

S. LUCIOLI, M. SCORTICHINI, E. CABONI

Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi
dell'Economia Agraria
Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura
Roma

S. BOLLANTI, D. MURRA, P. DI LAZZARO

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Laboratorio Applicazioni dei plasmi
ed esperimenti interdisciplinari
Centro Ricerche Frascati

P. NOTA

Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi
dell'Economia Agraria
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
Roma

A. LAI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati

L. BACCHETTA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Laboratorio Bioprocessi e Bioprodotti
Centro Ricerche Casaccia

**EFFETTO ORMESI NEI KIWI (*ACTINIDIA SPP.*)
STIMOLATO DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA-C**

RT/2024/1/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

S. LUCIOLI, M. SCORTICHINI, E. CABONI

Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi
dell'Economia Agraria
Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura
Roma

S. BOLLANTI, D. MURRA, P. DI LAZZARO

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Laboratorio Applicazioni dei plasmi
ed esperimenti interdisciplinari
Centro Ricerche Frascati

P. NOTA

Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi
dell'Economia Agraria
Centro di Ricerca Difesa e Certificazione
Roma

A. LAI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati

L. BACCHETTA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Laboratorio Bioprocessi e Bioprodotti
Centro Ricerche Casaccia

EFFETTO ORMESI NEI KIWI (*ACTINIDIA SPP.*) STIMOLATO DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA-C

RT/2024/1/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina www.enea.it

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

EFFETTO ORMESI NEI KIWI (*ACTINIDIA SPP.*) STIMOLATO DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA-C

S. Lucioli, S. Bollanti, D. Murra, P. Nota, M. Scortichini, E. Caboni, A. Lai, L. Bacchetta, P. Di Lazzaro

Riassunto

Studi scientifici hanno dimostrato che l'irradiazione con raggi ultravioletti UV-C può aumentare la resistenza naturale delle piante ai patogeni e alle malattie, sia prima che dopo la raccolta. Una dose appropriata di raggi UV-C induce la produzione di metaboliti che rafforzano le difese naturali delle piante, effetto noto come "ormesi". L'ormesi è un'alternativa promettente ai fitofarmaci sintetici, che sono dannosi per l'ambiente e la salute umana. Questo Rapporto nasce dalla collaborazione tra ENEA (Centri di Frascati e Casaccia) e CREA (Centro di Ricerca per l'Olivicoltura, la Frutticoltura e l'Agrumicoltura di Roma); esso descrive gli effetti dei raggi UV-C emessi da matrici di Light Emitting Diodes (LED), atti a generare una risposta ormetica in piante di kiwi (*Actinidia spp.*) esposte al patogeno *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* prima o dopo irraggiamento.

Parole chiave: Actinidia; Kiwi; Ormesi; *Pseudomonas syringae*; Radiazione ultravioletta; UV-C.

HORMETIC RESPONSE IN KIWIFRUIT (*ACTINIDIA SPP.*) STIMULATED BY ULTRAVIOLET RADIATION-IN BAND C

Abstract

Scientific studies have shown that irradiation with UV-C ultraviolet rays can increase plant resistance to pathogens and diseases, either before or after harvest. An adequate dose of UV-C radiation induces the production of metabolites that strengthen plants' natural defenses, an effect known as "hormesis." Hormesis is a promising alternative to synthetic pesticides that are harmful to the environment and human health.

*This report, the result of the joint work of ENEA (Frascati and Casaccia Research Centers) and CREA (Research Center for Olive, Fruit and Citrus Cultivation, Rome) describes the effects of UV-C radiation emitted by Light Emitting Diodes (LED) arrays, which can generate a hormesis response in kiwifruit (*Actinidia spp.*) plants exposed to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pathogens before or after irradiation.*

Keywords: Actinidia; Hormesis; Kiwifruit; *Pseudomonas syringae*; Ultraviolet radiation; UV-C.

INDICE

INTRODUZIONE	7
MATERIALI e METODI	8
RISULTATI	13
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	17
REFERENZE	19

EFFETTO ORMESI NEI KIWI (*ACTINIDIA SPP.*) STIMOLATO DA RADIAZIONE ULTRAVIOLETTA - C

“Tutte le sostanze sono tossiche, solo la dose fa la differenza tra un veleno e un medicamento”
(Paracelso, XVI secolo)

INTRODUZIONE

Il lavoro di ricerca descritto in questo Rapporto nasce da precedenti osservazioni (Bacchetta, et al. 2021) su frutti di diverse specie vegetali, circa la stimolazione del fenomeno dell'ormesi indotta da irraggiamento con radiazione UV-C, la quale favorisce un effetto fungicida/fungistatico in presenza di infezione con *Penicillium* e *Botrytis*. Contrariamente al tradizionale uso delle lampade a mercurio, che emettono radiazione a 254 nm, in Bacchetta, et al. (2021) si è utilizzata una matrice di Light Emitting Diodes (LED) che emette radiazione a 277 nm. La scelta dei LED è motivata dalle migliori caratteristiche di robustezza, peso e trasportabilità dei LED rispetto alle lampade. Pertanto, i LED sono una scelta conveniente per applicazioni sul campo. In aggiunta, i LED emettono una potenza radiativa più stabile nel tempo rispetto alle lampade e sono quindi più affidabili in irraggiamenti di lunga durata.

È noto che l'esposizione a radiazioni UV può indurre le piante a produrre metaboliti di risposta agli stress biotici e abiotici (Duarte-Sierra et al. 2019; Loconsole et al. 2021; Scott et al. 2021; Sidibé et al. 2022).

Tali metaboliti hanno un effetto inibitore dei microrganismi patogeni, oltre a migliorare la resistenza delle piante. Enzimi antiossidanti, metaboliti secondari e modificazioni della parete cellulare aumentano le risposte protettive, risolvono il danno ossidativo provocato dai raggi UV tramite l'eliminazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotte quando il metabolismo è compromesso dagli stress, e migliorano la resistenza agli agenti patogeni (Godínez-Mendoza et al. 2023). In particolare, i fenoli sono molecole dalle proprietà antiossidanti la cui biosintesi aumenta in risposta a numerosi tipi di stress innescati sia da condizioni ambientali che da agenti patogeni; l'accumulo dei composti fenolici aiuta le piante a inibire i ROS. Anche i carotenoidi, pigmenti che assorbono la luce nello spettro visibile e trasferiscono l'energia catturata alla clorofilla, svolgono un importante ruolo fotoprotettivo e antiossidante. L'insieme di questi eventi biochimici attivati dalla radiazione UV e le loro azioni benefiche per la pianta è conosciuto come “ormesi”.

I meccanismi molecolari alla base dell'ormesi nelle piante sono ancora in fase di studio, ma si ritiene che il processo ormetico coinvolga diversi fattori, tra cui:

- recettori di stress: diversi recettori delle piante possono rilevare differenti tipi di stress e innescare una cascata di segnali che porta a una risposta adattativa;
- trasduzione del segnale: la cascata di segnali che viene attivata dai recettori di stress coinvolge una serie di proteine che trasmettono il segnale da un recettore all'altro;

- espressione genica: l'espressione genica è regolata da una varietà di fattori, tra cui i segnali di stress. L'esposizione a basse dosi di stress può indurre la pianta ad attivare geni che codificano proteine che migliorano la protezione da stress più gravi;
- modifiche post-traduzionale: le proteine possono essere modificate dopo la traduzione in una varietà di modi, tra cui la fosforilazione, l'acetilazione e la metilazione. Queste modifiche possono alterare la funzione delle proteine e possono essere coinvolte nell'effetto ormesi (Scott et al. 2019).

Le colture *in vitro* rappresentano uno strumento utile per la rapida caratterizzazione della risposta allo stress biotico ed abiotico, in particolare nelle specie arboree, perché ottenere un numero di piante legnose o semi-legnose sufficientemente elevato è un processo lungo, soprattutto nelle specie arboree che hanno cicli riproduttivi di maggiore durata. Le colture *in vitro*, dunque, forniscono un modello sperimentale di primo *screening*, per studiare la risposta genotipo-specifica agli stress (Di Cori et al. 2013; Urbinati et al. 2018; Spigaglia et al. 2020; Urbinati et al. 2020; Gentile et al. 2021; Manici et al. 2021; Gentile et al. 2023).

La FAO stima in 270.475 ettari la superficie mondiale coltivata a kiwi, con l'Italia (24.908 ettari) seconda soltanto alla Cina (184.554 ettari) (Fideghelli, 2022); la prima regione italiana per la produzione di kiwi è il Lazio, con 9.499 ettari dedicati (dati Istat 2022). Cambiamento climatico, moria del kiwi e cancro batterico sono tra i problemi principali che gli agricoltori si vedono costretti a fronteggiare. Il cancro batterico del kiwi causato da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) si è diffuso in tutto il mondo dal 2008, con effetti devastanti sulla qualità e quantità del raccolto, ed attualmente il controllo di tale patologia si basa su approcci chimici e agronomici (Ferrante et al. 2009; Scortichini et al. 2012; Ferrante et al. 2014).

Il lavoro presentato in questo rapporto nasce dalla collaborazione tra i Centri di Ricerca ENEA di Frascati e Casaccia da un lato, e il Centro di Ricerca per l'Olivicoltura, la Frutticoltura e l'Agrumicoltura del CREA sede di Roma, dall'altro. Piantine di *Actinidia* (*A.*) *chinensis* var. *deliciosa* 'Hayward', *A. chinensis* var. *chinensis* 'Soreli' e *A. arguta* accession A0061-AG4 coltivate *in vitro* e piantine *in vivo* acclimatate e allevate in vaso di *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Soreli®, sono state inoculate con Psa, prima o dopo l'irraggiamento UV-C, per valutare l'eventuale protezione conferita dagli irraggiamenti. Per corroborare le osservazioni già raccolte sul fenomeno dell'ormesi, analisi di parametri morfofisiologici e saggi spettrofotometrici sono stati eseguiti per valutare l'eventuale variazione nel contenuto di clorofille *a* e *b*, carotenoidi, fenoli totali (TPC) e di capacità antiossidante (DPPH).

MATERIALI e METODI

Apparato di irraggiamento UV-C

Il singolo LED è un dispositivo a stato solido alimentato a 5-6 Volt, che emette una radiazione UV-C di poche decine di mW. Tuttavia, i LED possono essere organizzati in matrici a molti elementi, ottenendo sorgenti di radiazione di media potenza, compatte, robuste e rapide nell'accensione/spengimento. Queste caratteristiche rendono i LED preferibili alle lampade per applicazioni in cui è richiesta la trasportabilità. Infatti, i LED sono poco ingombranti, leggeri, facili da trasportare e richiedono un'alimentazione elettrica a bassa tensione (Murra et al. 2023). Il principale svantaggio dei LED rispetto alle lampade è l'efficienza: i LED UV-C trasformano in radiazione circa il 2% della potenza elettrica di alimentazione, mentre le lampade UV-C possono arrivare fino al 40%. Oltre alla trasportabilità, il principale vantaggio dei LED è che la radiazione UV irraggiata è costante nel tempo, mentre le lampade soffrono di un rapido decadimento della potenza ottica irradiata con il tempo.

Presso il Laboratorio Eccimeri del Centro Ricerche ENEA di Frascati sono state progettate, assemblate e caratterizzate diverse matrici di LED (modello Luminus XBT-3535-UV), che emettono radiazione centrata a 277 nm e larghezza di banda 12 nm (larghezza a metà altezza), vedi https://download.luminus.com/datasheets/Luminus_XBT-3535-UV_Datasheet.pdf. Il dispositivo mostrato nella figura 1 è una matrice di 20 LED disposti su tre file in una basetta rettangolare di dimensioni 9 × 3 cm² ed è gestito da un'elettronica che consente irraggiamenti di potenza e durata variabile a piacere. Il dispositivo include un sistema di raffreddamento, indispensabile per garantire la stabilità nel tempo dell'intensità

irraggiata, e un alimentatore a corrente costante impostabile da 0,1 a 0,35 Ampere. La temperatura dei LED è misurata da una sonda digitale a contatto.

In parallelo alla realizzazione dell'hardware, è stato sviluppato un software di simulazione ottica che fornisce sia la distribuzione spaziale, sia il valor medio dell'intensità della radiazione UV-C al variare della distanza dalla matrice di LED. I risultati della simulazione sono in ottimo accordo con i dati sperimentali di distribuzione bidimensionale dell'intensità e di variazione dell'intensità media con la distanza dalla matrice. I dettagli tecnici e le prestazioni della matrice a LED UV-C si trovano in (Murra et al. 2023).

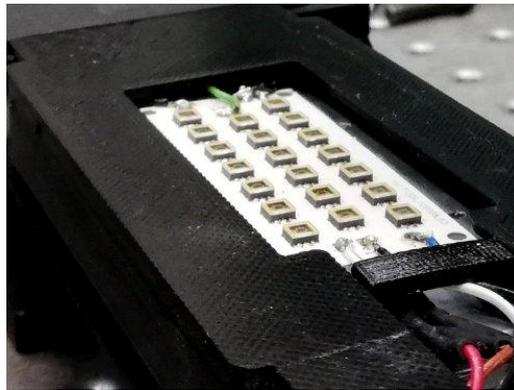


Figura 1 - Matrice di 20 LED UV-C progettata e assemblata nei laboratori ENEA di Frascati.

Materiale vegetale e condizioni di coltura

Sono stati condotti due esperimenti: 1) su materiale vegetale *in vitro* (germogli con 4 palchi fogliari in substrato gelificato); 2) piante di un anno acclimate *in vivo* ed allevate su vasi con terriccio

Colture *in vitro* di *A. chinensis* var. *deliciosa* cv. Hayward, *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Soreli® e *A. arguta* accessione A0061-AG4 sono state allestite a partire da gemme ascellari prelevate da piante adulte provenienti dalla collezione del Centro di Ricerche per l'Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura di Roma. In breve, i segmenti di ramo con almeno una gemma ascellare sono stati messi a bagno con sapone Lysoform® (Unilever Italia SpA, Italia) e lavati sotto acqua corrente per 2 ore, con lo scopo di eliminare le impurità macroscopiche. La decontaminazione è stata eseguita mediante immersione in alcol al 70% per un minuto e mertiolato di sodio (0,05 g/l, 20 minuti), e risciacquo in acqua distillata sterile. Dopo la sterilizzazione, le gemme sono state poste a crescere singolarmente in fiale (Wheaton-USA) contenenti 10 ml di terreno costituito da macrosali MS (Murashige et al. 1962) a metà concentrazione, microsali (Nitsch et al. 1969; Gautheret 1959), vitamine, 1 mg/l acido gibberellico (GA3), 0,5 mg/l benzilaminopurina (BAP), 1 mg/l di zeatina, 20 g/l di saccarosio, 1 g/l di carbone attivo e 6,5 g/l di agar (B&V). Dopo due subcolture di 10 giorni ciascuna, i germogli sviluppati sono stati trasferiti in barattoli (Magenta-Sigma-Italia) contenenti 50 ml di un terreno di moltiplicazione (GM) costituito da macrosali di Quoirin (QL) (Quoirin et al. 1977), microsali di Murashige & Skoog (MS) (Murashige et al. 1962), composti organici (0,5 mg/l acido nicotinico, 0,5 mg/l piridossina, 2,0 mg/l glicina, 0,1 mg/l tiamina-HCl, 100,0 mg/l di mioinositolo), 30 g/l di saccarosio e 5,8 g/l di agar, con l'aggiunta di 1,0 mg/l BAP. Il pH è stato regolato a $5,8 \pm 0,01$ prima di sterilizzare in autoclave il terreno a 121 °C per 20 minuti. Le colture sono state mantenute nella camera di crescita a 24 ± 1 °C, umidità relativa 70%, con un fotoperiodo di 16 ore e con un'intensità luminosa (tubi fluorescenti Philips TLD 58W/33) di $37,5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ di flusso di fotoni fotosintetici (PPF). I germogli sono stati subcoltivati in condizione asettica dentro barattoli di vetro da 200 ml (Sigma), contenenti 50 ml di terreno fresco, ogni quattro settimane (condizioni standard).

Gli esperimenti sono stati condotti su barattoli di vetro contenenti circa 5 o 6 germogli ciascuno, vedi la figura 2 a sinistra. Gli esperimenti su materiale *ex vitro* coltivato in vaso sono stati condotti su cv. Soreli. Sono state utilizzate piante *ex vitro* sane trapiantate da un anno in vasi contenenti terriccio precedentemente sterilizzato a 121 °C per 15 minuti in autoclave, vedi la figura 2, a destra.



Figura 2 – ‘Soreli’ *in vitro* a sinistra, e in vaso a destra.

Irraggiamenti

La dose rilasciata al bersaglio è espressa in energia della radiazione per unità di superficie (J/m^2). Fissata la distanza tra la matrice di LED e un piano ideale posizionato a circa $2/3$ dell'altezza massima della pianta, la dose è data dall'intensità luminosa (potenza irradiata per unità di superficie, W/m^2) su tale piano, moltiplicata per la durata dell'irraggiamento (tempo di esposizione in secondi). Per motivi di praticità, la dose è stata variata agendo sul tempo di esposizione, lasciando fissa la distanza fra LED e pianta.

Le piante *in vitro* sono state irraggiate in condizioni sterili in cappa BioHazard a flusso laminare continuo (Steril VBH) con una dose di $2,2 \text{ kJ/m}^2$ al centro del barattolo, e circa $1,5 \text{ kJ/m}^2$ sulle foglie più esterne al bordo del barattolo, vedi la figura 3. I barattoli sono stati posti su una base rotante durante l'irraggiamento per garantire un'esposizione più uniforme delle piante. Sono stati irraggiati almeno tre barattoli per ogni genotipo.

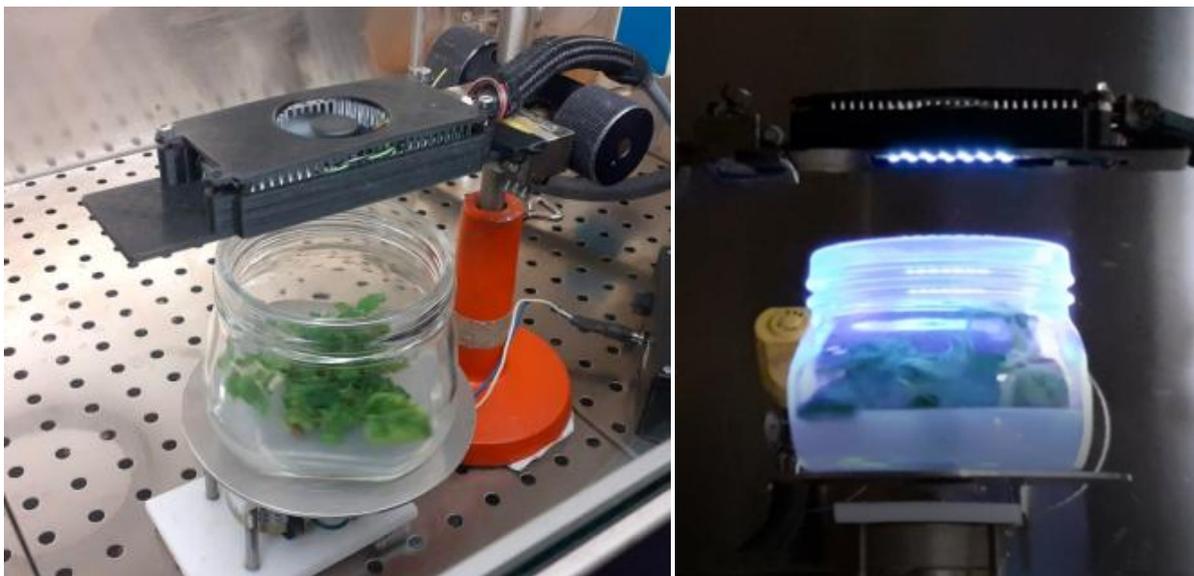


Figura 3 – Irraggiamento di germogli di Soreli *in vitro*. A sinistra sopra il vaso è visibile la matrice di LED i cui raggi (invisibili all'occhio umano) sono indirizzati in basso, in direzione dei germogli. A destra il fermo immagine al buio e dal basso consente di vedere la fluorescenza nello spettro visibile dei 20 vetrini di protezione dei LED della matrice mentre irraggiano i germogli nel recipiente in vetro.

Le piante della cultivar ‘Soreli’ coltivate in vaso sono state irraggiate in un primo esperimento con una dose a pari a $2,2 \text{ kJ/m}^2$ misurati sulle foglie più alte. Negli esperimenti successivi, le piante hanno ricevuto tre diverse dosi di irraggiamento su singola foglia ($0,3$; $0,8$; $1,3 \text{ kJ/m}^2$), su tre o quattro foglie a pianta. Nella figura 4 è mostrato l’apparato sperimentale per l’irraggiamento a singola foglia.



Figura 4 – Irraggiamento di singole foglie di ‘Soreli’ *in vivo*. La matrice di LED è racchiusa nel box nero sopra la pianta. La radiazione è diretta verso il vaso. Il foglio di carta assorbe completamente la radiazione UV-C, quindi solo la foglia scoperta riceve la dose UV-C programmata.

Rilievi morfologici macroscopici

Sulle colture *in vitro* di *A. chinensis* var. *deliciosa* cv. Hayward (4 barattoli), di *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Soreli® (undici barattoli) e di *A. arguta* accessione A0061-AG4 (4 barattoli), a tre settimane (una subcoltura) dall’irraggiamento con dose pari a $2,2 \text{ kJ/m}^2$ sono stati rilevati altezza e peso delle piantine, tasso di moltiplicazione e numero di foglie, eventuale presenza di danni. L’osservazione è continuata per tre mesi dopo l’irraggiamento.

Sulle piante coltivate in vaso, è stata valutata l’eventuale presenza di danno morfologico dopo 14 giorni dall’irraggiamento effettuato alle seguenti dosi: $2,2 \text{ kJ/m}^2$ (cinque piante di ‘Soreli’ e cinque di *A. arguta*), $1,3 \text{ kJ/m}^2$ (quattro piante di ‘Soreli’), $0,8 \text{ kJ/m}^2$ (tre piante di ‘Soreli’) e $0,3 \text{ kJ/m}^2$ (tre piante di ‘Soreli’).

Inoculazione artificiale

L’infezione artificiale di *Actinidia* spp. allevata *in vitro* con Psa è avvenuta tre giorni prima oppure 24 ore dopo l’irraggiamento UV-C a $2,2 \text{ kJ/m}^2$. Per l’inoculazione, dieci germogli sono stati separati e trasferiti singolarmente, in condizioni sterili, in provette ciascuna contenente 10 ml di sospensione batterica di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) ceppo CREA-OFA 8.43 (Ferrante et al. 2010) in acqua bidistillata sterile, vedi la figura 5. Come controlli, per ciascun genotipo sono stati inoculati dieci germogli non irraggiati, mentre dieci germogli irraggiati sono stati inoculati con acqua bidistillata sterile e altri dieci non sono stati né irraggiati né inoculati.

Trascorso il periodo di incubazione di 12 ore, i germogli sono stati trasferiti in condizioni asettiche in terreno solido di moltiplicazione e mantenuti in camera di crescita in condizioni standard. I sintomi sono stati registrati a 5, 10 e 21 giorni dopo l’infezione (dpi, *days post infection*).



Figura 5 – Infezione artificiale di *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) in germogli di *Actinidia* spp. *in vitro*.

È stato effettuato anche un test di infezione su piante coltivate in vaso: diciotto piante di *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Soreli® sono state trattate utilizzando 200 µl di sospensione batterica di *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* ($1-2 \times 10^8$ CFU ml⁻¹) inoculata sulla superficie di una ferita di 4-5 mm eseguita sulle foglie con bisturi sterile. Quarantotto ore prima dell'infezione artificiale, erano state irraggiate singolarmente 4 foglie per pianta con una dose costante pari a 1,3 kJ/m². Come controlli, in ogni pianta sono state inoculate tre foglie non irraggiate, una foglia irraggiata è stata inoculata con 200 µl di H₂O bidistillata sterile. Subito dopo l'inoculazione, ciascuna pianta, insieme al suo vaso, è stata posta in un sacco di plastica trasparente per ridurre la circolazione dell'aria. Tutti i vasi sono stati innaffiati una volta ogni 7 giorni. È stata verificata la presenza di sintomi ogni 5 giorni dall'inoculazione. Tutti i test sono stati eseguiti all'interno di una stanza isolata, con finestre che ricevevano luce naturale e temperatura che oscillava nell'intervallo 15°C - 25°C. I sintomi dell'infezione sono descritti attraverso l'indice di McKinney (MKI), vedi equazione 1, con una scala di infezione tra 0 e 5 in accordo con la Tabella 1.

$$\text{Indice di McKinney (\%)} = \mathbf{MKI(\%)} = \{[\sum (c \cdot n)]/N\} \cdot (100/C) \quad (1)$$

dove *c* è il valore della classe di infezione, *n* il numero di campioni appartenenti alla stessa classe, *N* il numero totale di campioni e *C* il valore massimo della scala di valutazione.

Tabella 1 - Indice di McKinney (MKI): descrizione della scala di infezione su germogli *in vitro* e su foglie di piante in vaso.

Classe di infezione (c)	Sintomi rilevati su germogli <i>in vitro</i>	Sintomi rilevati su foglia in vaso
0	Assenza di sintomi	Assenza di sintomi
1	≤ 5% foglie infette	Lesione molto lieve
2	5-50% foglie infette	Lesione lieve
3	>50% foglie infette	Lesione intermedia
4	100% foglie infette	Infezione forte
5	Pianta morta	Foglia caduta

Analisi spettrofotometriche

Sulle colture *in vitro* di *A. chinensis* var. *deliciosa* cv. Hayward (7 barattoli), di *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Soreli® (8 barattoli) e di *A. arguta* (8 barattoli), a 24 ore dall'irraggiamento con dose pari a 2,2 kJ/m² sono stati eseguiti i saggi spettrofotometrici per la determinazione di clorofille a e b, carotenoidi, TPC, capacità antiossidante. Il campione sotto irraggiamento diretto (box blu in figura 6) è stato confrontato con le porzioni "in ombra" dei germogli allevati *in vitro* (box rosso in figura 6). Questo disegno sperimentale consente un ulteriore controllo della variabilità su parametri estremamente sensibili quali TCP e capacità antiossidante.



Figura 6 – Campionamento del materiale *in vitro* per i saggi spettrofotometrici. I rettangoli blu e rossi indicano, rispettivamente, la zona del campione sotto irraggiamento diretto, e la zona in ombra, cioè non irraggiata.

Gli stessi saggi spettrofotometrici sono stati eseguiti su foglie di 'Soreli' coltivato in vaso, raccolte dopo 14 giorni dagli irraggiamenti con dosi pari a 1,3 kJ/m² (quattro piante di 'Soreli'), 0,8 kJ/m² (tre piante di 'Soreli') e 0,3 kJ/m² (tre piante di 'Soreli').

Le misure quantitative sono state eseguite allo spettrofotometro UV-Vis Evolution™ 300 (Thermo Fisher Scientific) misurando l'assorbanza dell'estratto in etanolo a $\lambda = 661,6$ nm, 644,8 nm e 470 nm, rispettivamente per le clorofille a e b e i carotenoidi, utilizzando i coefficienti di estinzione secondo Lichtenthaler (1987).

Il TPC è stato calcolato misurando l'assorbanza dell'estratto in etanolo a $\lambda = 765$ nm, utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu e l'acido gallico come standard per la curva di calibrazione ($R^2 = 0,999$). I risultati sono stati espressi come equivalenti di acido gallico (GAE) mg g⁻¹ di peso fresco del campione (mg GAE g⁻¹ FW).

La capacità antiossidante è stata studiata mediante saggio DPPH, misurando l'assorbanza dell'estratto in etanolo a $\lambda = 515$ nm e calcolando la percentuale di inibizione.

Il Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) è stato utilizzato come standard per la curva di calibrazione ($R^2 > 0,99$); i risultati sono stati espressi come milligrammi di Trolox equivalente per grammo di peso fresco (mg Trolox eq g⁻¹ f.w.).

Sono state eseguite cinque repliche tecniche per ciascun trattamento.

RISULTATI

Rilievi morfologici macroscopici

Per quanto riguarda gli irraggiamenti di undici barattoli della cv. 'Soreli', quattro barattoli della cv. Hayward e quattro barattoli di *A. arguta* coltivati *in vitro*, i cinque o sei germogli a barattolo sono stati controllati visivamente per tre mesi dopo l'irraggiamento UV-C. Non sono stati rilevati danni evidenti sui germogli, che

hanno mantenuto un accrescimento confrontabile con i controlli non irraggiati e un normale tasso di moltiplicazione, anche quelle sottoposti alla dose più alta di irraggiamento pari a 2,2 kJ/m².

Le cinque piantine di 'Soreli' e le cinque piantine di *A. arguta* coltivate in vaso ed irraggiate alla stessa dose massima delle piantine *in vitro*, pari a 2,2 kJ/m², dopo tre giorni hanno evidenziato segni di sofferenza rispetto alle piante non irraggiate (vedi, ad esempio, la figura 7), con imbrunimenti fogliari e afflosciamento, che hanno condotto alla morte delle piante in circa due settimane. Viceversa, le dieci piantine in vaso irraggiate a dosi più basse, rispettivamente pari a 0,3, 0,8 e 1,3 kJ/m², non hanno evidenziato alcun tipo di danno macroscopico e dopo sei mesi sono ancora vitali. Quindi, per massimizzare l'effetto ormesi ed irraggiare le piante 'Soreli' da sottoporre ad infezione artificiale, è stata scelta la maggiore dose tra quelle che non ha creato danno alle piante in vaso, pari a 1,3 kJ/m².



Figura 7 - Esempi di danno a tre giorni post irraggiamento con dose pari a 2,2 kJ/m².

Inoculazione artificiale su *Actinidia* spp. *in vitro*

Nel gruppo di controllo inoculato con Psa e non trattato con UV-C, già a 5 dpi si sono osservati sintomi di infezione fogliare iniziale, viceversa assenti nei gruppi irraggiati con una dose di 2,2 kJ/m². A 10 dpi anche i gruppi irraggiati (tranne i controlli non inoculati) hanno iniziato a presentare sintomi di infezione. La tabella 2 riporta l'indice MKI (%) a 21 dpi, quando tutti i genotipi inoculati mostrano la percentuale massima di danno.

Tabella 2 - MKI (%) a 21 dpi su *A. chinensis* var. *deliciosa* cv. Hayward, *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Soreli® e *A. arguta*. La prima riga della tabella mostra che la radiazione UV-C alla dose di 2,2 kJ/m² non ha creato danni rilevabili dalla scala MKI sulla pianta non inoculata.

Trattamento	MKI(%)		
	cv. Soreli®	cv. Hayward	<i>A. arguta</i>
UV-C	0	0	0
UV-C/Psa	38	58	42
Psa/UV-C	42	66	40
Psa	96	82	44

La figura 8 illustra lo stato dei germogli dei tre genotipi nelle diverse condizioni sperimentali a 21 dpi.

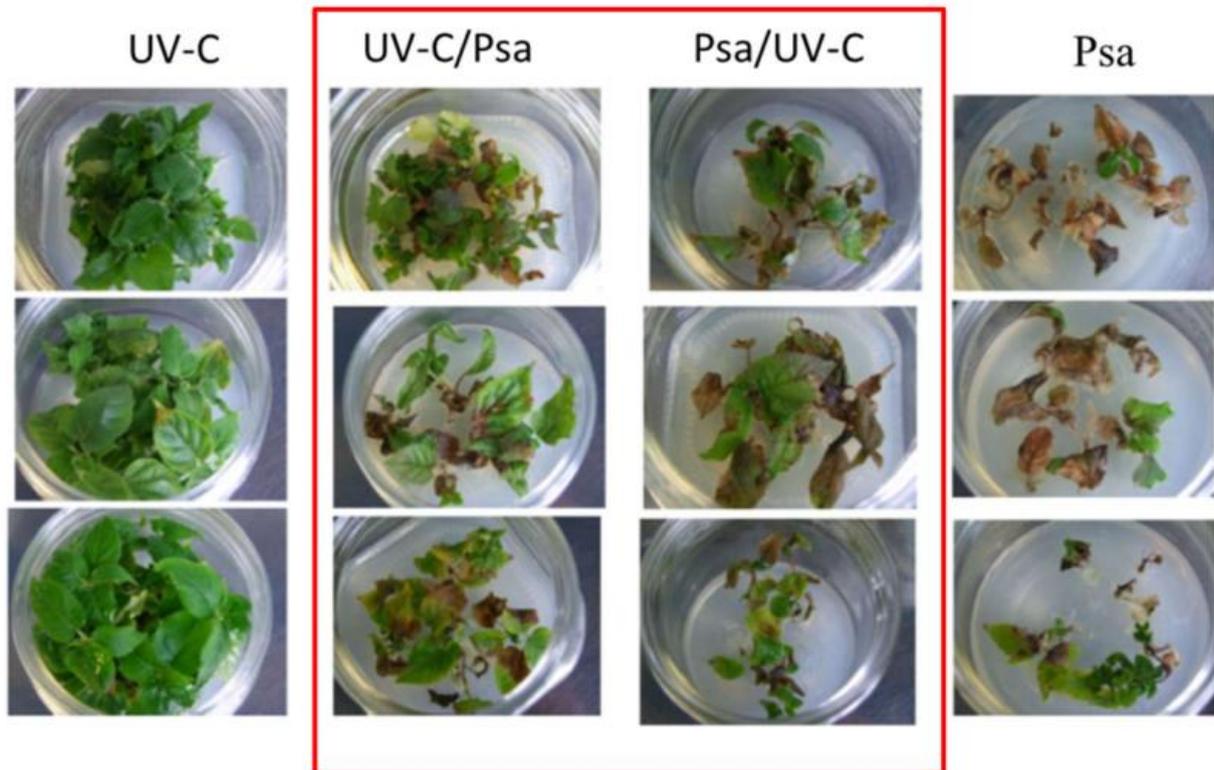


Figura 8 - *A. chinensis* var. *chinensis* cv. Soreli® (riga in alto), *A. chinensis* var. *deliciosa* cv. Hayward (riga al centro) e *A. arguta* (riga in basso) nelle diverse condizioni sperimentali a 21 dpi. Dose UV-C pari a 2,2 kJ/m² Il rettangolo rosso evidenzia l'effetto dell'UV-C sull'infezione.

Infezione artificiale su 'Soreli' *in vivo*

Nelle foglie di controllo inocolato con Psa e non trattato con UV-C, già a 7 dpi si osservano iniziali sintomi fogliari, che viceversa sono quasi assenti nei gruppi irraggiati con dose 1,3 kJ/m² e infettati. A 10 dpi anche i gruppi irraggiati (tranne i controlli non inoculati) iniziano a presentare sintomi di infezione. A 21 dpi, l'MKI (%) è pari a 35,8% nelle foglie irraggiate e inoculate, 90% nelle foglie soltanto inoculate e 20% nelle foglie irraggiate e inoculate con la sola acqua bidistillata sterile, vedi la figura 9.

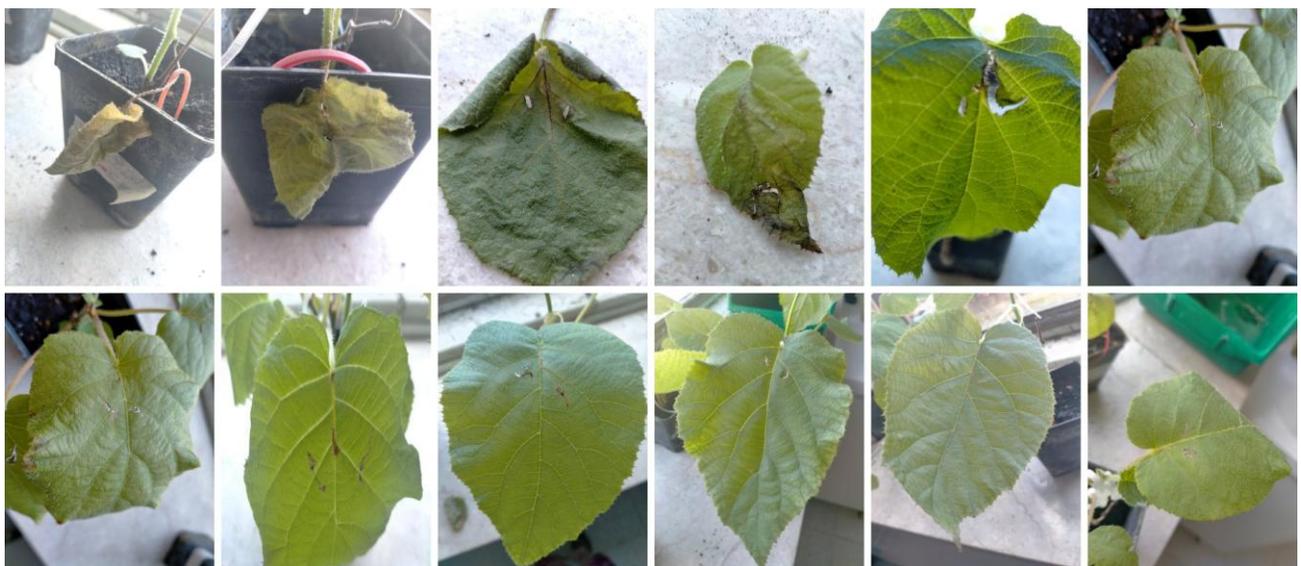


Figura 9 – A 21 dpi, in alto sono i controlli infettati e non irraggiati, e in basso le piante di 'Soreli' in vaso irraggiate con dose UV-C pari a 1,3 kJ/m².

Pigmenti fotosintetici, polifenoli totali e capacità antiossidante

La porzione di germogli moltiplicati *in vitro* di sette barattoli della cv. Hayward, otto barattoli della cv. Soreli e otto barattoli di *A. arguta* irraggiate con dose pari a 2,2 kJ/m² ha mostrato in tutti e tre i genotipi un aumento della produzione di carotenoidi rispetto al controllo, mentre le clorofille sono rimaste quasi invariate, vedi la Tabella 3. ‘Soreli’ e *A. arguta* mostrano un aumento dei TPC e dell’attività antiossidante rispetto al controllo, al contrario di ‘Hayward’ (Tabella 4). Per la cv. Hayward, pur confermando l’effetto ormetico indotto in foglie trattate con UV-C *in vitro* (54,7 *versus* 33,5 e 0,27 *versus* 0,16 mg Trolox eq/g PF), il controllo non trattato mostra valori più elevati nel contenuto di TPC e capacità antiossidante (rispettivamente 67,8 mgeqGAE/g PE e 0,39mg Trolox eq/g PF). Questo particolare risultato, che è anomalo rispetto all’andamento generale della sperimentazione, sarà oggetto di ulteriore approfondimento.

Il confronto fra i germogli ai margini del cono di luce o poste in ombra rispetto a quelli irraggiati in pieno mostra un miglioramento di tutti i parametri per tutti i genotipi, a testimoniare che la dose più elevata ha avuto maggiore effetto positivo tra i germogli irraggiati.

Tabella 3 – Confronto del contenuto di clorofille e carotenoidi, misurati su ‘Soreli,’ ‘Hayward,’ e *A. arguta* irraggiate con UV-C a dose minore ai bordi del contenitore (foglie in ombra) e al centro con dose maggiore (2,2 kJ/m², foglie irraggiate) e nelle piante di controllo. Medie con lettere diverse sono statisticamente diverse (ANOVA, Tukey’s post hoc test, p < 0.05; n = 9; errore standard ≤ 10%).

Genotipo	Clorofille (ug/mg P.F.)			Carotenoidi (ug/mg P.F.)		
	Foglie non irraggiate	Foglie in ombra	Foglie irraggiate	Foglie non irraggiate	Foglie in ombra	Foglie irraggiate
‘Soreli’	4,79 ^a	3,41 ^c	4,20 ^b	0,71 ^b	0,61 ^c	0,78 ^a
‘Hayward’	5,35 ^a	4,04 ^b	5,04 ^a	0,53 ^b	0,57 ^b	0,79 ^a
<i>A. arguta</i>	9,88 ^a	7,68 ^c	8,75 ^b	1,59 ^b	1,40 ^c	1,89 ^a

Tabella 4 – Confronto del contenuto di polifenoli totali e attività antiossidante, misurati su ‘Soreli,’ ‘Hayward’ e *A. arguta* irraggiate con UV-C a dose minore ai bordi del contenitore (foglie in ombra) e al centro con dose maggiore (2,2 kJ/m², foglie irraggiate) e nelle piante di controllo. Medie con lettere diverse sono statisticamente diverse (ANOVA, Tukey’s post hoc test, p < 0.05; n = 9; errore standard ≤ 10%)

Genotipo	TPC (mg GAEeq/g P.F.)			Capacità antiossidante (mg Trolox eq/g P.F.)		
	Piante non irraggiate	Foglie in ombra	Foglie irraggiate	Piante non irraggiate	Foglie in ombra	Foglie irraggiate
‘Soreli’	34,4 ^c	45,8 ^b	54,3 ^a	0,18 ^b	0,25 ^a	0,27 ^a
‘Hayward’	67,8 ^a	33,5 ^c	54,7 ^b	0,39 ^a	0,16 ^c	0,27 ^b
<i>A. arguta</i>	20,2 ^b	21,5 ^b	25,1 ^a	0,04 ^b	0,05 ^b	0,06 ^a

I risultati dell’analisi spettrofotometrica sulle dieci piantine in vaso irraggiate a tre dosi diverse pari a 0,3, 0,8 e 1,3 kJ/m² sono mostrati nella tabella 5. Il confronto tra foglie non irraggiate e foglie irraggiate evidenzia un aumento della produzione di clorofille, carotenoidi, polifenoli e dell’attività antiossidante nelle foglie irraggiate a dose maggiore (1,3 kJ/m²). L’irraggiamento alla dose minore mostra una produzione di clorofille e carotenoidi, polifenoli e un’attività antiossidante non significativamente diversa dalle foglie di controllo non irraggiate.

Tabella 5 - Confronto del contenuto di clorofilla a, clorofilla b, carotenoidi, polifenoli totali e capacità antiossidante, misurate su foglie di 'Soreli' in vaso, irraggiate con dosi 1,3 kJ/m², 0,8 kJ/m² e 0,3 kJ/m², nei tre gruppi di irraggiamento e nelle foglie non irraggiate (0,0 kJ/m²). Medie con lettere diverse sono statisticamente diverse (ANOVA, Tukey's post hoc test, p < 0.05; n = 9; errore standard ≤ 10%)

Dose di irraggiamento (kJ/m ²)	Clorofilla a (ug/mg P.F.)	Clorofilla b (ug/mg P.F.)	Carotenoidi (ug/mg P.F.)	TPC (mg GAE/ g P.F.)	Capacità antiossidante (mg Trolox eq/g P.F.)
0,0	1,90 ^b	0,77 ^b	0,70 ^b	34,38 ^b	4,33 ^b
0,3	2,11 ^b	0,77 ^b	0,81 ^b	33,96 ^b	4,99 ^b
0,8	3,96 ^a	1,50 ^a	1,39 ^a	34,88 ^{ab}	6,56 ^{ab}
1,3	3,44 ^a	1,27 ^a	1,19 ^a	38,63 ^a	7,47 ^a

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'allestimento di protocolli di irraggiamento UV-C specie-specifici e in relazione all'età e allo stato della pianta che si vuole irraggiare è un passaggio fondamentale per generare l'effetto ormesi e rendere le piante in grado di contrastare gli stress biotici, senza essere danneggiate.

Le piantine allevate in vaso di *Actinidia*, di circa un anno di età, hanno tollerato una dose di irraggiamento pari a 1,3 kJ/m², mentre la dose più alta rilasciata, pari a 2,2 kJ/m² ha procurato un danno grave e irreversibile su tutti e tre i genotipi di *Actinidia* presi in considerazione. Diversamente, i germogli coltivati *in vitro* non hanno manifestato danni macroscopici e hanno mantenuto un accrescimento confrontabile con i controlli non irraggiati, con un normale tasso di moltiplicazione anche quando sottoposti alla dose più alta di irraggiamento. Questi risultati confermano l'importanza di uno studio specifico per individuare l'intervallo di dose UV-C ottimale per singola coltura e condizioni di coltivazione.

L'inoculazione artificiale su *Actinidia* spp. allevata *in vitro* ha permesso di testare contemporaneamente, su un numero alto di piantine di tre genotipi diversi, la protezione indotta dall'irraggiamento sulle piantine prima o dopo l'infezione artificiale. È stato osservato un ritardo nella comparsa dei primi sintomi di infezione, che appaiono a 5 dpi nel gruppo di controllo inoculato con *Psa* non trattato con UV-C, mentre compaiono a 10 dpi nei due gruppi in trattamento (sia quelli prima irraggiati e poi infettati, sia quelli prima infettati e poi irraggiati).

A 21 dpi, cioè al termine della subcoltura, le piantine irraggiate mostrano una sensibilità ridotta a *Psa*, in particolare se l'irraggiamento precede l'inoculo batterico, con un MKI pari al 38% e 58% rispettivamente per la cv. Soreli e la cv. Hayward, contro il 96% e l'82% dei rispettivi controlli infettati. *A. arguta*, tollerante a *Psa*, mostra un danno contenuto (44%) e ridotto effetto dell'irraggiamento (42%).

Questi risultati hanno permesso di impostare l'esperimento successivo di irraggiamento e infezione su piante giovani in vaso, per le quali si hanno a disposizione disegni sperimentali con un numero di repliche inferiori rispetto all'allevamento *in vitro*. È stata selezionata la cv. Soreli, maggiormente sensibile a *Psa* e che *in vitro* ha mostrato la migliore risposta al patogeno indotta dall'effetto ormesi da irraggiamento UV-C.

I risultati ottenuti hanno confermato quanto osservato *in vitro*, cioè una protezione parziale dall'infezione, con un MKI (%) che passa dal 90% al 35,8%. Si osserva, inoltre, che le foglie adiacenti a quelle sottoposte ad irraggiamento non mostrano gli effetti benefici dell'UV-C. Allo stesso modo, il sistema antiossidativo cellulare non viene stimolato "a distanza".

Indagini preliminari sono state condotte sia *in vitro* che *in vivo* per valutare se e come il contenuto dei pigmenti fotoaccettori clorofille e carotenoidi risponda al trattamento UV-C e per interpretare quali siano i meccanismi attivati dall'irraggiamento che consentono alla pianta di ridurre la sensibilità a *Psa*. In particolare, abbiamo verificato se il sistema antiossidativo non enzimatico possa essere stimolato per effetto ormetico. Per quanto riguarda le piantine cresciute *in vitro*, la porzione sotto irraggiamento diretto alla dose di 2,2 kJ/m² ha mostrato in tutti e tre i genotipi un aumento della produzione di clorofille, carotenoidi,

polifenoli e dell'attività antiossidante quando confrontate con le piantine ai margini del cono di luce o poste in ombra. Coerentemente, sulle piante *in vivo*, il confronto tra foglie non irraggiate e foglie irraggiate della stessa pianta evidenzia un aumento della produzione di clorofille, carotenoidi, polifenoli e dell'attività antiossidante nelle foglie irraggiate alla dose di 1,3 kJ/m². Il confronto tra le foglie irraggiate dei tre gruppi mostra che i due irraggiamenti a dosi di 1,3 e 0,8 kJ/m² stimolano la produzione di polifenoli, l'attività antiossidante, clorofille e carotenoidi in misura maggiore dell'irraggiamento con dose a 0,3 kJ/m², i cui valori si avvicinano a quelli delle foglie non irraggiate. Tale stimolo sembra rimanere localizzato nelle foglie sotto irraggiamento diretto, anche se nelle prove condotte *in vitro*, questi valori nelle porzioni in ombra sono minori rispetto alle porzioni apicali dei germogli, ma superiori a quelli dei controlli nella cv. Soreli.

I risultati riportati in questo Rapporto nascono dalla sinergia di competenze diverse, maturate presso l'ENEA Centro di Frascati e Casaccia e presso la sede di Roma del Centro di Ricerca per l'Olivicoltura, la Frutticoltura e l'Agrumicoltura del CREA ed incoraggiano l'approfondimento di studi multidisciplinari mirati alla possibilità di attivare o potenziare il naturale sistema di difesa delle piante arboree tramite irraggiamenti di radiazione UV-C emessa da matrici di LED, sia preventivi che coadiuvanti il trattamento con i fitofarmaci, al fine di limitarne l'uso, con ovvi vantaggi per la salute di operatori e consumatori, oltre che per l'ambiente.

REFERENZE

- Bacchetta L., Bernabei G., Bollanti S., Di Lazzaro P., Lai A., Metelli G., Montecchi M., Murra D. (2021) Risposta ormetica in diverse specie vegetali di interesse agronomico, stimolata da radiazione ultravioletta. RT/2021/11/ENEA. <https://iris.enea.it/retrieve/handle/20.500.12079/59421/14621/RT-2021-11-ENEA.pdf>
- Di Cori P., Lucioli S., Frattarelli A., Nota P., Tel-Or E., Benyamini E., Gottlieb H., Caboni E., Forni C. (2013) Characterization of the response of *in vitro* cultured *Myrtus communis* L. plants to high concentrations of NaCl. *Plant Physiol Biochem* 73:420-426.
- Duarte-Sierra A., Nadeau F., Angers P., Michaud D., Arul J. (2019) UV-C hormesis in broccoli florets: Preservation, phyto-compounds and gene expression. *Postharvest Biology and Technology*, 157, 110965.
- Ferrante P. and Scortichini M. (2009) Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in Central Italy. *J. Phytopathol.* 157:768–770.
- Ferrante P. and Scortichini M. (2010) Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy." *Plant pathology* 59.5: 954-962.
- Ferrante P. and Scortichini M. (2014) Frost promotes the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae* in *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa* plants. *Plant Pathol.* 63:12–19.
- Fideghelli C. (2022) Panorama della actinidicoltura mondiale, situazione e prospettive. Resoconto del Convegno italo-francese. *Kiwinforma* n°10-12 e n°1-3, pagg.13-20.
- Gautheret R.J. (1959) *La culture des tissus végétaux: techniques et realizations.*
- Gentile A., Lucioli S., Frattarelli A., Urbinati G., Forni C., Caboni E. *In vitro* shoot multiplication of *Juglans* spp.: the effect of different iron chelates and cytokinins. *Acta Hort.* 1307(1307):291–298. (2021).
- Gentile A., Nota P., Urbinati G., Frattarelli A., Forni C. Caboni, E., Lucioli, S. (2023) Morpho-physiological effects of irrigation with saline water in ex vitro plants of *Juglans regia* ‘Sorrento’. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 157(5), 984-991.
- Godínez-Mendoza P.L., Rico-Chávez A.K., Ferrusquía-Jimenez N.I., Carbajal-Valenzuela I.A., Villagómez-Aranda A.L., Torres-Pacheco I., Guevara-González R.G. (2023) Plant hormesis: Revising of the concepts of biostimulation, elicitation and their application in a sustainable agricultural production. *Science of The Total Environment*, 164883.
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* 148:350-382.
- Loconsole, D., Santamaria, P. (2021) UV Lighting in Horticulture: A Sustainable Tool for Improving Production Quality and Food Safety. *Horticulturae* vol. 7, 9. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7010009>
- Manici L. M., Caboni E., Caputo F., Frattarelli A., Lucioli, S. (2021) Phytotoxins from *Dactylonectria torresensis* involved in replant disease of fruit trees. *Rhizosphere*, 17, 100300.

- Murashige T., & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murra D., Aquilini M., Bollanti S., Di Lazzaro P., Flora F., Gallerano G.P., Giovenale E., Mezi L. (2023) Progettazione, realizzazione e test sperimentali di un illuminatore a LED UV-C. RT/2023/3/ENEA <https://iris.enea.it/retrieve/8f28ea16-c8e3-461c-85f8-2b0c366b43ca/RT-2023-03-ENEA.pdf>
- Nitsch J.P., Nitsch C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163(3862), 85-87.
- Quoirin M. and Lepoivre P. H. (1977) Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Symposium on Tissue Culture for Horticultural Purposes 78.
- Scortichini M., Marcelletti S., Ferrante P., Petriccione M., Firrao G. (2012) *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 13:631–640.
- Scott G., Dickinson M., & Shama, G. (2021) Preharvest high-intensity, pulsed polychromatic light and low-intensity UV-C treatments control *Botrytis cinerea* on lettuce (*Lactuca sativa*). *European Journal of Plant Pathology*, 159, 449-454.
- Scott G., Almasrahi A., Malekpoor Mansoorkhani F., Rupar M., Dickinson M., & Shama, G. (2019) Hormetic UV-C seed treatments for the control of tomato diseases. *Plant Pathology*, 68(4), 700-707.
- Sidibé A., Charles M. T., Lucier J. F., Xu Y., & Beaulieu, C. (2019) Preharvest UV-C hormesis induces key genes associated with homeostasis, growth and defense in lettuce inoculated with *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 793989.
- Spigaglia P., Barbanti F., Marocchi F., Mastroleo M., Baretta M., Ferrante, P., Scortichini M. (2020) *Clostridium bifermentans* and *C. subterminale* are associated with kiwifruit vine decline, known as moria, in Italy. *Plant pathology*, 69(4), 765-774.
- Urbinati G., Nota P., Frattarelli A., Di Cori P., Lucioli S., Forni C., Caboni E. (2018) Morpho-physiological and antioxidant response to NaCl-induced stress in *in vitro* shoots of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Acta Physiol Plant* 40:151.
- Urbinati G., Nota P., Frattarelli A., Lucioli S., Forni C., Caboni E. (2020) Morpho-physiological responses of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) to NaCl stress. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 154:827-834.

ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
www.enea.it

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati
gennaio 2024