IPPS e FDPS) che quelli coinvolti nelle tappe finali

(AOX, NCDE1 e NCDE2) è fortemente indotta dalla conservazione delle arance a freddo (4°C). Il livello di massima induzione si verifica per la maggior parte degli enzimi esaminati alla fine del periodo sperimentale (15 giorni).

3.2.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay “ELISA”

Si è voluto, inoltre, valutare la variazione di concentrazione dell'ormone nella polpa di arancia frigoconservata e nel controllo mantenuto a 25°C. L'analisi è stata effettuata con il metodo ELISA come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Dopo aver analizzato la concentrazione di ABA totale (fig. 62) nel frutto si sono valutate le frazioni di ABA coniugato (fig. 63) e di ormone fisiologicamente attivo (fig. 64).

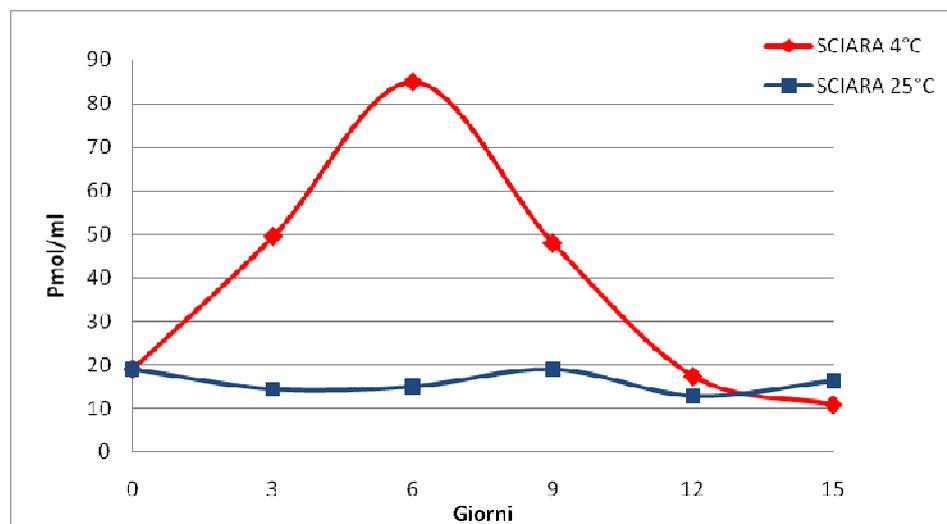


Figura 62- Livelli di concentrazione di acido abscissico (ABA) totale in campioni Tarocco Sciarra conservati a 4°C e 25°C.

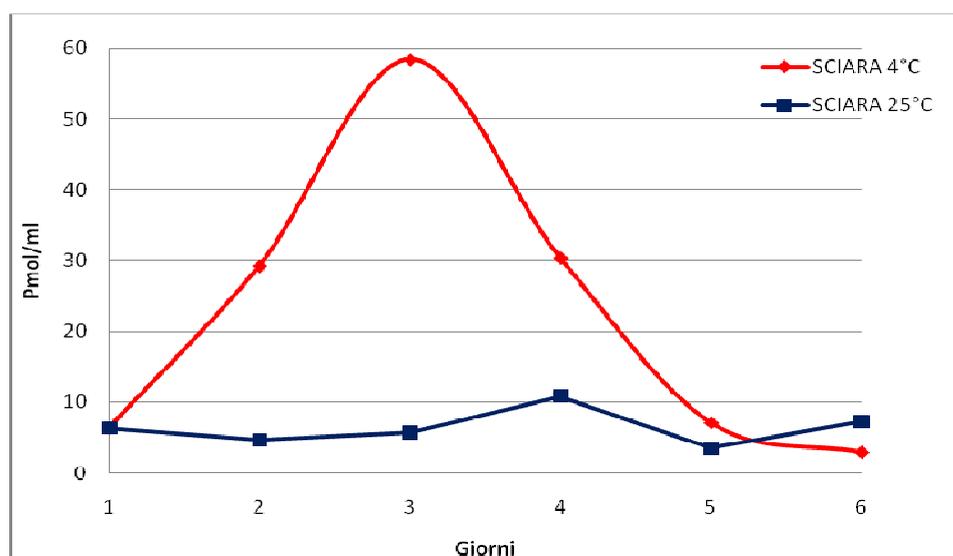


Figura 63- Livelli di concentrazione di acido abscissico (ABA) coniugato in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e 25°C.

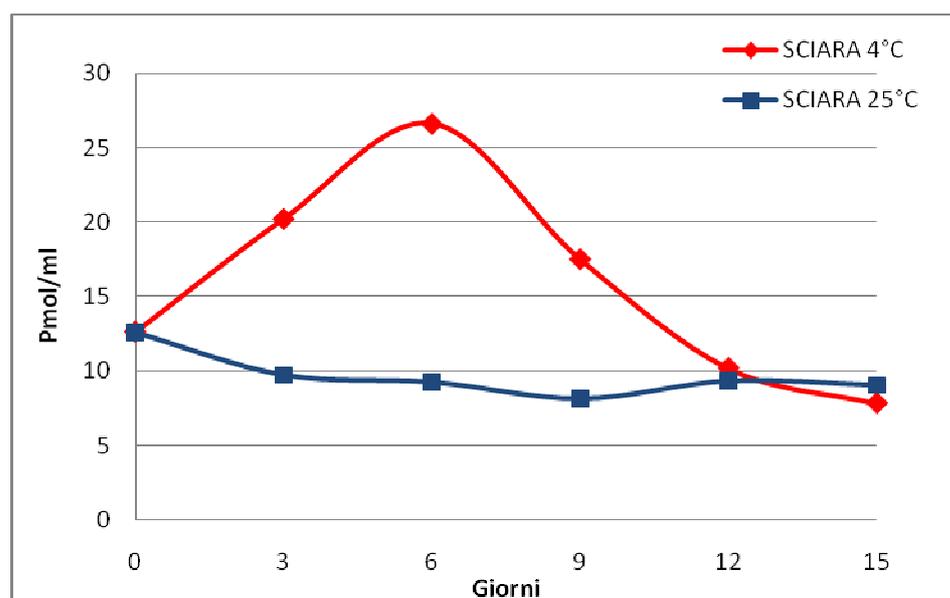


Figura 64- Livelli di concentrazione di acido abscissico (ABA) fisiologicamente attivo in campioni Tarocco Sciara conservati a 4°C e 25°C.

Nei campioni conservati a 4°C i livelli di acido abscissico mostrano un andamento crescente fino al sesto giorno di conservazione, quindi decrescono fino alla fine del periodo sperimentale. La maggior aliquota si trova sottoforma di ABA-coniugato (14 pmol/ml) ma discrete quantità di ABA fisiologicamente attivo sono presenti (7 pmol/ml). I dati relativi

all'espressione dei geni ed ai livelli di ABA sembrerebbero suggerire che la risposta al cold stress nell'arancia rossa sia di tipo ABA dipendente. Ancora una volta, così come nel caso dei risultati ottenuti nell'esperimento nel lungo periodo, questa conclusione sarebbe suffragata dal fatto che i fattori di trascrizione DREB1/CBF che mediano la risposta ABA-indipendente non sono stati isolati nella genoteca sottrattiva. Questi dati sono interessanti perché si potrebbero organizzare piani di stoccaggio post-raccolta, coincidenti con il trasferimento del prodotto all'esterno, durante i quali trattamenti con ABA esogeno, eventualmente accoppiati ad un periodo di frigoconservazione, conducano ad arance contenenti componenti ad elevato grado di nutraceuticità e che, immesse nei mercati internazionali, esaltino le peculiarità dei nostri prodotti e ne pubblicizzino i benefici.

L'analisi comparativa dei dati ottenuti durante la conservazione prolungata e la conservazione breve, sembrerebbe suggerire che la netta attivazione dei geni indotta dal freddo osservabile alla fine della breve conservazione (15 giorni) possa essere messa in relazione all'innalzamento dei livelli di ABA registrati durante la conservazione prolungata (I prelievo/17 giorni), momento in cui i livelli di ABA raggiungono valori di dieci volte più elevati di quelli riscontrabili durante la breve conservazione. Inoltre, il riscontro esclusivo della forma fisiologicamente inattiva al 17° giorno della conservazione prolungata è come già espresso un segnale di stress pregresso imposto ai frutti. E' probabile, infine, che il picco al sesto giorno della breve frigoconservazione possa essere ricondotto ad un'induzione dei geni coinvolti nella sintesi dell'ABA che si dovrebbe verificare in stretta successione all'imposizione dello stress (poche ore dopo lo stress); è significativo che in questa fase "precoce" del periodo di stress il 50% dell'ABA totale sia nella forma fisiologicamente attiva, e che contemporaneamente i livelli di antocianine si innalzino raggiungendo il loro massimo livello.

3.2.4 Caratterizzazione dei fattori di trascrizione isolati mediante la genoteca sottrattiva.

In ultima fase è stata approfondita la conoscenza dei fattori di trascrizione isolati e classificati mediante la costruzione della libreria sottrattiva. Come già accennato, 18 cloni isolati rappresentano fattori di trascrizione, proteine che legano il DNA in una regione specifica di un promotore o di un enhancer, con conseguente regolazione della trascrizione, con una ridondanza del 3,47%. La metà (1,75%) è costituita da zinc finger proteins (domini a dita di zinco) che contengono ripetizioni di residui di cisteina e istidina che legano ioni zinco e si ripiegano in strutture ad ansa (dita) che legano il DNA. La restante parte è caratterizzata da Fattori di trascrizione di tipo NAC-Like. I 9 cloni isolati codificano per due diversi fattori di trascrizione NAC-Like. Dalle analisi effettuate utilizzando il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), si è notato che 7 cloni codificavano per il fattore di trascrizione identificato ed isolato in *Citrus sinensis* (Accession Number: DY305470), mentre due codificavano per un fattore di trascrizione diverso, identificato dalla sequenza CX301924, isolata dalle radici di *Citrus sinensis*. Sono stati quindi disegnati i primers specifici alle due sequenze e mediante Real Time-PCR è stata valutata la variazione di espressione dei fattori di trascrizione (fig.65) (fig. 66).

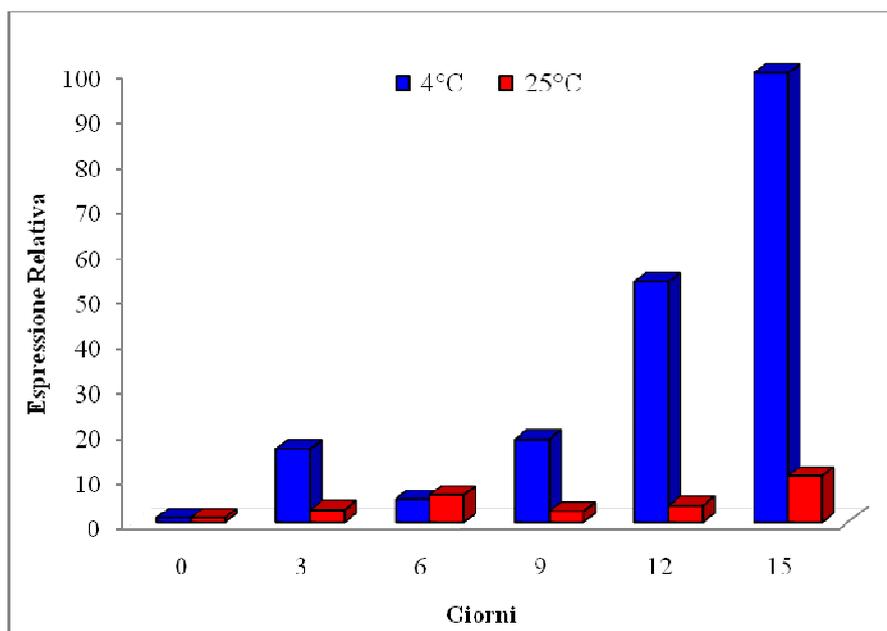


Figura 65 – Livelli di espressione di Transcription factor NAC-LIKE DY305470 in campioni Tarocco Sciarra conservati a 4°C e a 25°C

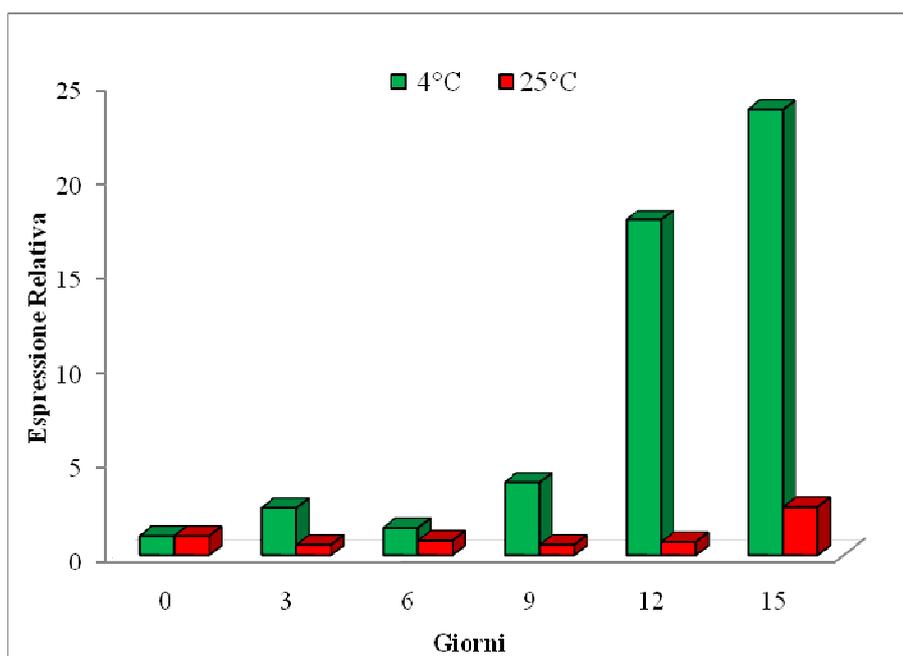


Figura 66– Livelli di espressione di Transcription factor NAC-Like CX301924 in campioni Tarocco Sciarra conservati a 4°C e a 25°C

Come è possibile osservare, in entrambi i casi l'espressione dei geni non è indotta nei campioni mantenuti a 25°C, assumendo valori pari e costanti a quelli del tempo 0. L'espressione dei geni nei campioni frigoconservati,

invece, è nettamente influenzata dalla temperatura di stoccaggio, aumentando di ben 100 volte dopo 15 giorni nel caso del fattore di trascrizione di tipo NAC-Like DY305470; e di 25 volte dopo 15 giorni nel fattore di trascrizione NAC-Like CX301924. La maggiore espressione dei geni codificanti per i fattori di trascrizione in polpa di arancia rossa mantenuta a 4°C ci permette di assumere che questi fattori siano di tipo “Cold Induced”. A conferma di ciò, si è quindi deciso di valutare il livello di espressione dei geni codificanti per i transcription factors di tipo NAC-Like (DY305470 e CX301924), e dell’enzima DFR, coinvolto nella biosintesi delle antocianine, anche in arance a polpa bionda frigoconservate per 15 giorni. Le arance utilizzate a tale scopo appartengono alla cultivar Valencia late (cultivar di tipo tardivo) e sono state raccolte e campionate nel mese di Marzo; i frutti sono stati divisi in due diversi gruppi e conservati per un periodo di 15 giorni a 4°C e a 25°C. I prelievi della polpa sono stati effettuati al 12° e 15° giorno e il cDNA è stato ottenuto utilizzando il kit “SuperScript™ III Two-Step qRT-PCR Kit”. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per PCR quantitativa in Real Time.

L’analisi comparativa dell’espressione dei geni coinvolti nella sintesi delle antocianine, ed in particolare dell’enzima DFR, tra differenti cultivar di arancia mette in evidenza che, nella cultivar non pigmentata, questi geni non sono indotti dallo stress imposto dalla frigoconservazione, non sono cioè “cold regulated” (fig. 67); di contro l’analisi dell’espressione dello stesso gene in arance pigmentate aveva messo in evidenza un incremento della espressione dell’enzima di 26 volte in più rispetto al tempo 0 dopo 12 giorni e ben 38 volte in più rispetto al tempo 0 dopo 15 giorni nei campioni frigoconservati.

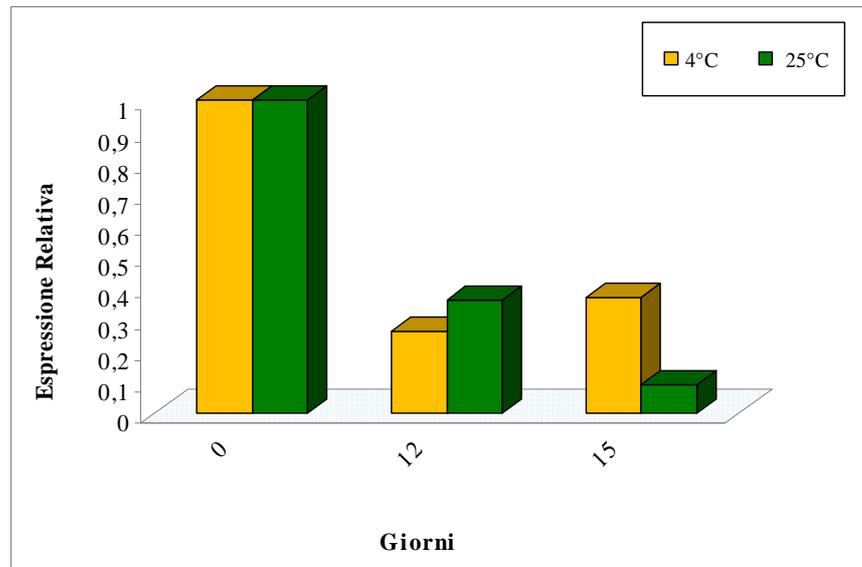


Figura 67– Livelli di espressione di DFR in campioni Valencia conservati a 4°C e a 25°C

Il pattern di espressione dei geni NAC-like (DY305470 e CX301924), precedentemente identificati come differenzialmente espressi in condizioni di cold stress in arance rosse, risulta essere differente nelle cultivar di arance in analisi. In particolare, l'espressione del fattore NAC-like (CX301924) non subisce attivazione durante la frigoconservazione delle arance non pigmentate, nelle quali esso non è evidentemente cold regulated (fig. 68). Questi risultati sembrerebbero suggerire che il fattore NAC-like (CX301924) possa essere coinvolto nell'induzione della pigmentazione che si verifica durante la frigoconservazione delle arance rosse. Questa ipotesi sembrerebbe essere supportata dalla presenza nel promotore del gene codificante la DFR, che come precedentemente detto non viene espresso nella cultivar bionda, (Lo Piero *et al.*, 2006) di un tipico *cis-element* (CATGTG) che fungerebbe da sito di riconoscimento per i fattori NAC-like.

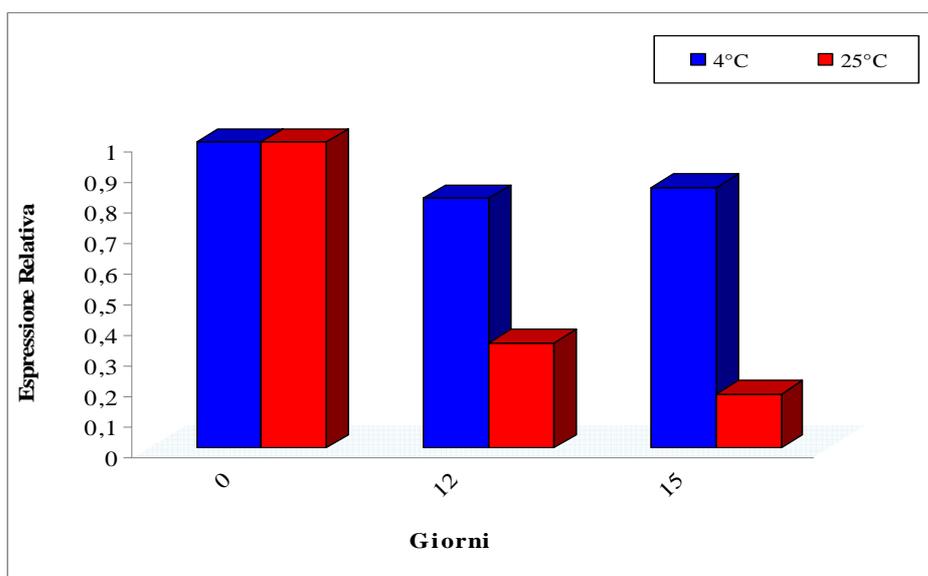


Figura 68– Livelli di espressione del fattore di trascrizione NAC-Like (CX301924) in campioni Valencia conservati a 4°C e a 25°C

Di contro, il fattore di trascrizione NAC-Like DY305470 risulta essere maggiormente espresso in condizioni di frigoconservazione sia nella cultivar pigmentata Sciara, sia nella cultivar bionda Valencia late (fig. 69), potendo quindi affermare che il pattern di espressione è differenzialmente espresso in condizioni di cold stress.

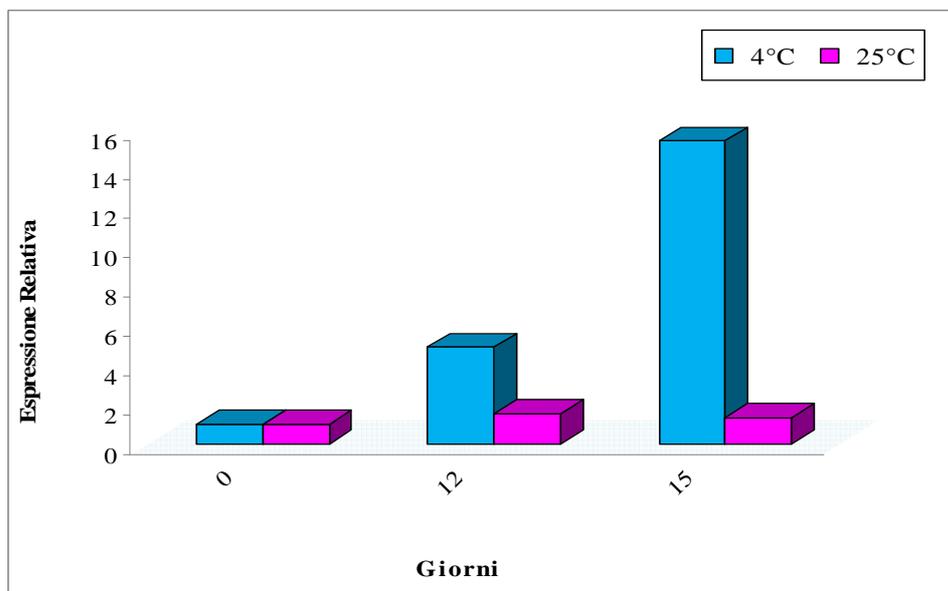


Figura 69– Livelli di espressione del fattore di trascrizione NAC-Like (DY305470) in campioni Valencia conservati a 4°C e a 25°C

BIBLIOGRAFIA

- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosakawa D., Shinozaki K. (1997). *Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid regulated gene expression*. Plant Cell, 9:1859-1868.
- Addicott F.T., Lyon J.L., Ohkuma K., Thiessen W.E., Carns H.R., Smith O.E., Cornforth J.W., Milborrow B.V., Ryback G., Wareing P.F. (1968). *Abscisic acid: a new name for abscisin II (dormin)*. Science, 159:1493.
- Amorini A. M., Fazzina G., Lazzarino G., Tavazzi B., Di Pierro D., Santucci R., Sinibaldi F., Galvano F., Galvano G., (2001). *Activity and mechanism of the antioxidant properties of canidin-3-O- β -D-glucopyranoside*. Free Radic. Res., 35: 953-66.
- Arkhipova T. N., Veselov S. U., Melentiev A. I., Martynenko E., V. Kudoyarova G. R. (2005). *Ability of bacterium Bacillus subtilis to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants*. Plant and Soil, 272: 201-209.
- Atienza S.G., Faccioli P., Perrotta G., Dalfino G., Zschiesche W., Humbeck K., Stanca A.M., Cattivelli L. (2004). *Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions*. Plant Sci., 167: 1359–1365.
- Bacher S.S., Wilhelm K.S., Thomashow M.F. (1994). *The 5'-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold, drought and ABA-regulated gene expression*. Plant Mol. Biol., 24: 701-713.

- Bahler B.D., Steffen K.L., Orzolek M.D. (1991). *Morphological and biochemical comparison of a purple-leafed and a green-leafed pepper cultivar*. Hort. Sci., 26:736.
- Baier M., Gimmler H., Hartung W. (1990). *The permeability of the guard cell plasma Membrane and Tonoplast*. J. Exp. Bot., 41: 351–358.
- Bano A., Hansen H., Dörffling K., Hahn H. (1994). *Changes in the content of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in the xylem sap of drought stressed sunflower plants*. Phytochemistry, 37: 345–347.
- Blee E. (2002). *Impact of phyto-oxylipins in plant defense*. Trends Plant Sci., 7: 315 –321.
- Bonhert H.J., Nelson D.E. Jensen R.G. (1995). *Adaptations to Environmental Stresses*. Plant Cell, 7: 1099-1111.
- Boyer G.L., Zeevaart J.AD. (1982). *Isolation and Quantitation of β -D-Glucopyranosyl Abscisate from Leaves of Xanthium and Spinach* . Plant Physiol., 70: 227–231.
- Bray E.A., Bailey-Serres J., Weretilink E. (2000). *Responses to abiotic stresses*. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. Rockville MD, pp: 158-1249.
- Brouillard R., Delaporte B., Dubois J.E. (1978). *Chemistry of anthocyanin pigments. Relaxation amplitudes in pH-jump experiments*. J. Am. Chem. Soc., 10: 6202-6205.
- Burger J., Edwards G.E. (1996). *Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties*. Plant Cell Physiol., 37:395-399.
- Cattivelli L., Bartels D. (1990). *Molecular cloning and characterization of cold-regulated genes in barley*. Plant Physiol., 93: 1504-1510.

- Cattivelli L., Baldi P., Crosatti C., Grossi M., Valè G., Stanca A.M. (2002). *Genetic bases of barley physiological response to stressful conditions. Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality* (Slafer G.A., J.L. Molina-Cano, R. Savin, J.L. Araus, I. Romagosa eds.). Food Product Press, New York-USA. pp. 269-314.
- Cattivelli L., Baldi P., Crosatti C., Di Fonzo N., Faccioli P., Grossi M., Mastrangelo A.M., Pecchioni N., Stanca A.M. (2002). *Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in Triticeae*. *Plant Mol. Biol.*, 48: 649-665.
- Chalker-Scott L. (1992). *Disruption of an ice-nucleation barrier in cold hardy Azalea buds by sublethal heat stress*. *Ann. Botany*, 70: 409-418.
- Chalker-Scott L. (1999). *Environmental significance of anthocyanins in plant stress response*. *Photochem. Photobiol.*, 70: 1-9.
- Chauvin L.P., Houde M., Sarhan F. (1993). *A leaf-specific gene stimulated blight during wheat acclimation to low temperature*. *Plant Mol. Biol.*, 23: 255-265.
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M., Zhu J.K. (2003). *ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 17:1043-1054.
- Chinnusamy V., Schumaker K., Zhu J. (2004). *Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants*. *J. Exp. Bot.*, 55: 225-236.
- Choi H.I., Hong J.H., Ha J.O., Kang J.Y., Kim S.Y. (2000). *ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors*. *J. Biol. Chem.*, 275:1723-1730.

- Christie P.J., Alfenito M.R., Walbot V. (1994). *Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings*. *Planta*, 194:541-549.
- Connor A.M., Luby J.J., Hancock J.F., Berkheimer S., Hanson E.J. (2002). *Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage*. *J. Agric. Food Chem.*, 50:893-898.
- Cotroneo P.S., Lo Piero A.R., Ciuni M., Russo M.P., Reforgiato Recupero G. (2006). *Quantitative Real-time Reverse Transcriptase-PCR Profiling of Anthocyanin Biosynthetic Genes during Orange Fruit Ripening*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 131: 537-543.
- Cowan A.K. (2000). *Is abscisic aldehyde really the immediate precursor to stress-induced ABA?* *Trends Plant Sci.*, 5:191-192.
- Crosatti C., Soncini C., Stanca A.M., Cattivelli L. (1995). *The accumulation of a cold-regulated chloroplastic protein is light-dependent*. *Planta*, 196: 458-463.
- Crosatti C., Polverino de Laureto P., Bassi R., Cattivelli L. (1999). *The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene cor14b and accumulation of the corresponding protein*. *Plant Physiol.*, 119: 671-680.
- Cunningham F.X., Gantt E. (1998). *Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:557-583.
- Davies W.J., Wilkinson S., Loveys B. (2002). *Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture*. *New Phytol.*, 156: 449-460.

- Diatchenko L., Chenchik L., Siebert P.D. (1996a) *Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*. PNAS-USA, 93: 6025-6030.
- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert PD. (1996b). *Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries*. PNAS-USA, 93: 6025-6030.
- Dietz K.J., Sauter A., Wichert K., Messdaghi D., Hartung W. (2000). *Extracellular β -glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves*. J. Exp. Bot., 51: 937-944.
- Dixon R.A., Palva N.L. (1995). *Stress-induced phenylpropanoid metabolism*. Plant Cell, 7:1085-1097.
- Dunn M.A., Goddard N.J., Zhanag L., Pearce R.S., Hughes M.A. (1994). *Low-temperature-responsive barley genes have different control mechanisms*. Plant Mol. Biol., 24: 879-888.
- Drumm-Herrel H., Bergfeld R., Mohr H. (1984). *Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for anthocyanin synthesis*. Plant Science, 93: 245-25.
- Eisenreich W., Rohdich F., Bacher A. (2001). *Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids*. Trends Plant Sci., 6:78-84.
- Fan Jiang, Hartung W. (2008). *Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal*. J. Exp. Bot., 59: 37-43.

- Federighi G. (2006). *Utilizzo della ibridizzazione sottrattiva soppressiva per isolare geni differenzialmente espressi nel cervello di ratto in seguito al trattamento con Acetil-L-Carnitina (ALC)*. Tesi di laurea
- Field T.S., Lee D.W., Holbrook N.M. (2001). *Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-Osier dogwood*. *Plant Physiol.*, 127:566-574.
- Foot J.P., Caporn S.J.M., Lee J.A., Ashenden T.W. (1996). *The effect of long-term ozone fumigation on the growth, physiology and frost sensitivity of Calluna vulgaris*. *New Phytol.*, 133:503-511.
- Fowler S., Thomashow M.F. (2002). *Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway*. *Plant Cell*, 14:1675-1690.
- Fricke W., Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G. (2004). *Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves*. *J. Exp. Bot.*, 55: 1115-1123.
- Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M.,(1996). *A novel method for real time quantitative RT-PCR*. *Genome*, 6: 995-1001.
- Gilmour S.J., Sarah J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M., Thomashow M.F. (1998). *Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR expression*. *Plant J.*, 16:433-442.
- Grabov A., Blatt M.R., (1997). *Parallel control of the inward-rectifier K⁺ channel by cytosolic free Ca²⁺ and pH in Vicia guard cells*. *Planta*, 201: 84-95.

- Grace S., Logan B.A., Keller A., Demming-Adams B., Adams III W.W. (1996). *Acclimation of foliar Antioxidant system to growth irradiance in three Broad-Leaved evergreen species*. Plant Physiol., 112: 1631-1640.
- Graham T.L. (1991). *Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissue and in seed and root exudates*. Plant Physiol., 95: 594-603.
- Graham T.L. (1998). *Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in Arabidopsis*. Plant Physiol. Biochem., 36:135-144.
- Guiltinan M.J., Marcotte J.W.R., Quatrano R.S. (1990). *A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element*. Science 250:267-271.
- Guy L. (1990). *Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism*. Annu. Rev. Plant. Physiol., 41: 187-223.
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F., Zhang J.Z. (2002). *Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis*. Plant Physiol., 130:639-648.
- Hartung W., Peuke A.D., Davies W.J. (1999). *Abscisic acid – a hormonal long distance stress signal in plants under drought and salt stress*. In Handbook of Plant and Crop Stress. M. Pessarakli, pp. 731–747. Marcel Dekker, New York.
- Hartung W., Sauter A., Hose E. (2002). *Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to?* J. Exp. Bot., 53: 27-37.
- Heath M.C. (2000). *Hypersensitive response-related death*. Plant Mol. Biol., 44:321-334.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996). *Real time quantitative PCR*. Genome Res., 6:986-94.

- Hirschberg J. (2001). *Carotenoid biosynthesis in flowering plants*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4:210-218.
- Hirt H. (2000). *Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway*. *PNAS*. 97:2405-2407.
- Hopkins W.G. (1999). *The Physiology of plants under stress*. Introduction to Plant Physiology. Wiley and sons, New York pp: 451- 475.
- Horvath I., Glatz A., Varvasovszki V., Török Z., Páli T., Balogh G., Kovács E., Nádasi L., Benkő S., Joó F., Vígh L. (1998). *Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in Synechocystis PCC 6803: identification of hsp17 as a "fluidity gene"*. *PNAS*, 95:3513-3518.
- Hubick K.T., Reid D. M. (1980). *A Rapid Method for the Extraction and Analysis of Abscisic Acid from Plant Tissue*. *Plant Physiol.* 65, 523-525.
- Hugly S., Somerville C. (1992). *A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature*. *Plant Physiol.*, 99:197-202.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000). *Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6*. *Plant J.*, 24:655-665.
- Jeschke WD, Baig A, Hilpert A. (1997). *Sink-stimulated photosynthesis, increased transpiration and increased demand-dependent stimulation of nitrate uptake: nitrogen and carbon relations in the parasitic association Cuscuta reflexa–Coleus blumei*. *J. Exp. Bot.*, 48:915–925.
- Jiang C., Iu B., Singh J. (1996). *Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the BN115 gene from winter Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, 30: 679-684.

- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Barker P.J. (1996). *Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought*. PNAS, 93:11274-11279.
- Kalt W., Forney C. F., Martin A., Prior R. L. (1999). *Antioxidant capacity, vitamin C, phenolic and anthocyanins after fresh storage of small fruits*. J. Agric. Food Chem., 47:4638-4644.
- Kessler A., Baldwin I.T. (2002). *Plant response to insect herbivory: The Emerging Molecular Analysis*. Ann. Rev. Plant Biol., 53: 299-328.
- Kim J.C., Lee S.H., Cheng Y.H., Yoo C.M., Lee S.I., Chun H.J., Yun D.J., Hong J.C., Lee S.Y., Lim C.O., Cho M.J. (2001). *A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1 enhances cold tolerance in transgenic plants*. Plant J. 25:247-259.
- Kliewer W.M., Torres R.E. (1972). *Effect of controlled day and night temperatures on grape coloration*. Am. J. Enol. Vitic., 23:71-77.
- Knight H., Trewavas A.J., Knight M.R. (1996). *Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation*. Plant Cell, 8:489-503.
- Knight H., Veale E.L., Warren G.J., Knight M.R. (1999). *The sfr6 mutation in Arabidopsis suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif*. Plant Cell, 11:875-886.
- Knight H., Knight M.R. (2001). *Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk*. Trends Plant Sci., 6:262-267.
- Komatsu S., Konishi H., Hashimoto M. (2006). *The proteomics of plant cell membranes*. J. Exp. Bot., 58:103-12.
- Kreps J.A., Wu Y., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Harper J.F. (2002). *Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic and cold stress*. Plant. Physiol., 130: 2129-2141.

- Krol M., Gray G.R., Hurry V.M., Öquist G., Malek L., Huner N.P.A. (1995). *Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in Pinus bank-siana seedlings*. Can. J. Bot., 73:1119-1127.
- Larkindale J., Knight M.R. (2002). *Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid*. Plant Physiol., 128:682-695.
- Lee H., Xiong L., Gong Z., Ishitani M., Stevenson B., Zhu J.K. (2001). *The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning*. Genes Dev., 15:912-924.
- Lee H.S., Milborrow. B.V. (1997). *Endogenous biosynthetic precursor of (+)-abscisic acid. Inhibition by tungstate and its removal by cinchonine shown that xanthoxal is oxidised by a molybdo-aldehyde oxidase*. Aust. J. Plant Physiol., 24:727-732.
- Leng P., Itamura H., Yamamura H. (1993). *Freezing tolerance of several Diospyros species and kaki cultivars as related to anthocyanin formation*. J. Jpn. Soc. Hort. Sci., 61:795-804.
- Leyva A., Jarillo J.A., Salinas J., Martinez-Zapater J.M. (1995). *Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of Arabidopsis thaliana in a light-dependent manner*. Plant Physiol., 108:39-46.
- Lichtenthaler B.V. (1999). *The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol., 50:47-65.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998). *Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal*

transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. Plant Cell, 10:1391-1406.

- Lo Piero A.R., Puglisi I., Petrone G. (2005a). *Anthocyanins accumulation and related gene expression in red orange fruit induced by low temperature storage. J. Agric. Food Chem., 53: 9083-9088.*
- Lo Piero A.R., Consoli A., Puglisi I, Orestano G., Reforgiato Recupero G., Petrone G. (2005b). *Anthocyaninless cultivars of sweet orange lack to express the UDPglucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase. J Plant Bioch. Biot., 14: 1-6.*
- Lo Piero A.R., Puglisi I., Petrone G. (2006). *Gene characterization, analysis of expression and in vitro synthesis of dihydroflavonol 4-reductase from [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. Phytochem., 67: 684-695.*
- Lynch D.V. (1990). *Chilling injury in plants: the relevance of membrane lipids. In Environmental Injury to Plants (ed F. Katterman), Academic Press, S. Diego (CA), pp: 17-34.*
- Maccarone E.(1997). *Dalla Cina a Bruxelles. Tec. Agric., 4: 1-12.*
- Maccarone E., Campisi S., Fallico B., Rapisarda P., Sgarlata R. (1998). *Flavour components of Italian orange juice. J. Agric. Food Chem., 46: 2293-2298.*
- Maccarone E., Maccarrone A., Rapisarda P. (1987). *Technical note: Colour stabilization of orange fruit juice by tannic acid. Int. J. Food Sci. Technol., 22:159-162.*
- Mahajan S., Tutela N. (2005). *Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch. Biochem. Biophys., 444: 139–158.*
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). *Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr., 79:727-747.*

- Mansfield T.J., Atkinson C.J. (1990). *Stomatal behavior in water stressed plants*. In *Stress Response in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Wiley-Liss, New York, pp: 241-264.
- Mansfield, McAinsh (1995). *Hormones as regulators in water balance*. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, pp: 836
- Marin E., Nussaume L., Quesada A., Gonneau M., Sotta B., Huguency P., Frey A., Marion-Poll A. (1996). *Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of Nicotiana plumbaginifolia, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana*. EMBO J., 15:2331-2342.
- Marin M.G. (1999). *Diagnostica di laboratorio: tecniche di amplificazione genica*. Milano: Edizioni Sorbona. 50.
- Marschner H. (1991). *Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere*. In *Plant Roots, the Hidden Half*, Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi.
- Martinez M.C., Pretel T., Serrano M., Romojaro F. (1999). *Role of Ethylene and Abscisic Acid in Physicochemical Modifications during Melon Ripening*. J. Agric. Food Chem., 47: 5285-5290.
- McKemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. (2002). *Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation*. Nature, 416:52-58.
- Medina J., Bargues M., Terol J., Perez-Alonso M., Salinas J. (1999). *The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration*. Plant Physiol., 119:463-469.

- Menkens A.E., Schindler U., Cashmore A.R. (1995). *The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins*. Trends Biochem. Sci., 20:506-510.
- Mertens, R., Neumann D., Weiler E.W. (1983). *Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator, Abscisic Acid*. FEBS Lett., 160:269-272.
- Mertens, R., Eberle, J., Arnscheidt, A., Ledebur, Weiler E.W. (1985). *Monoclonal antibodies to plant growth regulators II Indole-3-acetic acid*. Planta, 166:389-393.
- Mikami K., Kanasaki Y., Suzuki I., Murata N. (2002). *The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in Synechocystis sp. PCC 6803*. Mol. Microbiol., 46: 905–915.
- Milborrow B.V. (2001). *The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis*. J. Exp. Bot., 52:1145–1164.
- Moffatt B., Ewart V., Eastman A. (2006). *Cold comfort: plant antifreeze proteins*. Physiol. Plant., 126: 5–16.
- Mol J., Jenkins G.I., Schaefer E., Weiss D. (1996). *Signal perception, trasduction, and gene expression involved in anthocyanin biosynthesis*. Crit. Rev. Plant Sci., 15:525-557.
- Moore S., Vrebalov J., Payton P., Giovannoni J. (2002). *Fruit development and ripening special issue*. J. Exp. Bot., 53: 2023-2030.
- Mundy J., Yamaguchi-Shinozaki K., Chua N.H. (1990). *Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene*. PNAS., 87:1406-1410.
- Nambara E., Marion-Poll A. (2005). *Abscisic acid biosynthesis and catabolism*. Ann. Rev. Plant Biol., 56:165-185.

- Oren-Shamir M., Levi-Nissim A. (1997). *Temperature effect on the leaf pigmentation of Cotinus coggygia "Royal Purple"*. J. Hort. Sci., 72:425-432.
- Oren-Shamir M., Levi-Nissim A. (1997b). *UV-light effect on the leaf pigmentation of Cotinus coggygia "Royal Purple"*. J. Hort. Sci., 71:59-66.
- Oren-Shamir M., Nissim-Levi A., Ovadia R., Kagan S., Shaked-Sachray L. (2003). *Increased anthocyanin accumulation in flowers and foliage at elevated temperatures is affected by magnesium treatment*. Acta Hort., 624: 171-176.
- Örvar B.L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R.S. (2000). *Early steps in cold sensing by plant cells: the role of action cytoskeleton and membrane fluidity*. Plant J., 23:785-794.
- Pearce R.S. (2001). *Plant freezing damage*. Ann. Bot., 87: 417-424.
- Pei Z.M., Kuchitsu K., Ward J.M., Schwarz M., Schroeder J.I. (1997). *Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in Arabidopsis wild-type and abi1 and abi2 mutants*. Plant Cell, 9: 409-23.
- Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A., Reeve A., Andersson D., Story G., Earley T., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S. (2002). *A TRP channel that senses cold stimuli and menthol*. Cell, 108:705-715.
- Popoff I.C., Sachs R.M., Gibbs B. (1972). *Structures related to abscisic acid and their effect on plant growth*. Agric. Food Chem., 20: 665-667.
- Ramalingam J., Vera Cruz C.M., Kukreja K., Chittoor J.M., Wu J.L., Lee S.W., Baraoidan M., George M.L., Cohen M.B., Hulbert S.H., Leach J.E., Leung H. (2003). *Candidate defense genes from rice, barley, and maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice*. Mol Plant Microbe Interact., 16: 14-24.

- Rimari A., Strommer J. (1998). *Anthocyanin regulatory mutations in pea: effects on gene expression and complementation by R-like genes of maize*. Mol. Gen. Genet., 257:198-204.
- Robinson T. (1991). *The organic constituents of Higher Plants*. Cordus Press, North Amherst, MA.
- Rock C.D., Heath T.G., Gage D.A., Zeevaart J.A.D. (1991). *Absciscic alcohol is an intermediate in absciscic acid biosynthesis in a shunt pathway from absciscic aldehyde*. Plant Physiol., 97:670-676.
- Rook F., Corke F., Card R., Munz G., Smith C., Bevan M.W. (2001). *Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by absciscic acid signaling*. Plant J., 26:421-433.
- Ross J.A., Kasum C.M. (2002). *Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety*. Annu. Rev. Physiol., 22: 19-34.
- Salisbury, F. B., Ross, C. W. (1992). *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth. pp. 357-407, 531-548.
- Sangwan V., Örvvar björn L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R. (2002). *Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways*. Plant J., 31:629-638.
- Sauter A., Hartung W. (2000). *Absciscic conjugates – do they play a role as long distance stress signal in the xylem?* J. Exp. Bot., 51: 929–935.
- Schmelzer E. (2002). *Cell polarization, a crucial process in fungal defence*. Trends Plant Sci., 7: 411-415
- Schmucker T. (1947). *Anthocyanin im Holz der Rotbuche*. Naturwissenschaften, 34: 91.

- Schwartz S.H., Qin X., Zeevaart J.A.D. (2003). *Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes and enzymes*. Plant Physiol., 131:1591-1601.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Ono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T. (2002). *Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses by using a full-length cDNA microarray*. Plant J., 31: 279-292.
- Shaked-Sachray L., Weiss D., Reuveni M., Nissim-Levi A., Oren-Shamir M. (2002). *Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment*. Physiol. Plant., 114: 559-565.
- Shichijo C., Hamada T., Hiraoka M., Johnson C.B., Hashimoto T. (1993). *Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period*. Planta, 191:238-245.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). *Molecular responses to dehydration low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways*. Curr. Opin. Plant Biol., 3: 217-223.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003) *Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses*. Curr. Opin. Plant Biol., 6: 410-417.
- Shinwari Z.K., Nakashima K., Miura S., Kasuga M., Seki M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998). *An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 250:161-170.

- Shvartz M., Borochoy A., Weiss D. (1997). *Low temperature enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression*. *Physiol. Plant.*, 99: 67-72.
- Stockinger E.J., Gilmour S.J., Thomashow M.F. (1997). *Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit*. *PNAS*, 94:1035-1040.
- Sung D., Kaplan F., Lee K.J., Guy C.L. (2003). *Acquired tolerance to temperature extremes*. *Trends Plant Sci.*, 8: 179-187
- Suzuki I. Dmitry A. Los, Kanesaki Y., Mikami K., Murata N. (2000). *The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in Synechocystis*. *EMBO J.*, 19: 1327–1334.
- Taiz L., Zeiger E. (1996). *Fisiologia vegetale*. Piccin Editore.
- Thomashow M.F. (1999) *Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms*. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 50: 571–599.
- Thomashow M. F. (2001). *So What's New in the Field of Plant Cold Acclimation?* *Am. Soc. Plant Physiol.*, 125: 89-93.
- Tignor M.E., Davies F.S., Sherman W.B., Davis J.M. (1997). *Rapid freezing acclimation of Poncirus trifoliata seed-lings exposed to 10 degrees and long days*. *Hort Sci.*, 32:854-857.
- Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S., Kawakishi S., Osawa T., (1994). *Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanin 3-O-β-D-glucoside and cyanidin*. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 2407-2410.

- Tsuda T., Shiga K., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T. (1996). *Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Pharmacol.*, 52:1033-1039.
- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2000). *Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathways under drought and high-salinity conditions*. *PNAS*, 97:11632-11637.
- Vinocur B., Altman A. (2005). *Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations*. *Curr. Opin. in Biotechnol.*, 16:123–132.
- Vogel J.T., Zarka D.G., Van Buskirk H.A., Fowler S.G., Thomashow M.F. (2005). *Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis*. *Plant J.*, 41:195-211.
- Wang H., Cao G., Prior R.L., (1997). *Oxygen radical capacity of anthocyanins*. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 304-9.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003). *Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance*. *Planta*, 218:1-14.
- Weiler, E. W. (1979). *Radioimmunoassays for the determination of free and conjugated Abscisic Acid*. *Planta*, 144:255-263.
- Weiler, E.W. (1980) *Radioimmunoassay for trans-zeatin and related cytokinins*. *Planta*, 149, 155-162.

- Weiler, E. W. (1980). *Radioimmunoassays for the differential and direct analysis of free and conjugated Abscisic Acid in plant extracts*. *Planta*, 148:262-272.
- Weiler, E. W. (1981). *Radioimmunoassay for pmol-quantities of Indole-3-acetic acid for use with highly stable [125I]-and [3H] IAA derivatives as radiotracers*. *Planta*, 153:319-325.
- Weiler, E. W. (1982.) *An enzyme-immunoassay for cis-(+)-Abscisic Acid*. *Physiol. Plant.*, 54:510-514.
- Weiler, E. W. (1984). *Immunoassay of plant growth regulators*. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35:85-95.
- Weiler, E. W., Spanier K. (1981). *Phytohormones in the formation of crown gall tumors*. *Planta*, 153:326-337.
- Weiler E. W., Jourdan P. S., Conrad W. (1981). *Levels of Indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay*. *Planta*, 153:561-571.
- Wilkinson S., Davies W.J. (1997). *Xylem Sap pH Increase: A Drought Signal Received at the Apoplastic Face of the Guard Cell That Involves the Suppression of Saturable Abscisic Acid Uptake by the Epidermal Symplast*. *Plant Physiol.*, 11: 559-573.
- Wilkinson S., Davies W.J. (2002). *ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants*. *Plant Cell Environ.*, 25: 195-210.
- Williams J.P., Khan M.U., Mitchell K., Johnson G. (1988). *The Effect of Temperature on the Level and Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids in Diacylglycerols of Brassica napus Leaves*. *Plant Physiol.*; 87:904–910.
- Wilson K., Walker J. (2006). *Biochimica e biologia molecolare. Principi e tecniche*. Raffaello Cortina Ed.

- Winkel-Shirley B. (2001). *Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology*. Plant Biol., 126: 485-493.
- Winkel-Shirley B. (2002). *Biosynthesis of flavonoids and effects of stress*. Curr. Opin. Plant Biol., 5: 218-223.
- Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. (1997). *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*. Biotechniques, 22: 133-138.
- Wojtaszek P., Stobiecki M., Gulewicz K. (1993). *Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of intact white lupin (Lupinus albus L.) plants*. Plant Physiol., 142: 689-694.
- Wu J., Lightner J., Warwick N., Browse J. (1997). *Low-temperature damage and subsequent recovery of fab1 mutant Arabidopsis exposed to 2°C*. Plant Physiol., 113:347-356.
- Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002). *Cell signaling during cold, drought, and salt stress*. Plant Cell, 14:165-183.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1992). *A novel Arabidopsis DNA binding protein contains the conserved motif of HMG-box proteins*. Nucleic. Acid Res., 20:6737.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1994). *A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress*. Plant Cell, 6: 251-264.
- Zacarias L., Rodrigo M.J., Alquezar B. (2006). *Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress*

conditions, from orange (Citrus sinensis L.Osbeck). J. Exp. Bot., 57: 633-643.

- Zeevaart J.A.D. (1999). *Absciscic acid metabolism and its regulation*. Biochem. Mol. Biol. Plant Hormones, Elsevier Science, Amsterdam, pp: 189-207
- Zeevaart J.A.D., Creelman R.A. (1988). *Metabolism and physiology of absciscic acid*. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 39:439-473.