

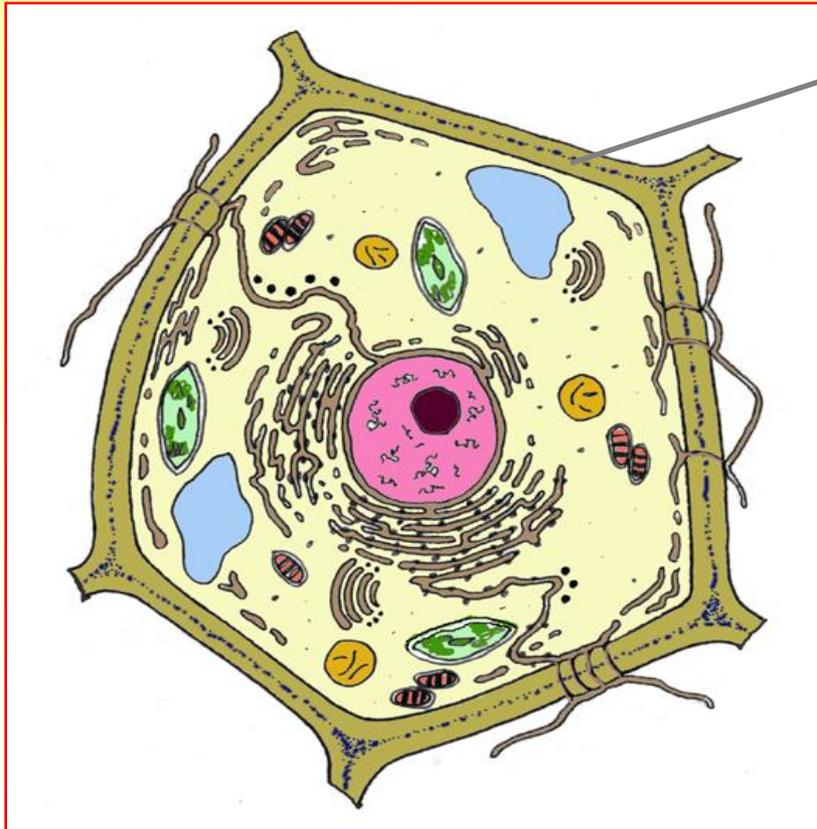
Carboidrati - Parete Cellulare - Softening

The conventional approach to elucidate fruit softening has typically been based on two strategies:

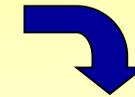
- (1) the identification of **wall components** whose solubility increases and/or polymer size decreases in parallel with decreasing fruit firmness (Brummel and Harpster, 2001)
- (2) the **characterisation of proteins** that are expressed during ripening and whose biochemical activities can be mechanistically related to the observed wall changes (Brummel, 2006).

Data developed from these studies have guided the selection of genes whose expression has been enhanced or suppressed in transgenic fruits, in order to test whether they have direct roles in controlling softening, primarily using **tomato** as a model system.

CELL WALL MODELS: CAN THEY HELP US BETTER UNDERSTAND FRUIT SOFTENING?

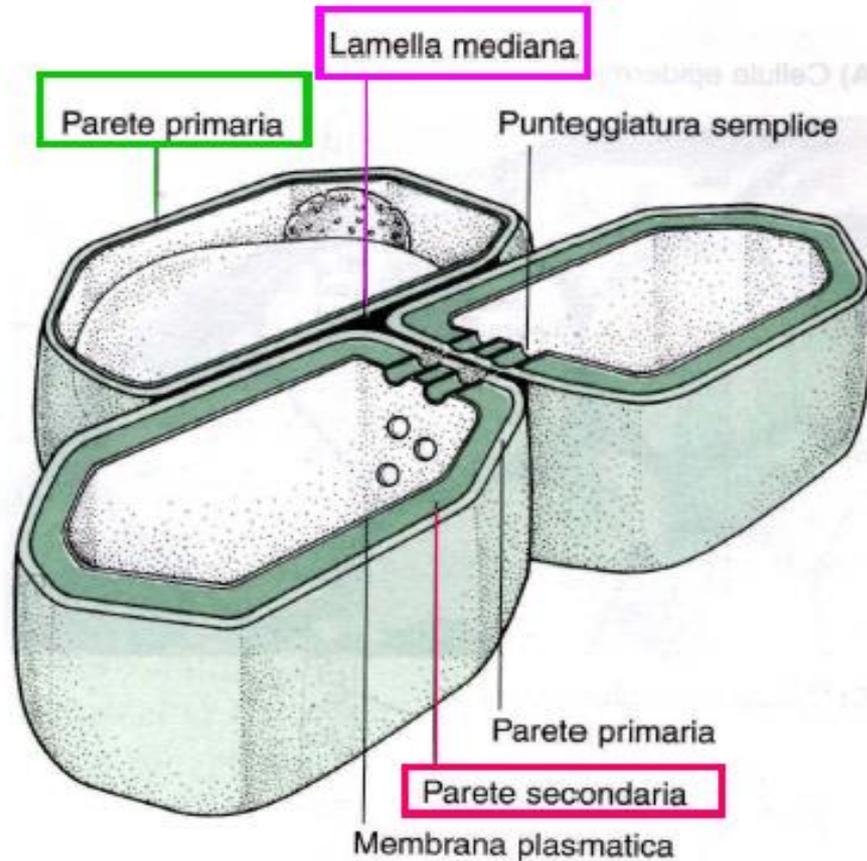


*parete
cellulare*



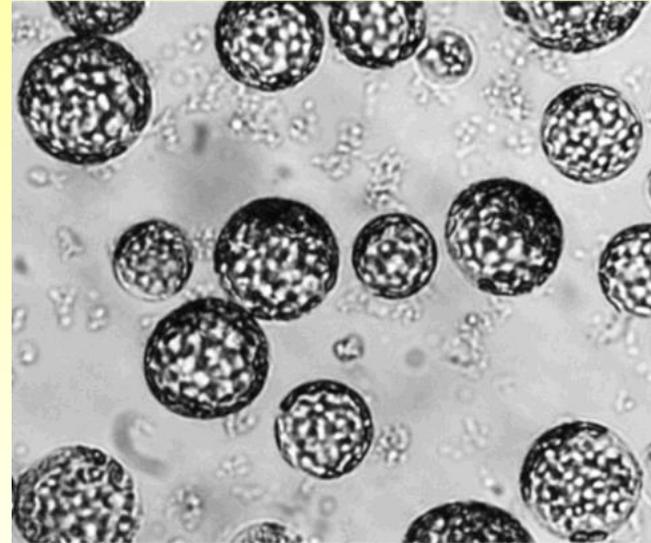
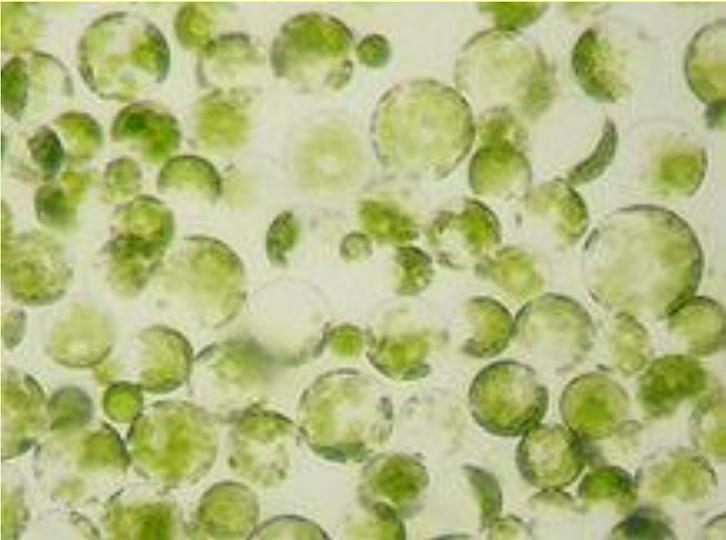
E' una struttura dinamica, che varia la composizione e le proprietà fisico-chimiche continuamente in risposta al suo sviluppo ed all'ambiente

LA PIANTA: UNA PANORAMICA SULLA STRUTTURA 11



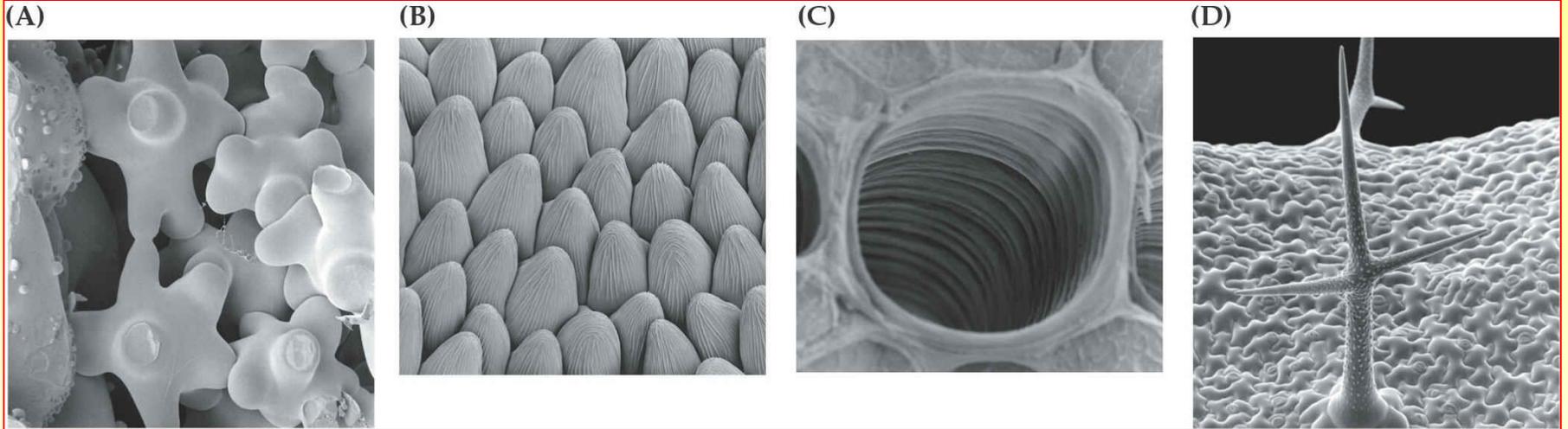
La parete ha il ruolo di controllare la velocità e la direzione dell'accrescimento cellulare, influenzando notevolmente lo sviluppo e la morfologia delle piante

Dopo digestione della parete cellulare
PROTOPLASTI

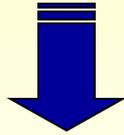


PROTOPLASTI di *Petunia Hybrida*

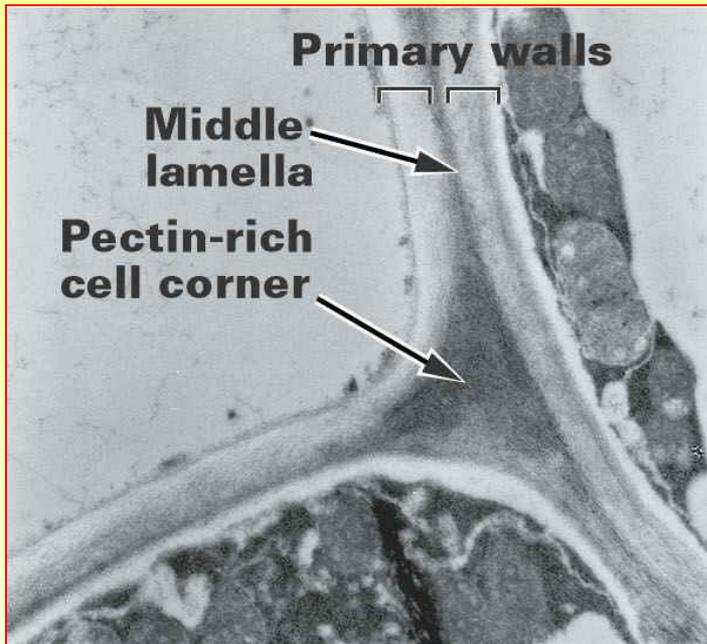
Struttura ..anche specializzata



Foglia di
Zinnia:
minimo
contatto e
max
scambio
gassoso



La forma specializzata delle cellule
epidermiche delle papille di un petalo di
bocca di leone necessarie a riflettere la
luce per arricchire i colori ed attirare
l'attenzione degli impollinatori



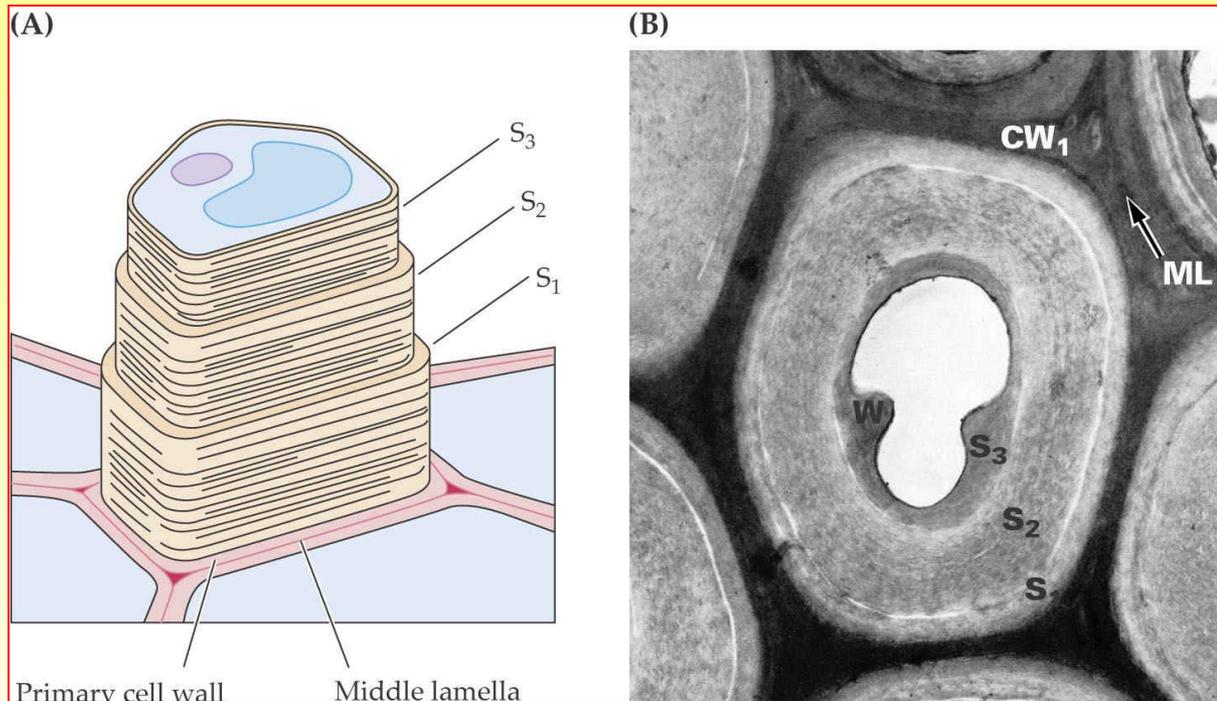
La composizione e gli arrangiamenti dei polimeri della parete cambiano in funzione della specie, del tipo di cellula e della regione della parete considerata

Non solo funzione strutturale

- Influenza processi di sviluppo
- Marca la posizione all'interno della pianta
 - Determina la comunicazione cellula-cellula e parete-nucleo
- Ha un ruolo di difesa
 - Ha un ruolo nel riconoscimento dei batteri azoto-fissatori



Parete Cellulare Primaria - Caratteristiche



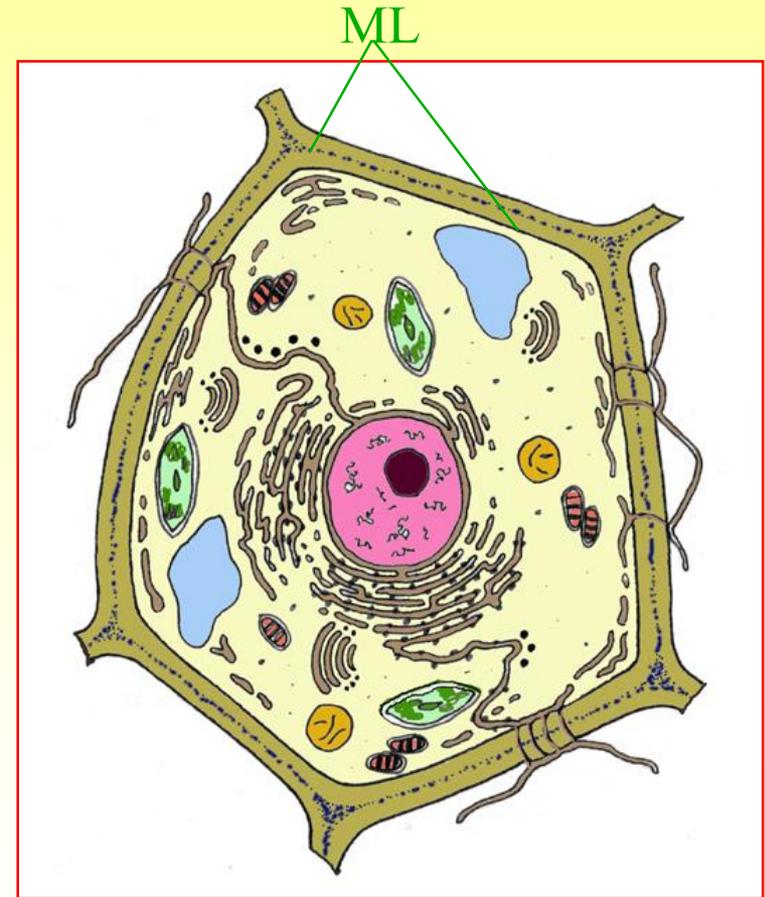
Funzioni

- supporto
- protezione
- enzimatica

- primo strato depositato in ogni cellula in accrescimento
- unico strato nelle giovani cellule in crescita, in alcune cellule di riserva,
- molto sottile ($0.1 < 1$ micron)
- circonda il protoplasma
- porosa all'acqua e ai minerali

Lamella mediana

- **Strato più esterno: forma**
 - Forma l'interfaccia tra le pareti primarie di cellule confinanti
- **Funzione**
 - Regola l'adesione tra le cellule
 - gel cementante
- **Spessore: 30 nm (anche meno)**
- **Composizione**
 - pectati di Ca^{2+} e Mg^{2+}
 - formano gel: **presenti nei frutti immaturi; vengono degradati durante il 'ripening'**



Parete secondaria

- si forma solo dopo che la formazione della primaria è completata
- caratteristica di cellule mature, non in crescita, elementi dello xilema
- localizzata tra PM e parete primaria
- più spessa della parete primaria
 - diversi micron
- conferisce rigidità, supporto e resistenza alla cellula
- Non è presente, se non con qualche eccezione, nella parete primaria
- Alcune pareti secondarie funzionano come materiale di deposito (riserve di carboidrati) come nei cotiledoni e nell'endosperma di semi in via di sviluppo da utilizzare successivamente durante la germinazione. Oltre a conferire robustezza per proteggere l'embrione e imporre meccanicamente la dormienza

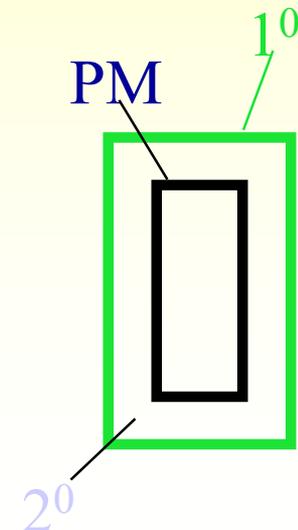
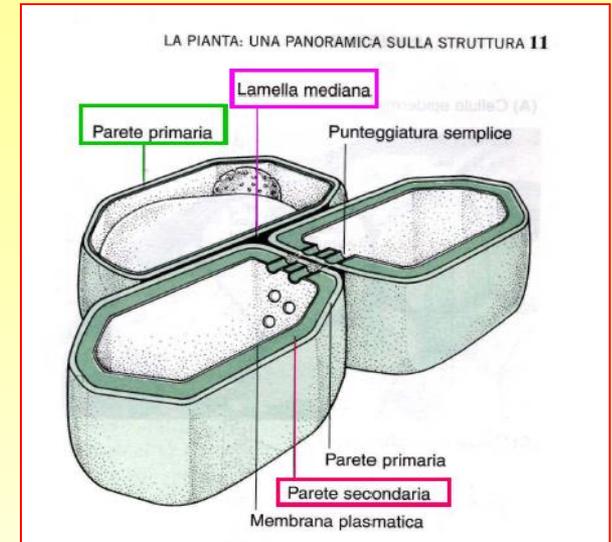


Table 4-2. Gross Composition of the Cell Wall for Apple and Strawberry: Monomers Yielded Upon Hydrolysis of Wall Polymers

<i>Component Monomers</i>	<i>% Total Accounted for</i>	
	<i>Apple</i>	<i>Strawberry</i>
Rhamnose	0.4	1.1
Fucose	0.7	ND
Arabinose	19.5	6.5
Xylose	5.9	1.9
Mannose	1.9	0.7
Galactose	5.8	7.6
Glucose	47.5	31.1
Galacturonic acid	16.6	40.3
α -Amino acid	1.7	10.7
Hydroxyproline	0.04	0.1

.....un po' di nomenclatura!!!!

Queste unità semplici di zucchero si combinano per dare i polisaccaridi che sono denominati in **funzione dello zucchero principale che essi contengono:**

- 1) si parla di **glucano** come **polimero del glucosio**, 2) si parla di **xilano** per il **polimero dello xilosio**, 3) si parla di **galattano** per il **polimero del galattosio**.

2)

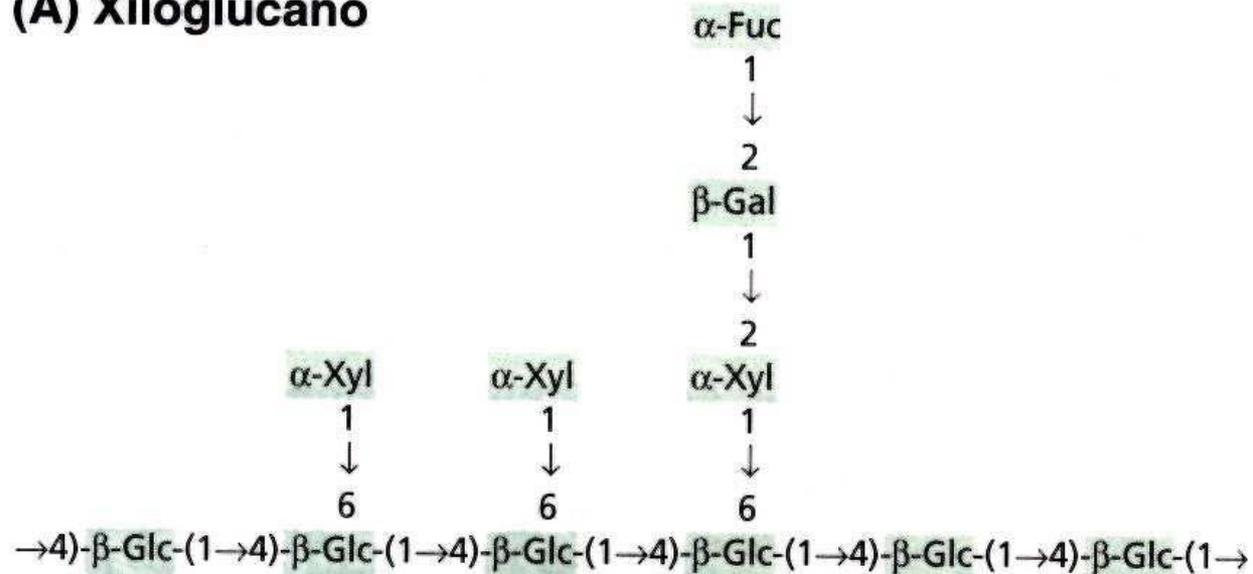
Per i polisaccaridi ramificati: **la catena lineare del polisaccaride dà l'ultima parte del nome.**

Xiloglucani vuol dire che hanno una **catena lineare di glucano (residui di glucosio) con xiloso attaccato nella catena laterale.**

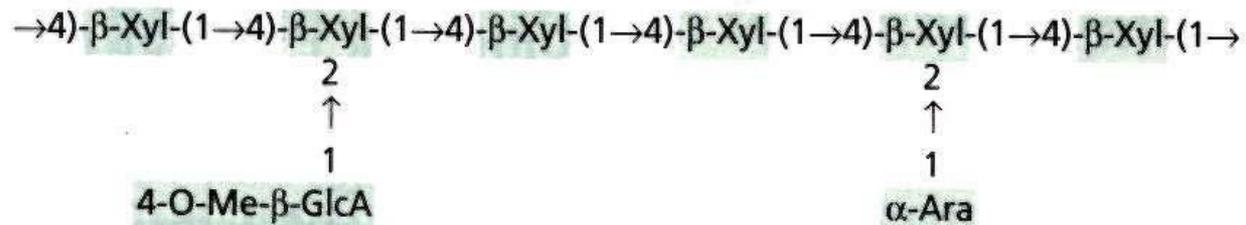
Arabinoxilani vuol dire che hanno **xilano nella catena lineare e arabinosio nella laterale.** E' chiaro che c'è qualche eccezione.

Infatti i **glucomannani** sono polimeri contenenti **glucosio e mannosio nella catena laterale.**

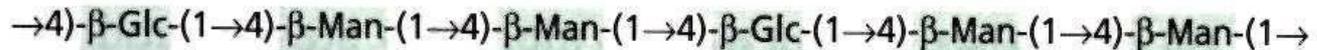
(A) Xiloglucano



(B) Xilani



(C) Glucomannani



1) Quali sono i polisaccaridi più importanti della parete; 2) come sono organizzati nelle diverse strutture (primaria, mediana, secondaria) ? 3) Quali altre componenti strutturali sono presenti ?

5 polisaccaridi
inequivocabilmente
individuati:

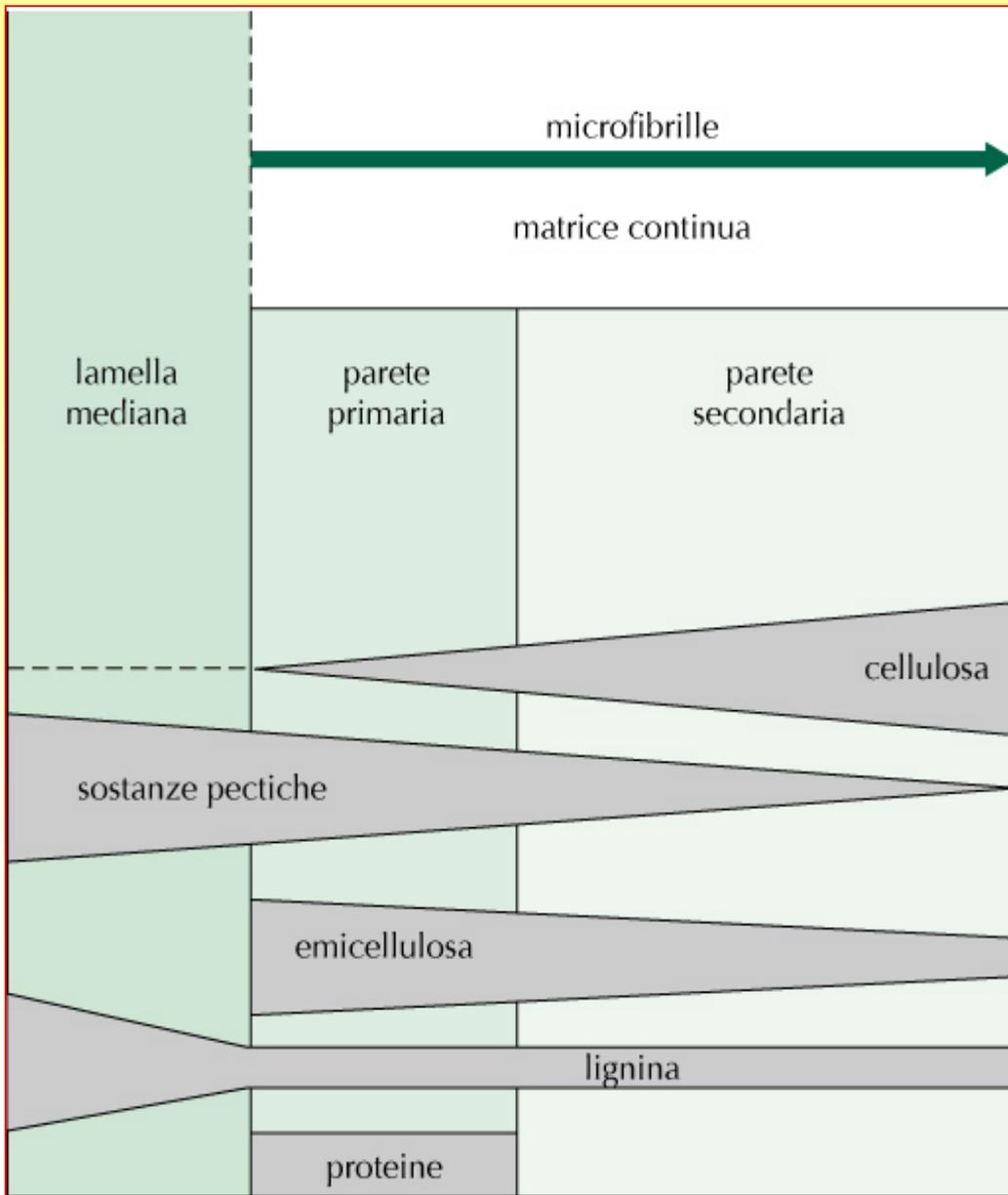
- Cellulosa
- Glucuronoarabinosilani
- Xiloglucani
- Ramnagalatturani
- Galattoglucomannani

Glicani concatenati o
cross-linking o emicellulose

Pectine

Proteine come le
Estensine

Sostanze aromatiche quali
Acidi idrossicinnamici



Componenti della parete cellulare

Fase fibrillare
Cellulosa

Fase di matrice (amorfa)

Emicellulosa
Pectina
Proteine
Fenoli
Lignina

lessuto

Estrazione con soluzioni calde di ossalato d'ammonio o EDTA

Porzione insolubile

Porzione solubile

Estrazione con KOH 2N

Precipitazione con ETOH

insolubile

solubile

solubile

insolubile

Cellulosa

emicellulose

SCARTO

Pectine

Neutralizzazione con acido acetico

insolubile

solubile

Emicellulosa A

Precipitazione con ETOH

insolubile

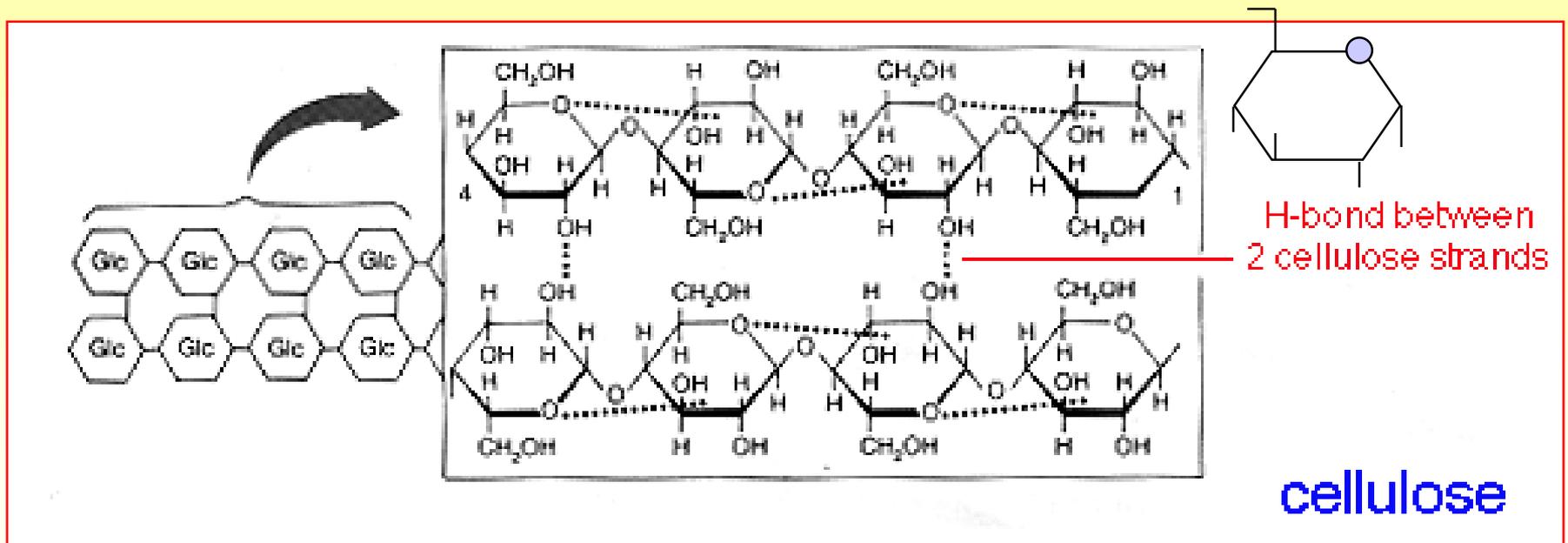
solubile

Emicellulosa B

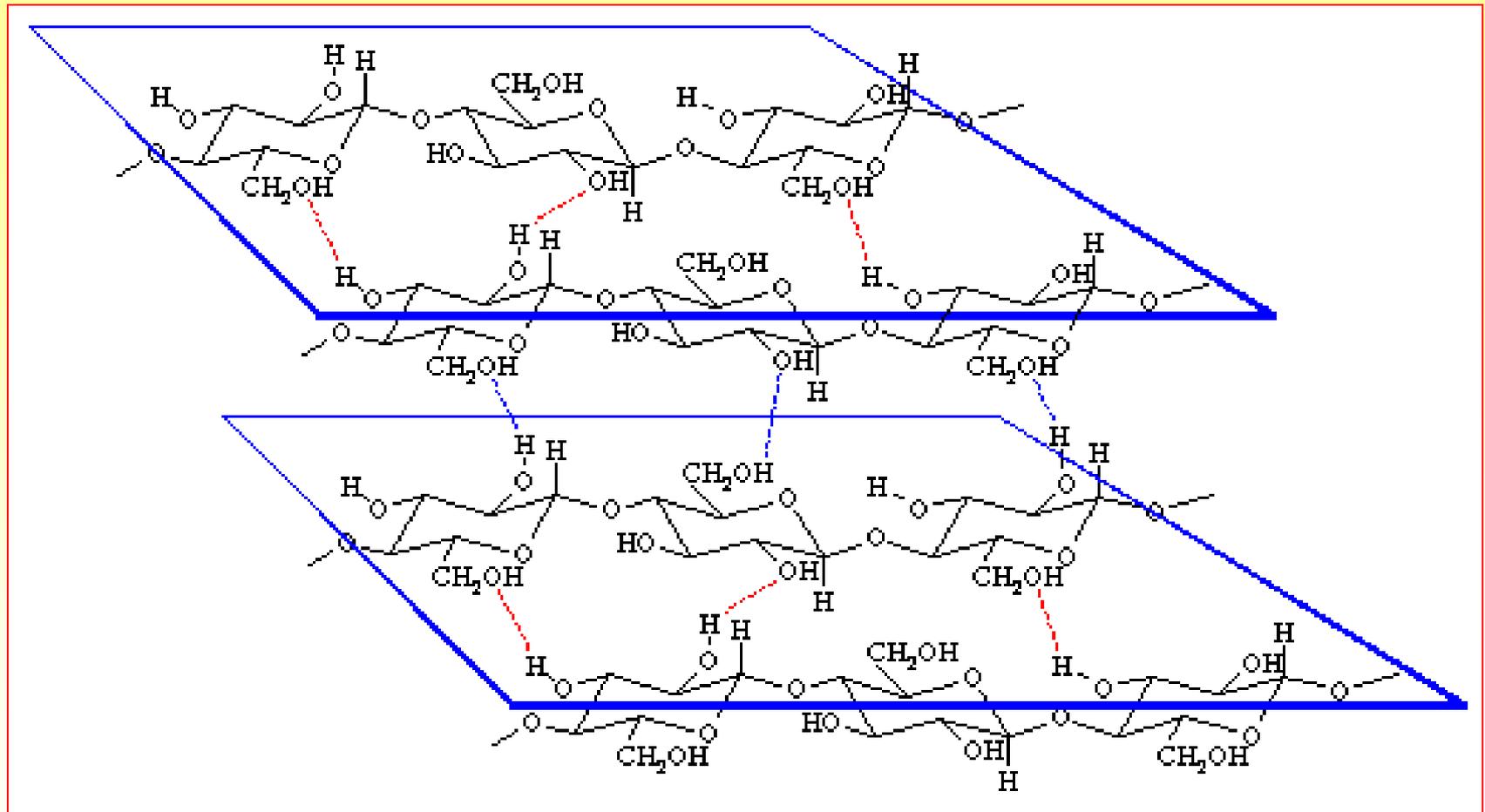
**Altri frammenti
polisaccaridici**

Cellulosa

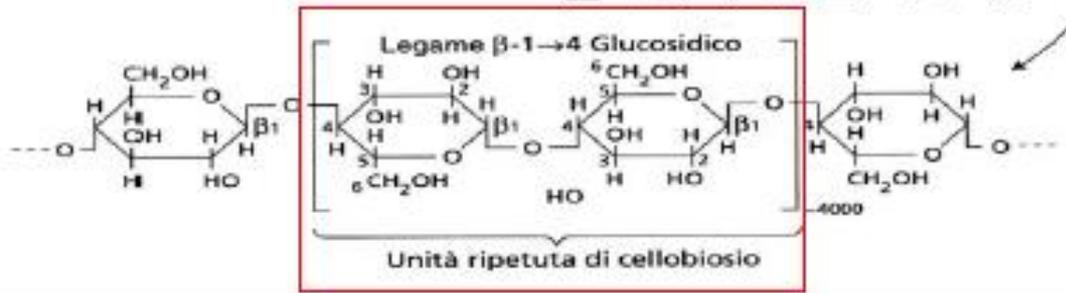
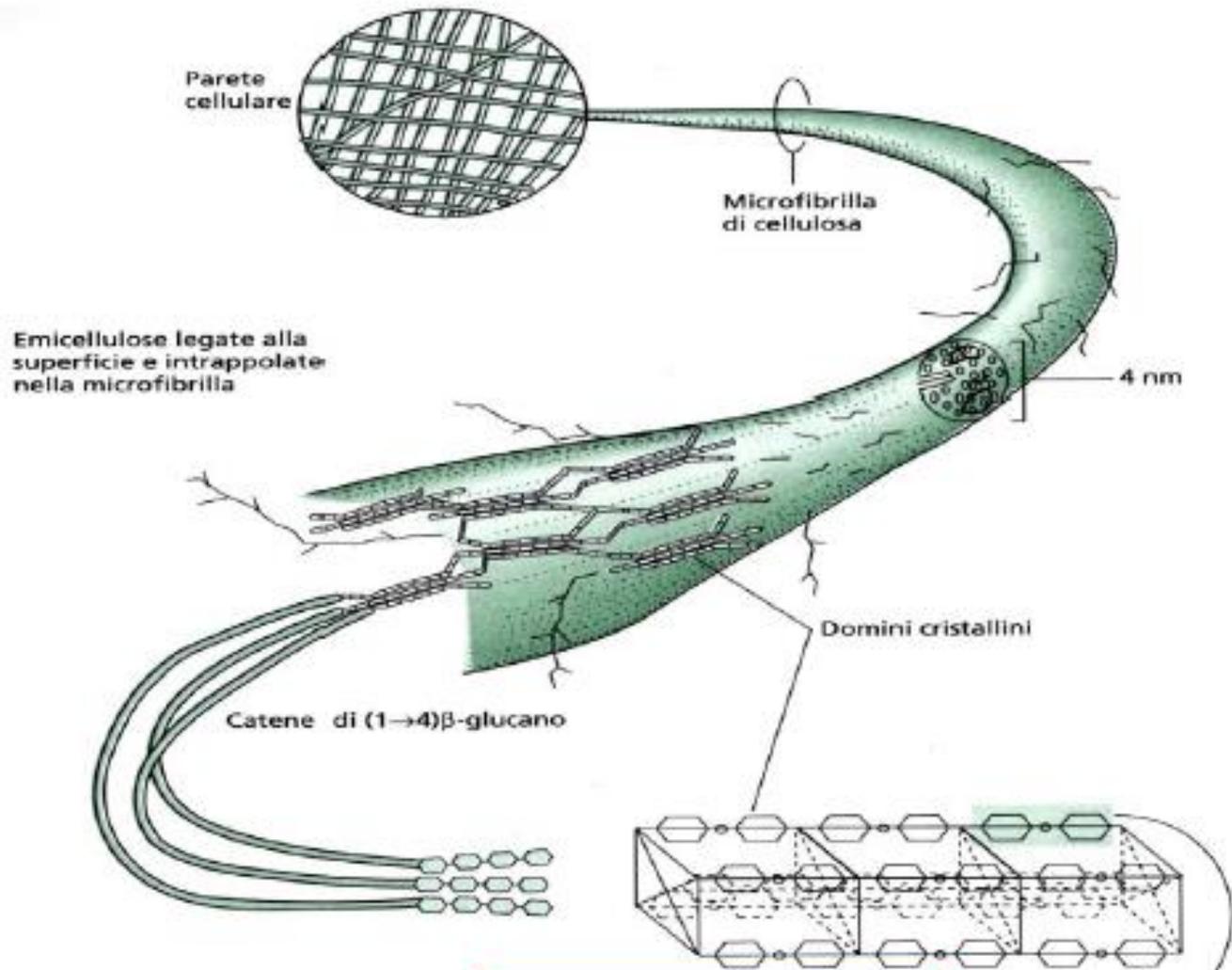
- catena lineare di monomeri di glucosio con legami β 1-4.
Principale componente strutturale di tutte le pareti cellulari è circa il 15-30 % peso secco



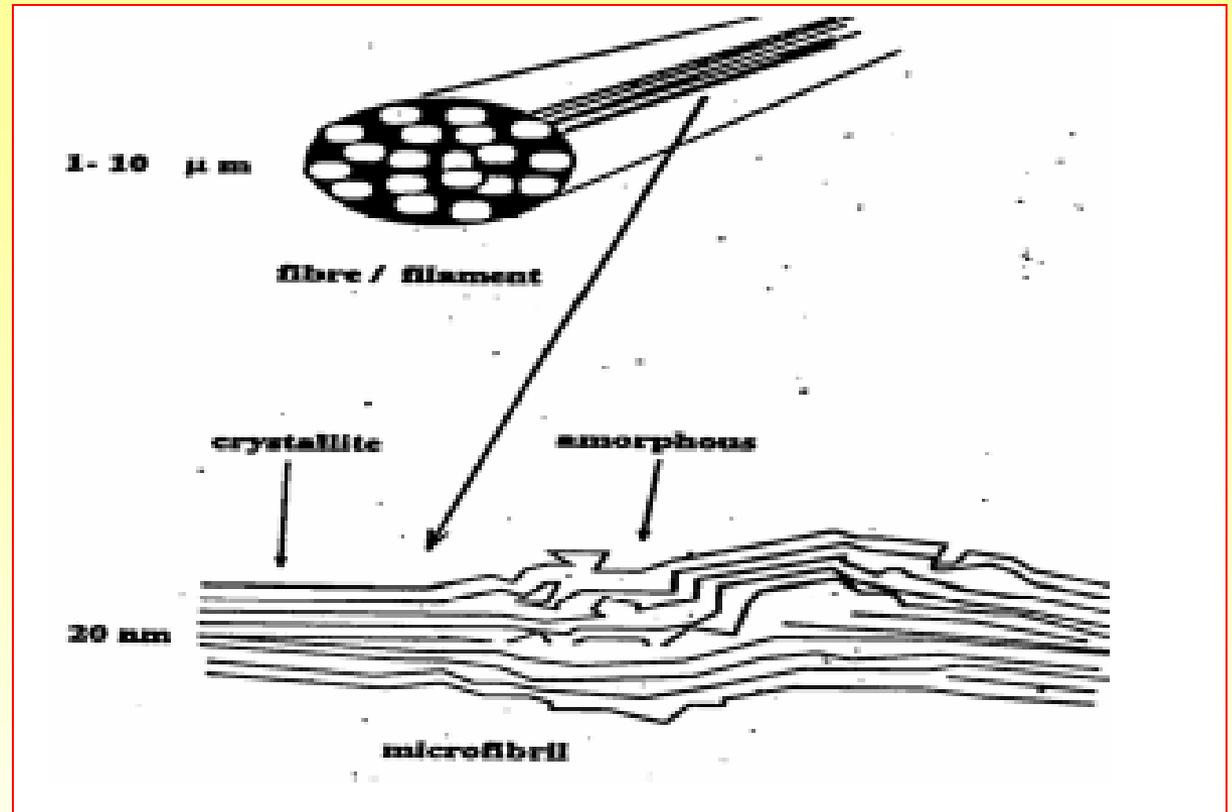
- Forza tensile come l'acciaio (fino a 5000 bar)
 - Forze coesive (forze di van der Waals)
 - Unità ripetuta è il cellobiosio



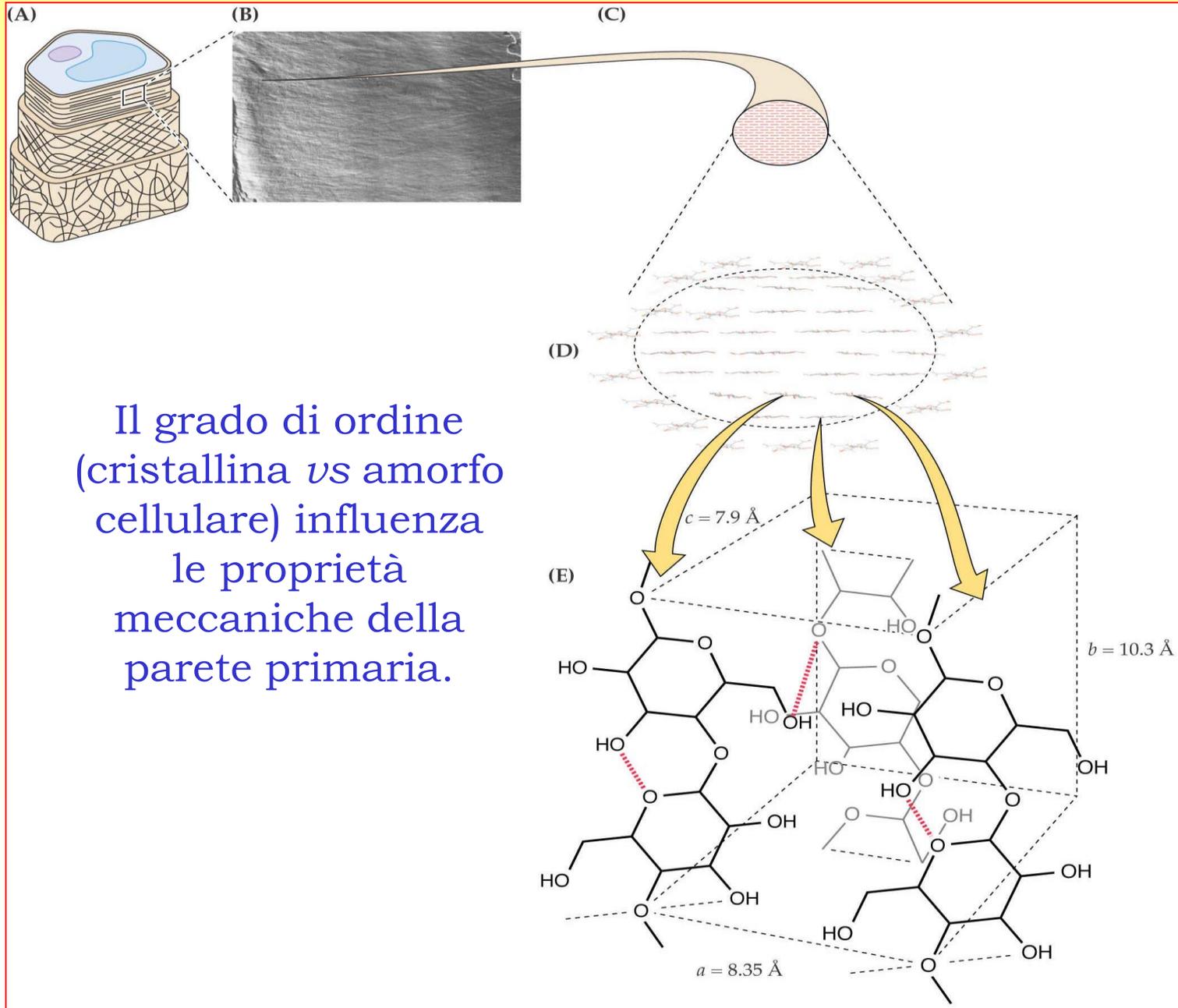
Numerosi legami H tra 20-40 catene diverse e all'interno di ciascuna catena formano una microfibrilla



Polisaccaridi
non cellulosici
molto meno
abbondanti che
saldano le
microfibrille di
alcune pareti
primarie



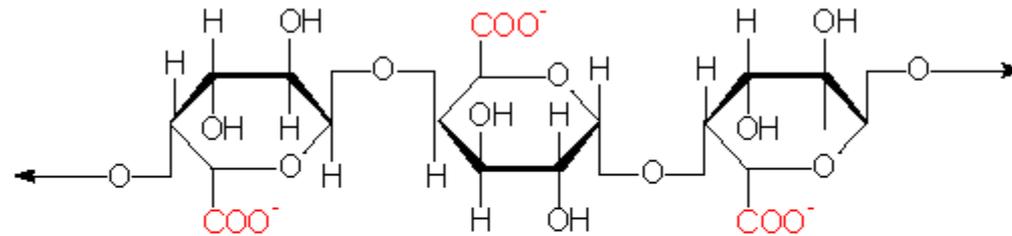
Le regioni amorse (emicellulose,
pectine, proteine, fenoli, lignina)
sono più sensibili all'azione di
cellulasi



Il grado di ordine
(cristallina *vs* amorfo
cellulare) influenza
le proprietà
meccaniche della
parete primaria.

Pectine

una miscela eterogenea di polisaccaridi ramificati molto idratati e ricchi di acido galatturonico

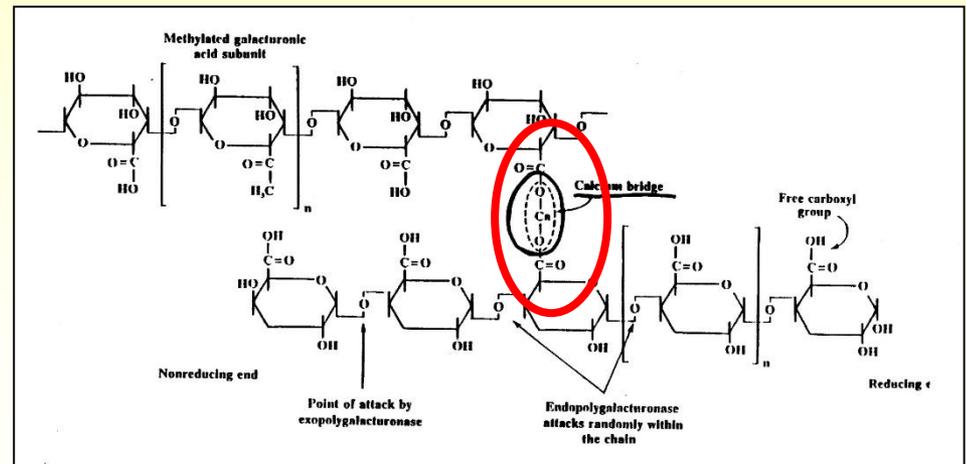
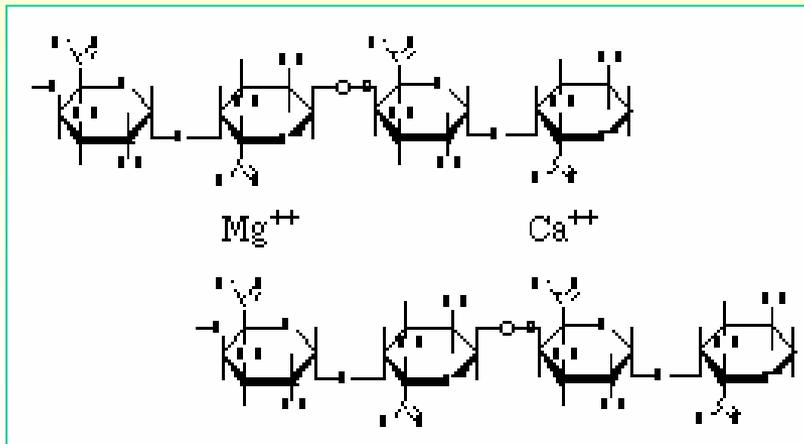
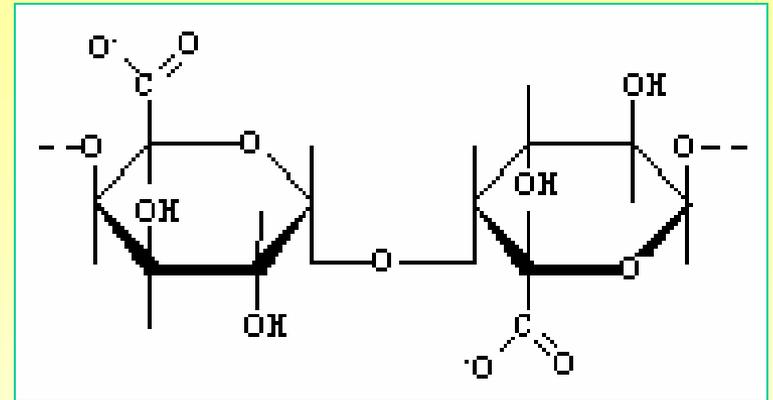
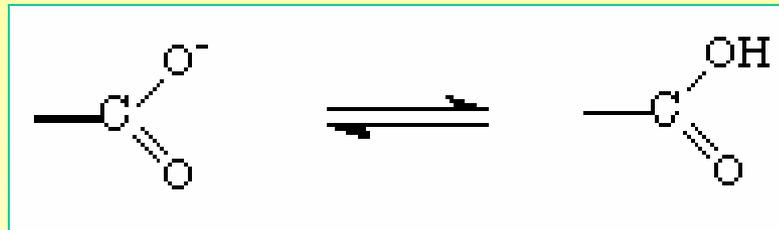


pectic acid (α -1,4-galacturonic acid)

Funzioni delle pectine

- Conferiscono porosità alla parete
- Forniscono superfici cariche che modulano il pH ed il bilancio ionico
- Agiscono come collanti ma anche come molecole di riconoscimento

Le pectine formano un gel



Le catene di omogalatturani presentano una forma elicoidale.

Ioni bivalenti come il calcio possono formare legami fra catene adiacenti in modo tale da formare un gel.

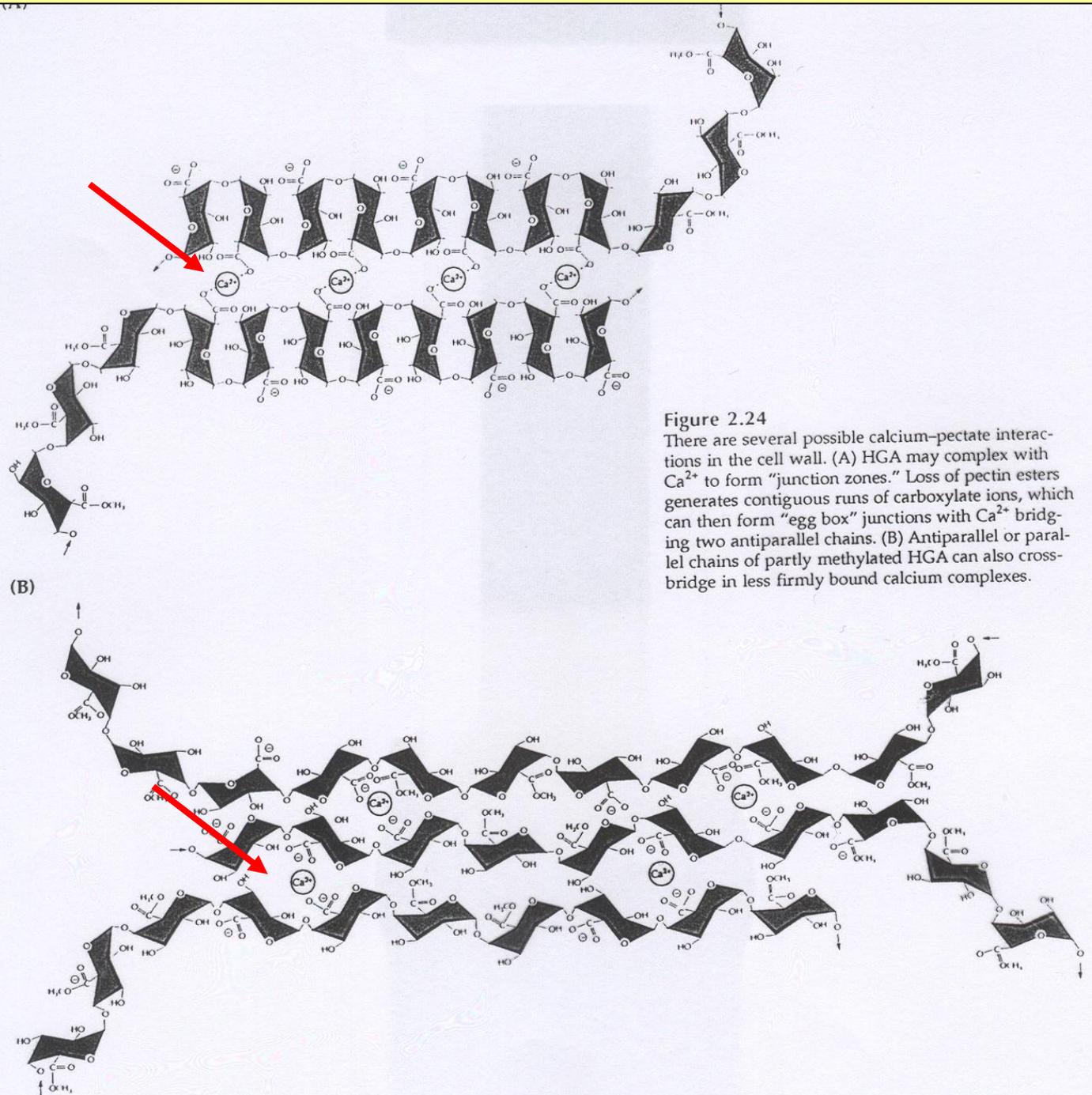


Figure 2.24
There are several possible calcium-pectate interactions in the cell wall. (A) HGA may complex with Ca²⁺ to form "junction zones." Loss of pectin esters generates contiguous runs of carboxylate ions, which can then form "egg box" junctions with Ca²⁺ bridging two antiparallel chains. (B) Antiparallel or parallel chains of partly methylated HGA can also cross-bridge in less firmly bound calcium complexes.

Omogalatturonani

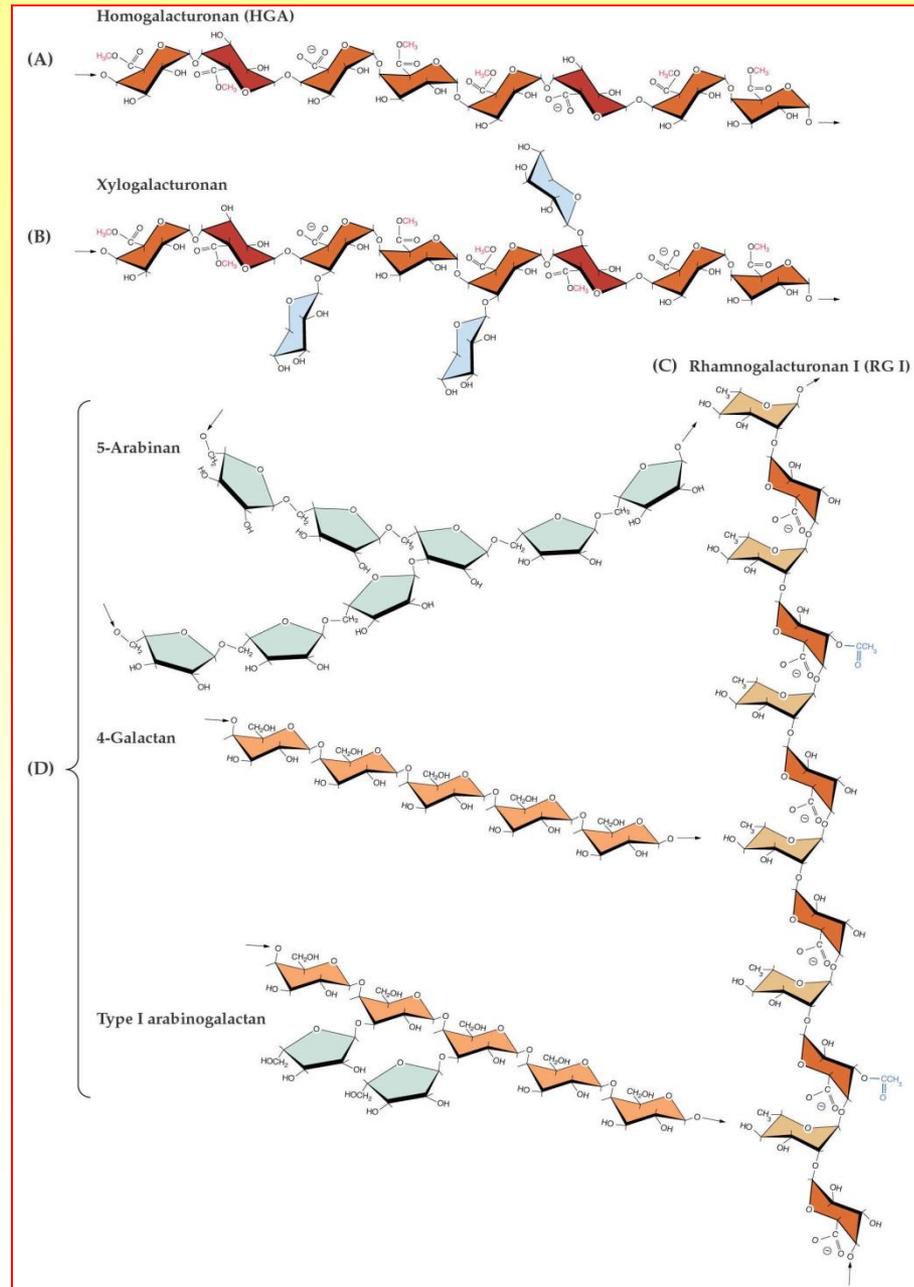
HGA

Omopolimeri di
galattosio

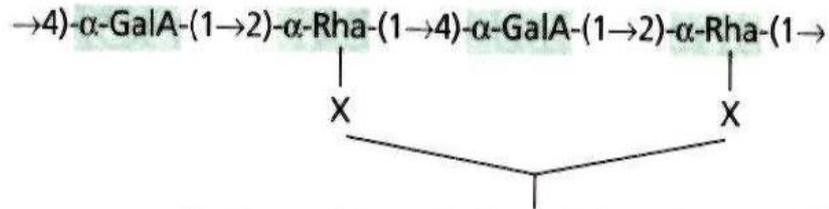
Ramnogalatturani

RG I

Eteropolimero di unità
disaccaridi di ramnosio
e galattosio

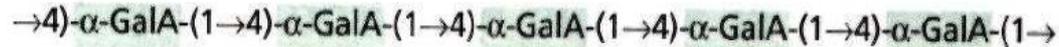


(A) Ramnagalatturonano I (RG I)

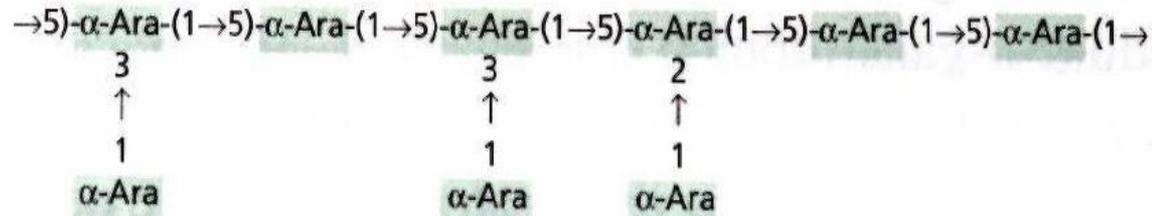


Catene laterali di arabinani e galattani

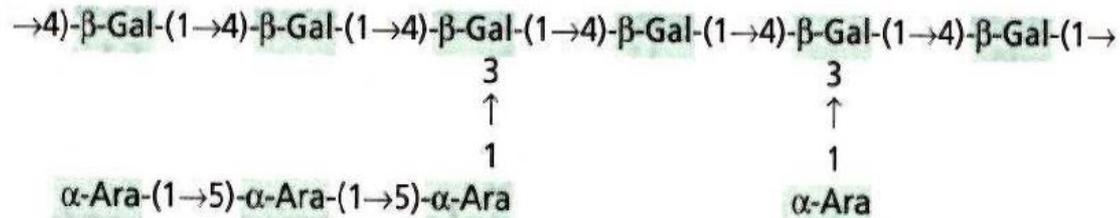
(B) Omogalatturonano (Acido poligalatturonico)



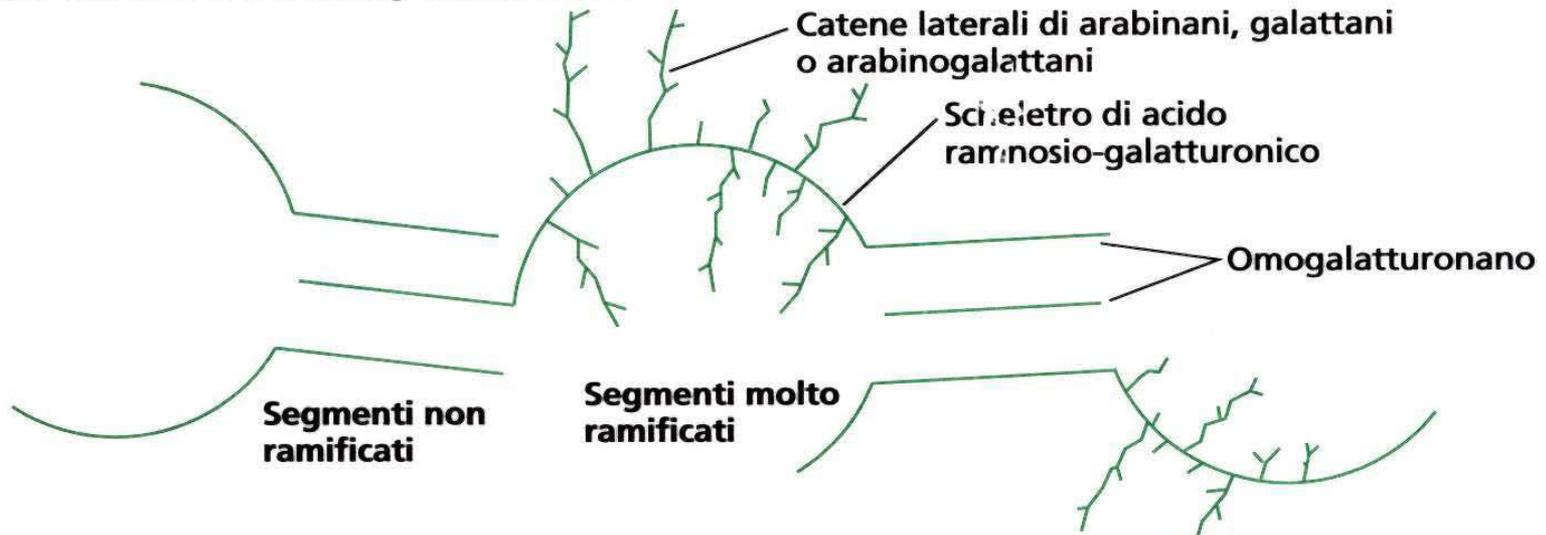
(C) Arabinani



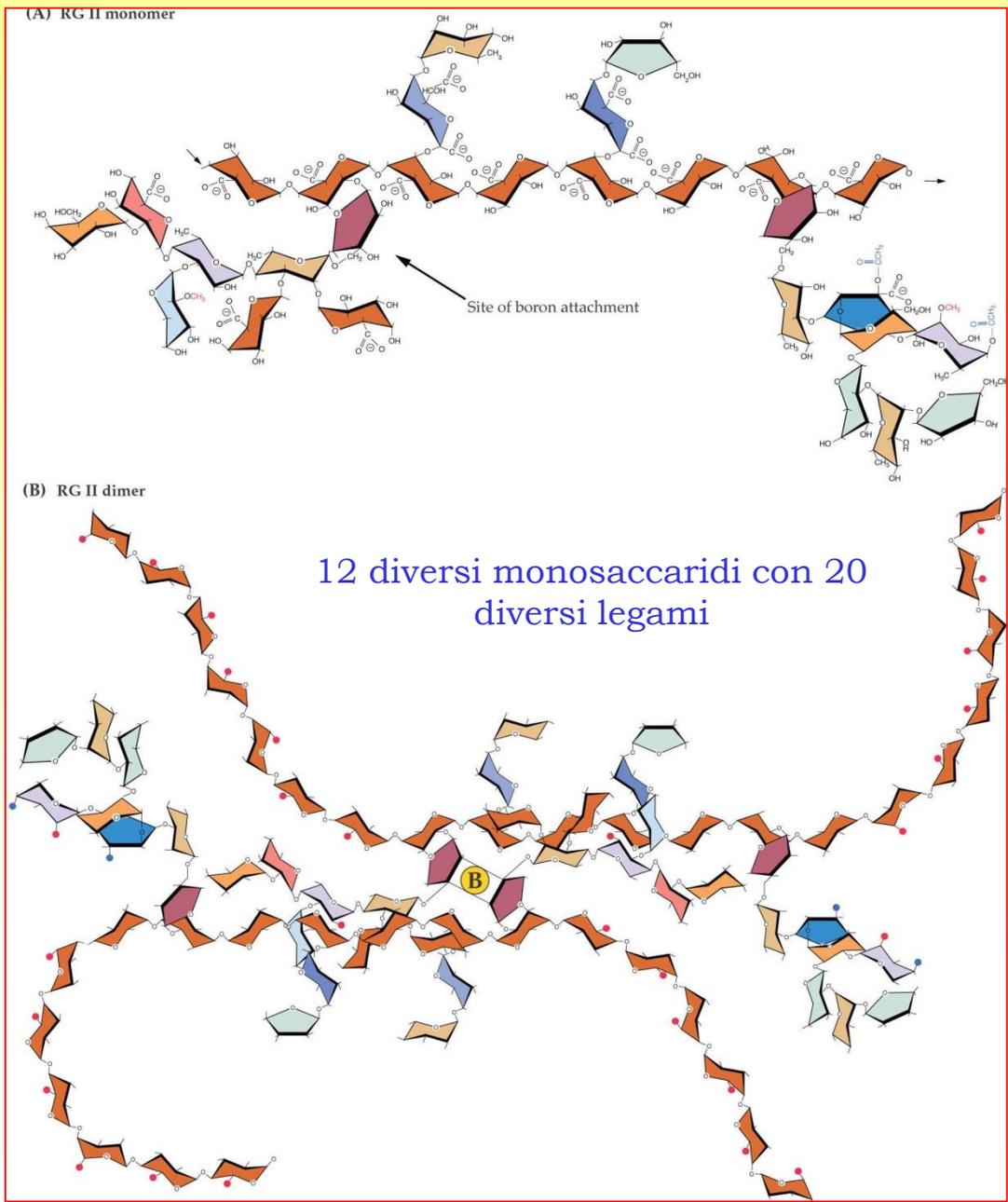
(D) Arabinogalattano I



(A) Struttura del Ramnoglacturonano I



RGI simile ad un bastoncino di ripetizione dell'unità disaccaridica. Isolata dalla parete per digestione enzimatica con poligalatturonasi (PGAasi)



Due tipi di
OMOGALATTURANI:

Xilogalatturano

Ramnogalatturano II

RG II

Struttura
altamente
conservata,
importante
funzione, ma
di scarsa
abbondanza



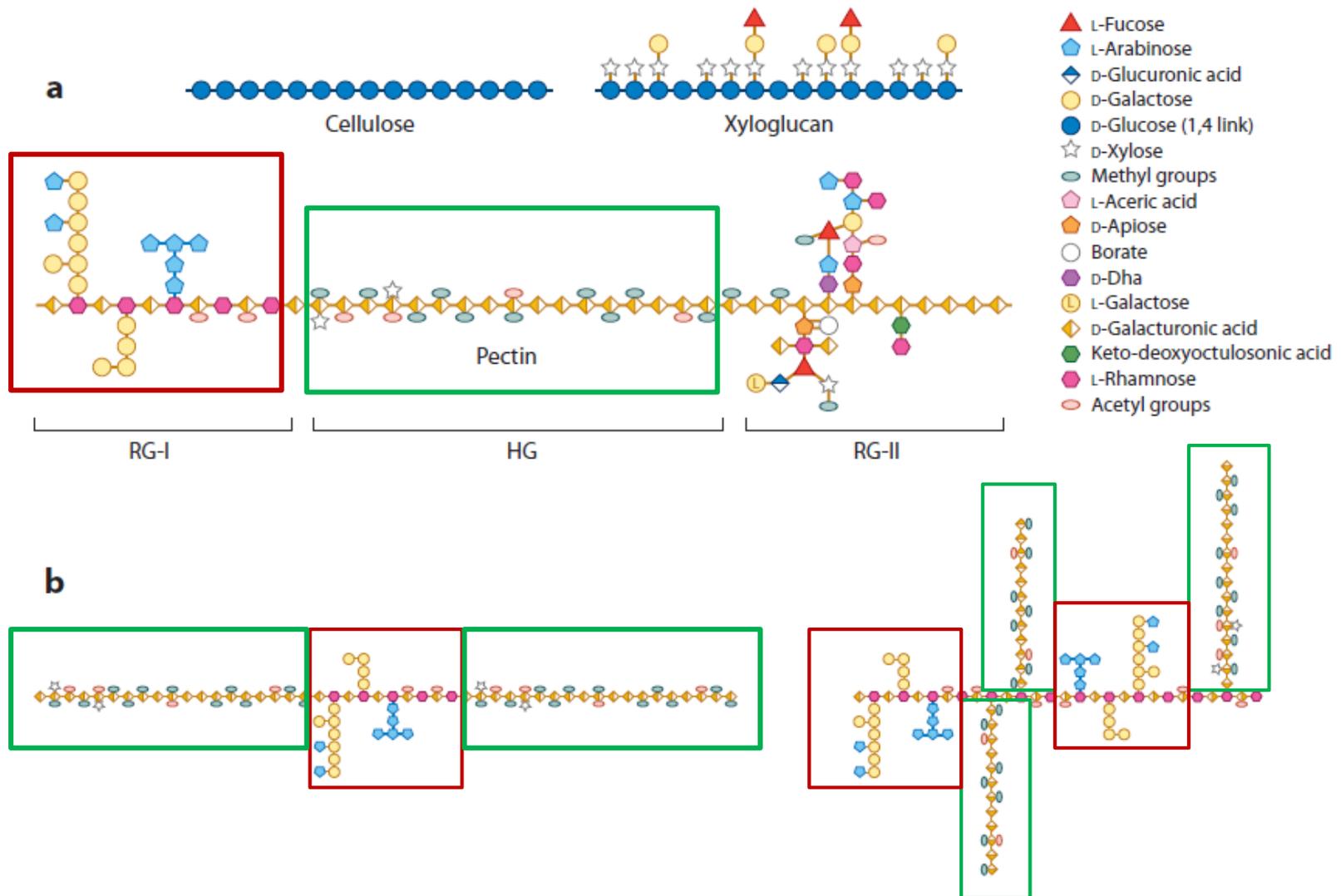
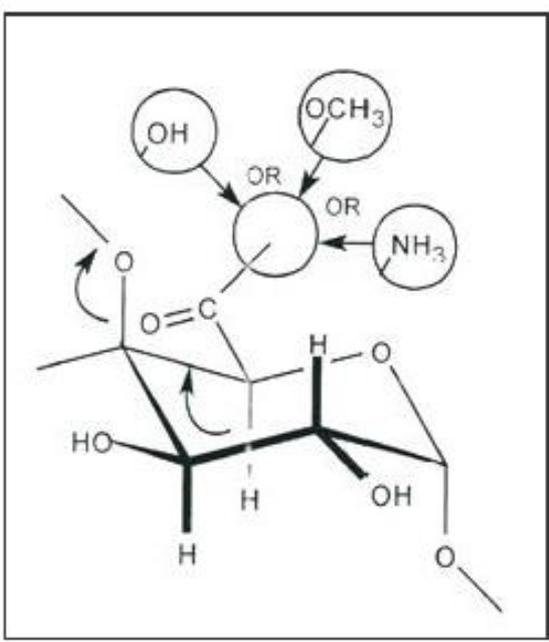


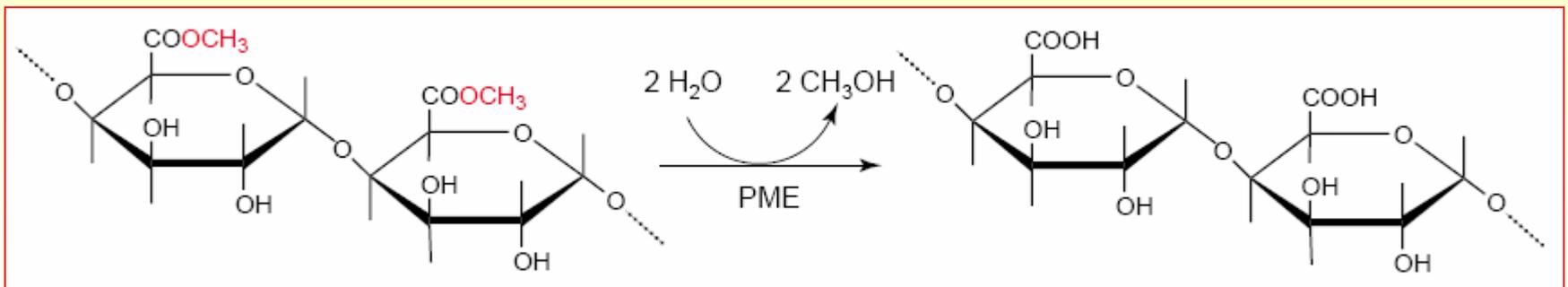
Figure 1

Structure of some cell wall components. (a) Schematic representation of cellulose, xyloglucan, and the pectic rhamnogalacturonan I (RG-I), homogalacturonan (HG), and RG-II. Adapted from Reference 22 with permission. (b) Alternative models for pectin domain organization. A linear, contiguous arrangement of HG interspersed with RG-I is shown on the left, whereas on the right, HG is drawn as side chains linked to Rha residues of the RG-I scaffold. A combination of both models may also be possible. Adapted from Reference 152 with permission.

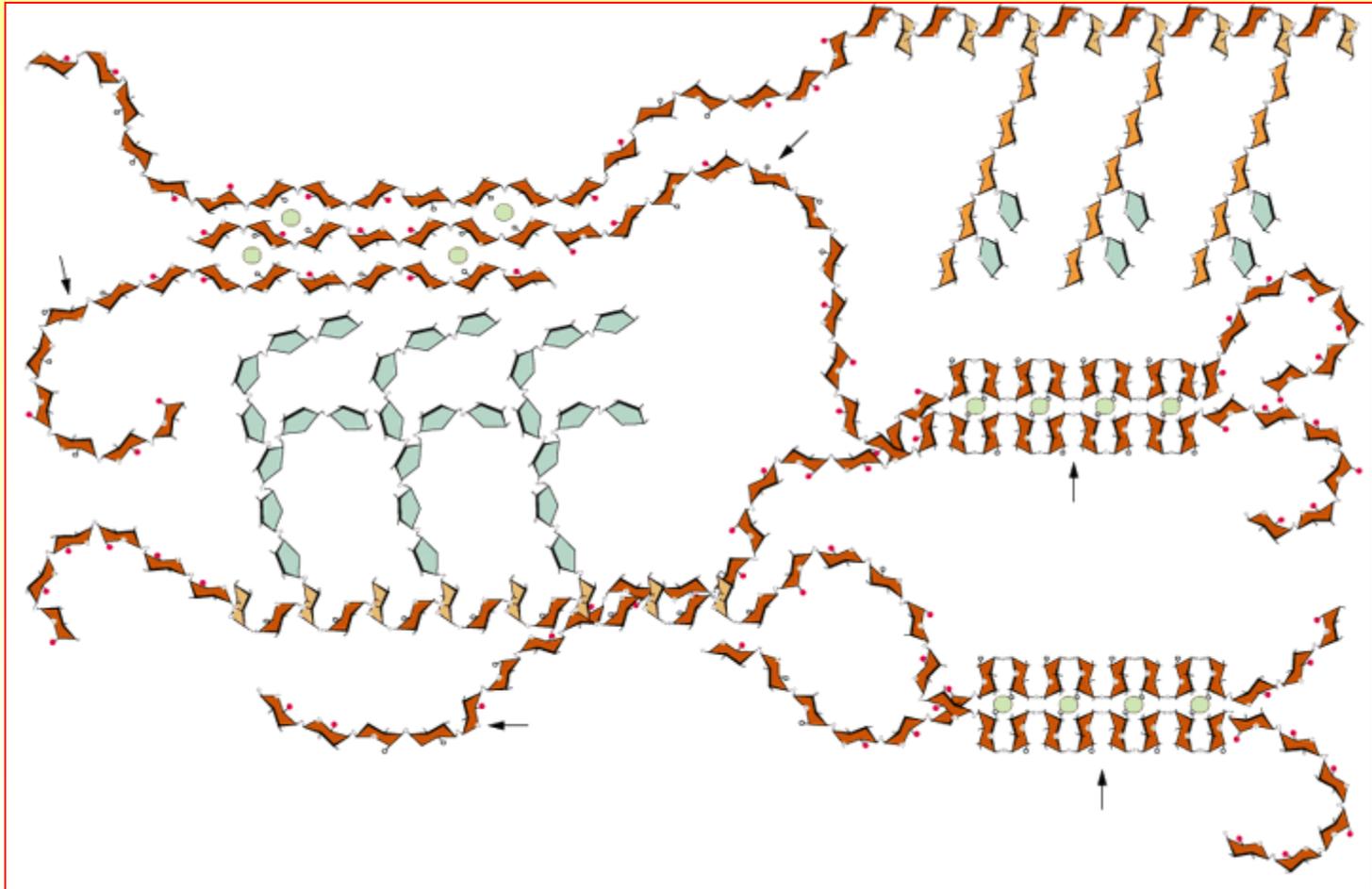


L'acido galatturonico può presentare sulla funzione carbossilica un gruppo alcool o un metile.

Il gruppo ammidico è presente solo nelle pectine utilizzate a scopi alimentari.

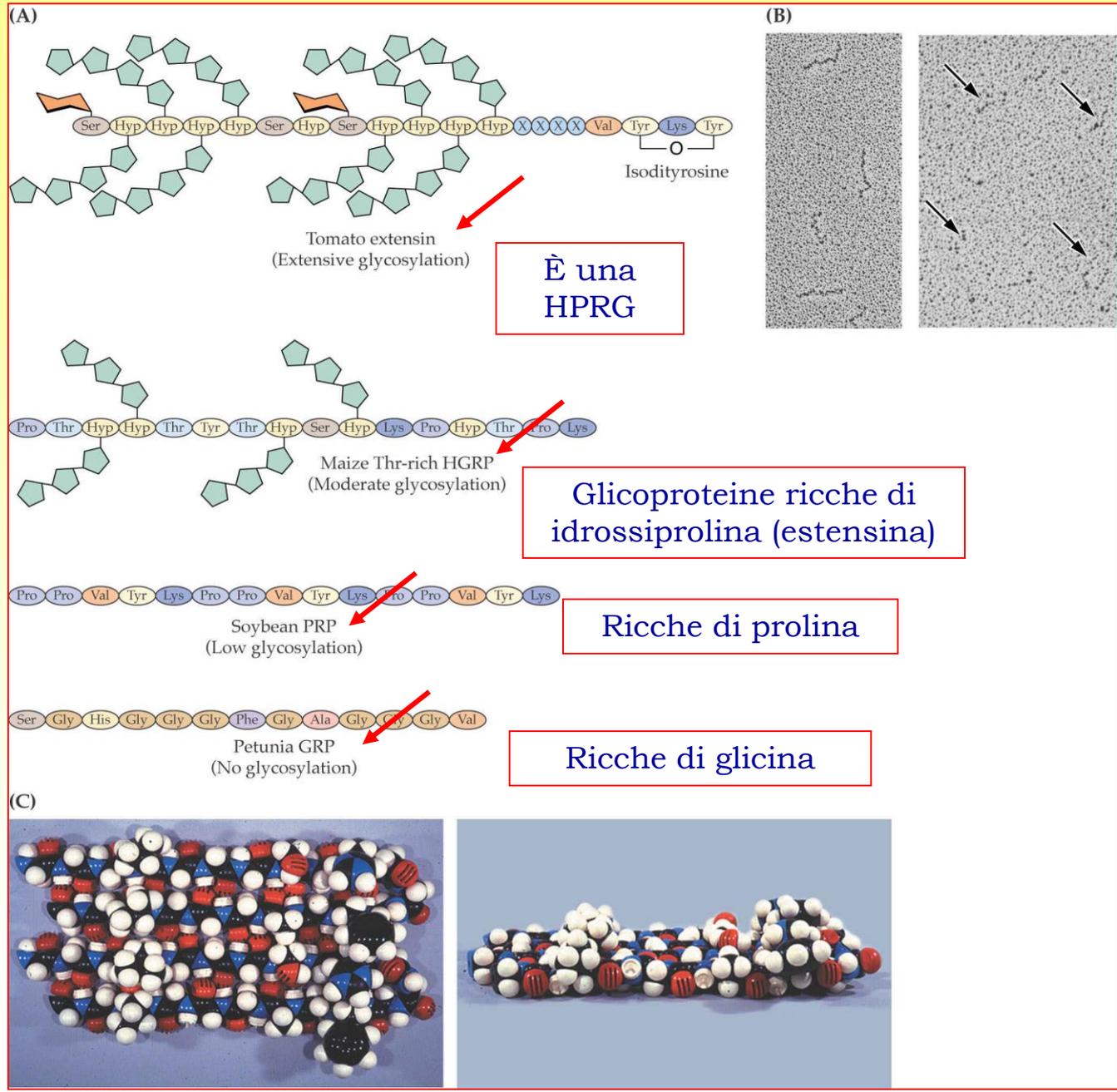


Possono essere demetilate con l'enzima PectinMetilEtilesterasi (PME)



La pectina determina la porosità della parete e quindi la texture dei prodotti

P
R
O
T
E
I
N
E



È una HPRG

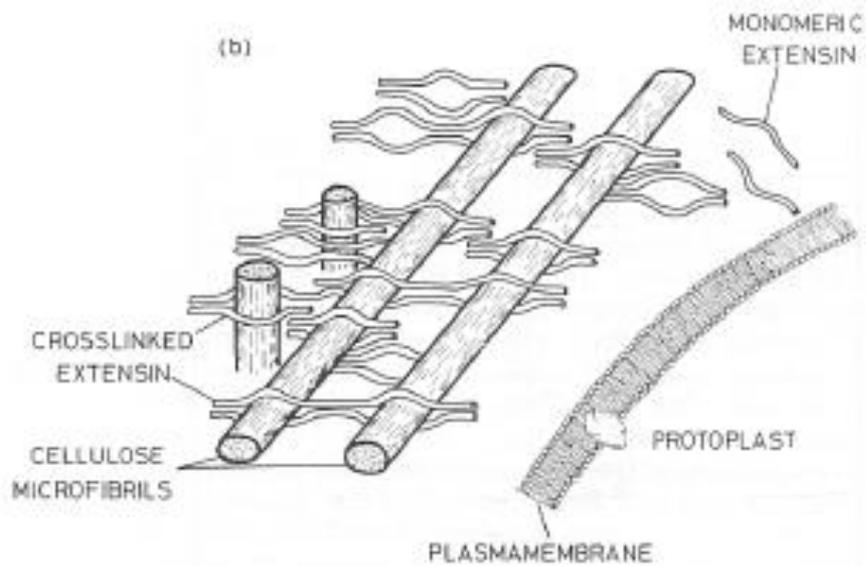
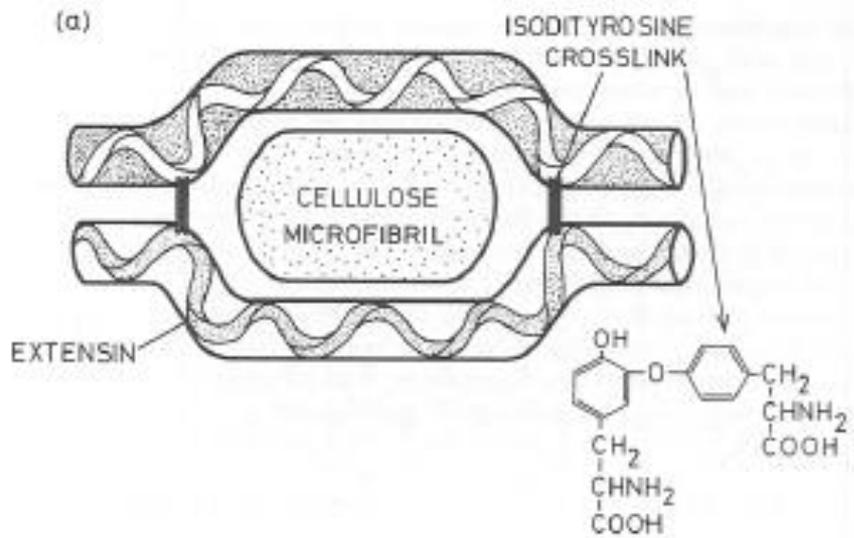
Glicoproteine ricche di idrossiprolina (estensina)

Ricche di prolina

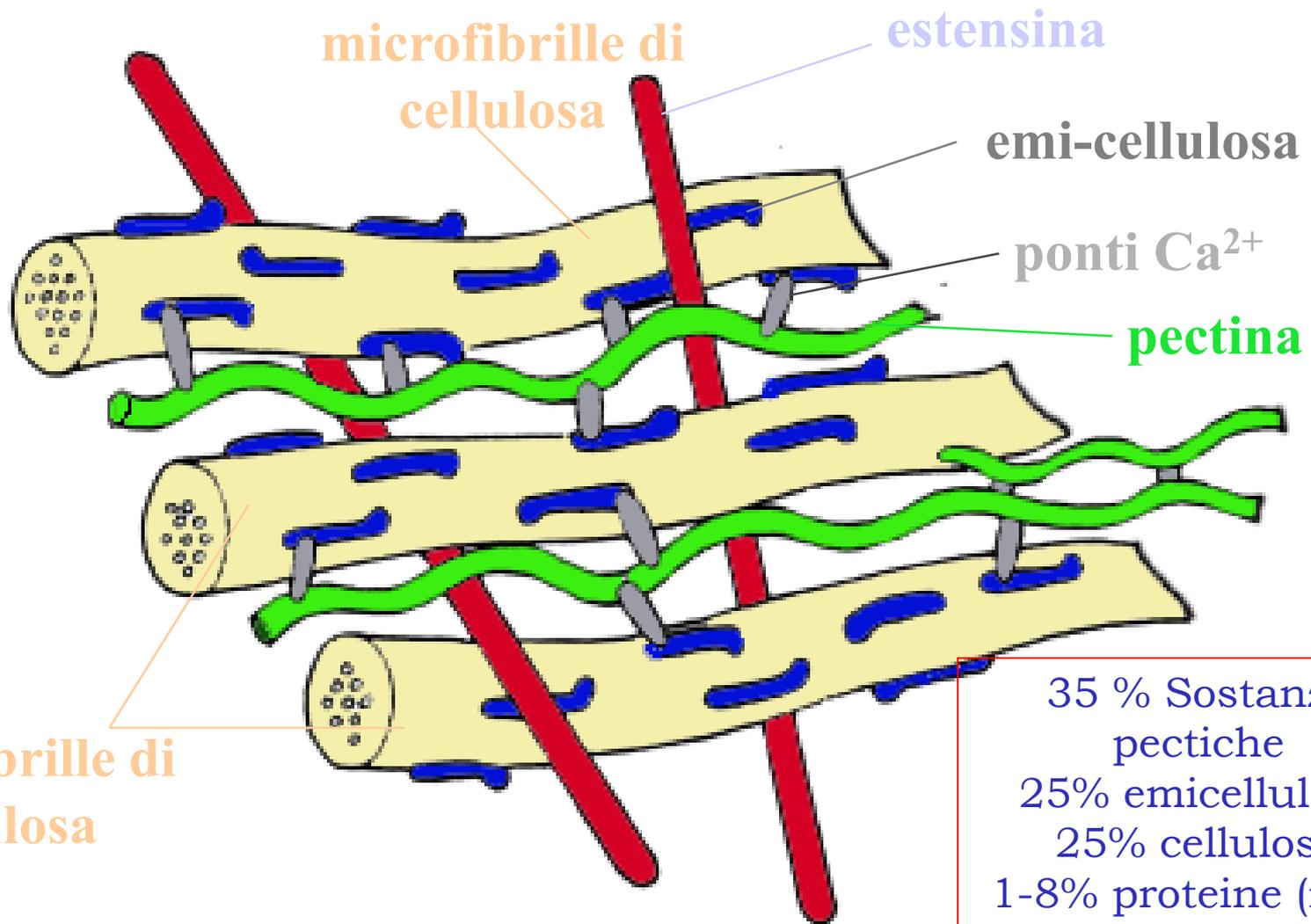
Ricche di glicina

HRGP (estensina), GRP e PRP

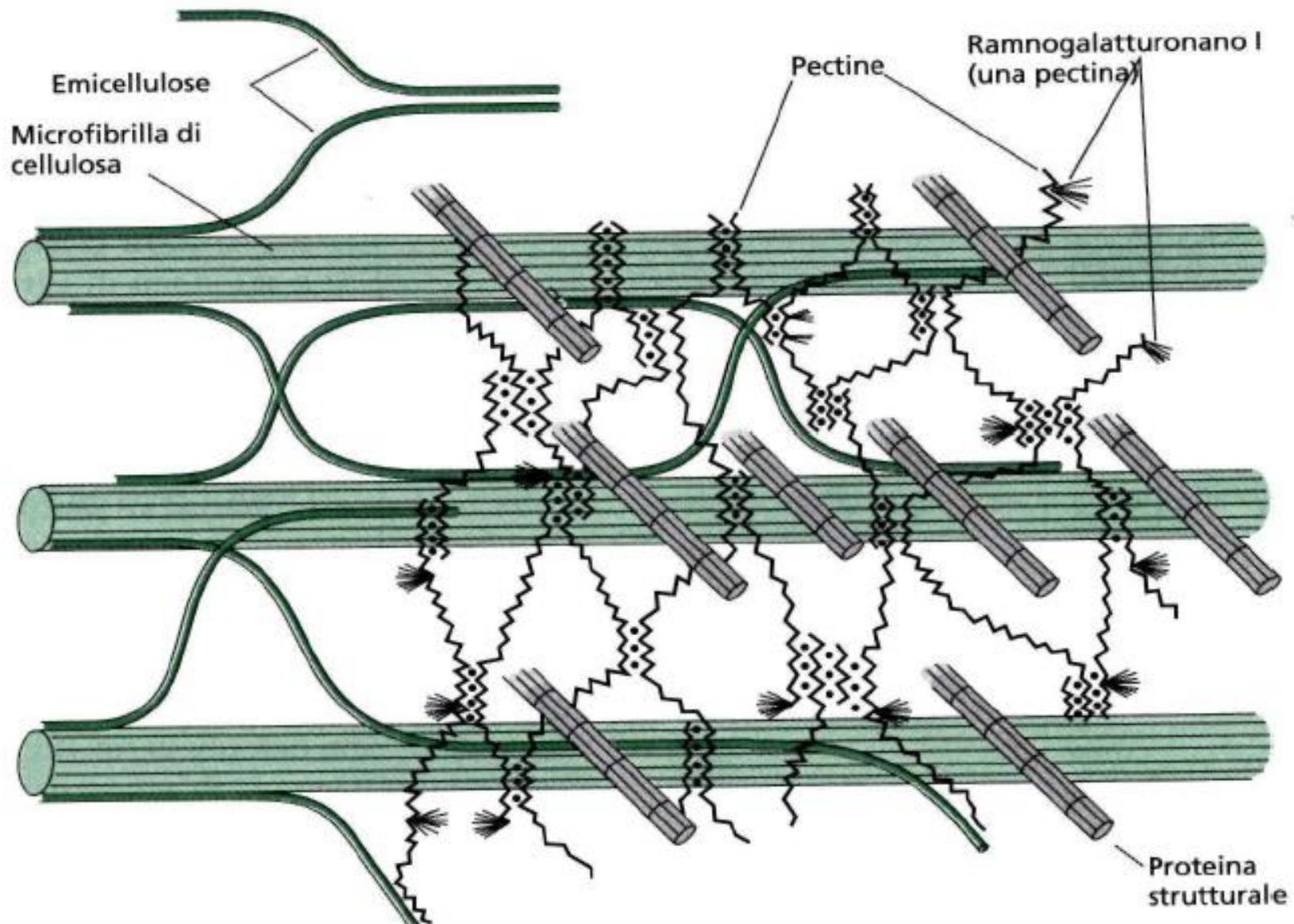
- Appena **secrete** sono **relativamente solubili**
- Diventano sempre più **insolubili** durante la maturazione cellulare o a seguito di **ferite** e attacco dei **patogeni**
- Si ritiene che il processo di **insolubilizzazione** sia dovuto a **legami intermolecolari** di difenilettere fra le **tirosine**
- Vengono **indotte** durante le ferite o attacco dei patogeni



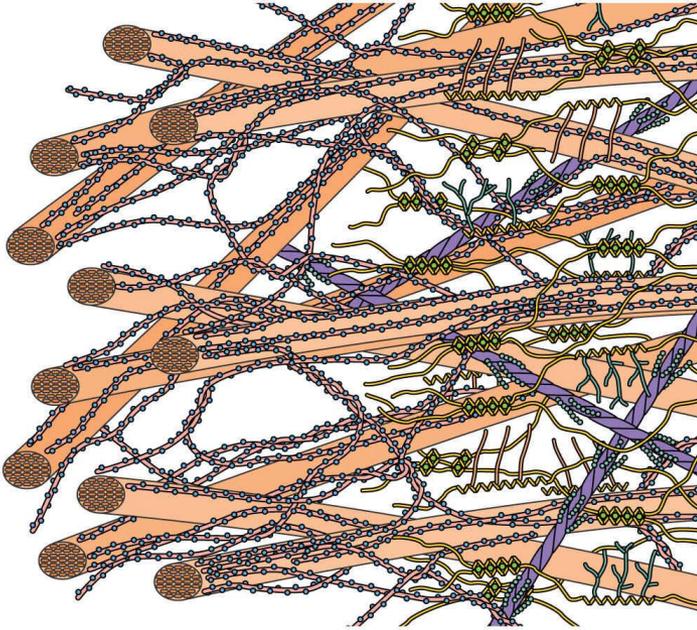
Esempio Strutturale della parete primaria



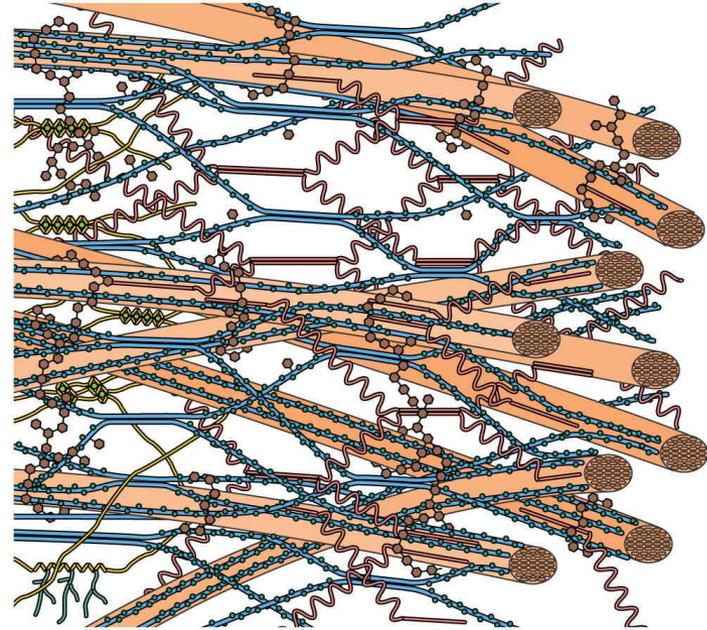
35 % Sostanze pectiche
25% emicellulose
25% cellulosa
1-8% proteine (nelle dicotiledoni)



(A) Type I wall



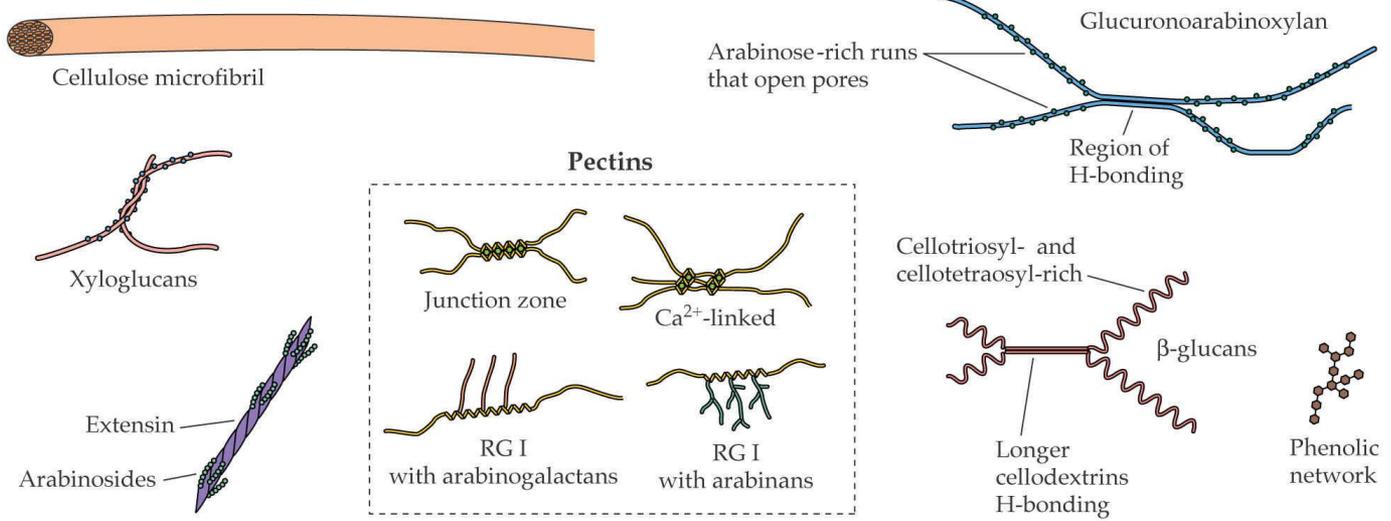
(B) Type II wall



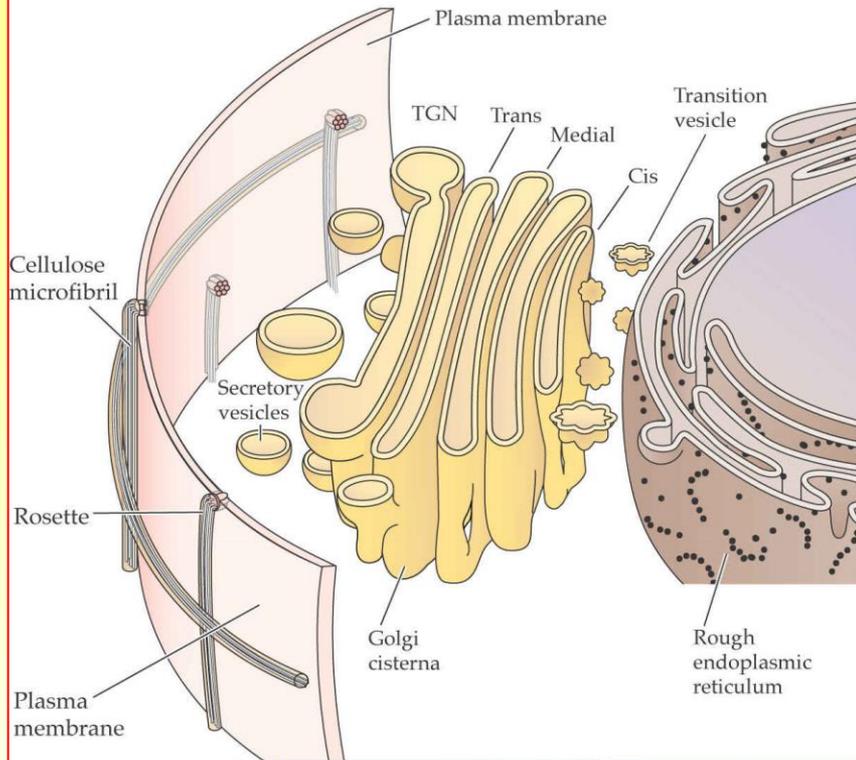
Tipo I

Tipo II

Key:



(A)



Site of synthesis for:
 Cellulose
 Callose

Site of synthesis for:
 Pectins
 HGA
 RG I
 RG II

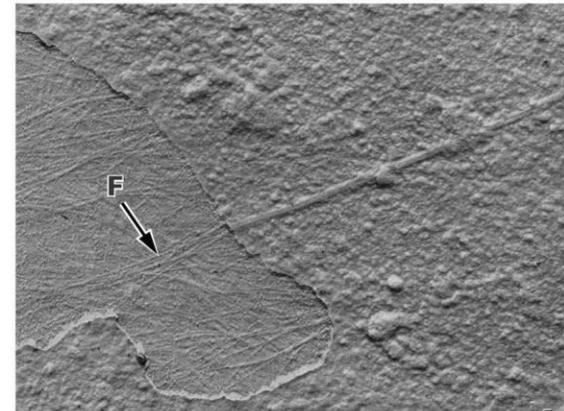
Cross-linking glycans
 Xyloglucan
 Glucuronoarabinoxylan
 β-Glucan
 Galactomannan

Site of glycosylation of:
 HRGPs
 AGPs
 Modified glycoproteins

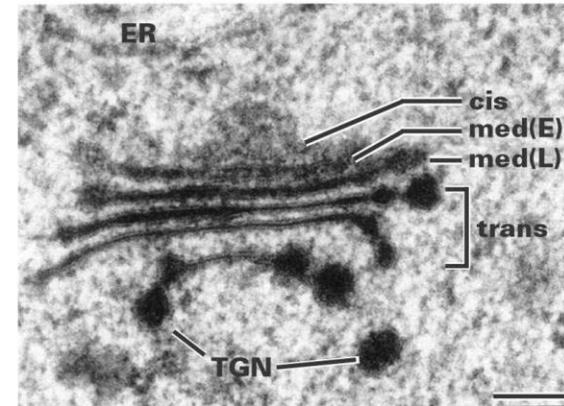
Site of synthesis for:
 Cell wall proteins
 HRGPs
 PRPs
 GRPs
 AGPs

Enzymes
 Hydrolases
 Esterases
 Peroxidases
 Polysaccharide synthase

(B)



(C)



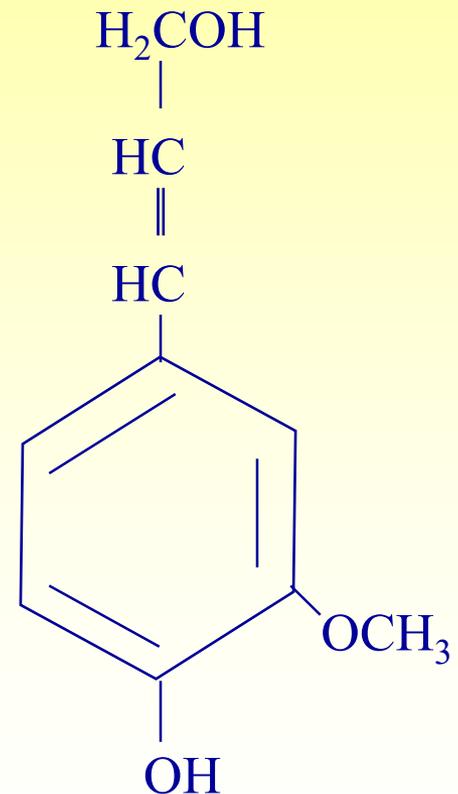
Componenti parete secondaria che conferiscono rigidità

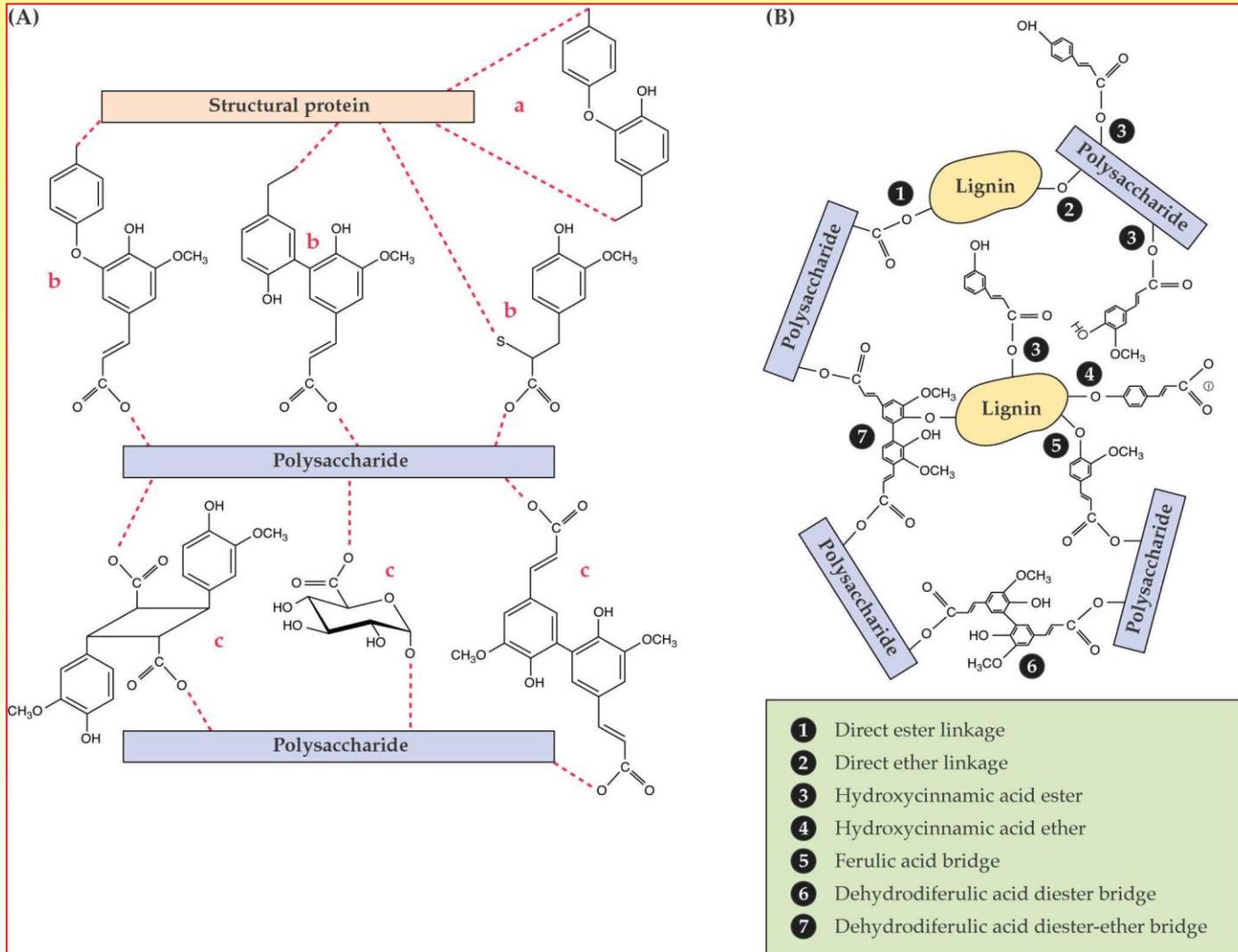
Lignina

- Macromolecole di monomeri di alcool aromatici (Fenilpropanoidi, alcoli idrossicinnamoilici ed i monolignoli –alcool *p*-cumarilico, coniferilico sinapilico)
 - alto peso molecolare
 - insolubile
 - impermeabile all'acqua
 - rigidità
- 25% del peso secco del legno

Fenilpropanoidi, alcoli idrossicinnamoilici ed i monolignoli –alcool *p*-cumarilico, coniferilico sinapilico maggiori componenti dei reticoli di lignina

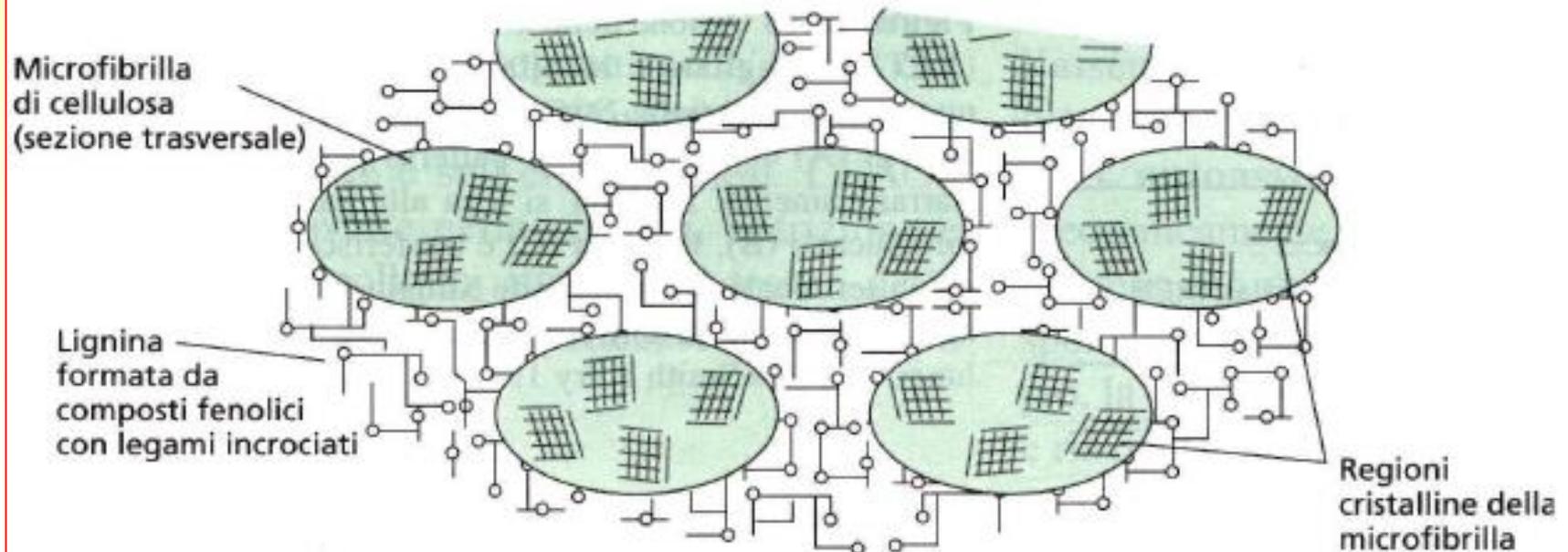
alcool coniferilico





Legami di interazione di polisaccaridi con la lignina

La sintesi di lignina **elimina H_2O** dalla parete e forma una **trama idrofobica** che lega la cellulosa e **previene l'espansione cellulare**



Parete cellulare e texture

Texture: Tutti gli attributi reologici e strutturali (geometrici e di superficie) di un prodotto alimentare percepibile per mezzo meccanico e tattile e dove è possibile, attraverso recettori visivi ed auditivi (ISO, 1981).

Friabilità-succosità-resistenza (robustezza, vigore)-pastosità
= “il sentire il frutto nelle labbra”

La presenza di una integrità strutturale della parete cellulare che gioca un ruolo nella percezione della tessitura

Adesione parete-parete
tra cellule

Forza della parete
primaria

Forza della lamella mediana, area di contatto cellula-cellula, estensione delle connessione tra plasmodesmi

Mentre i fattori come turgore cellulare e morfologia contribuiscono all'aspetto della texture del frutto

il processo di “softening” appare invariabilmente attribuibile al dissembaggio del network di polisaccaridi della parete primaria e della lamella mediana (Brummel, 2006).

1) dissoluzione della lamella mediana, riduzione quindi della adesione intercellulare, depolimerizzazione e solubilizzazione polisaccaridi delle emicellulose e delle pectine della parete cellulare e in alcuni casi un rigonfiamento della parete;
(Brummel and Harpster,2001);

2) incremento della espressione di numerosi enzimi degradativi, quali idrolasi, transglicosilasi, liasi, ed altre proteine che allentano la struttura della parete come le espansine (Brummel, 2006).

Bourne (1979) separò i frutti temperati in 2 gruppi



Quelli che si
ammorbidiscono
notevolmente a “scioglimento”
di texture

**Prugna, pomodoro e
kiwi**

Nel primo gruppo l'adesione cellula-cellula è povera ed il tessuto si separa con la minima rottura;

Nel secondo gruppo è forte e dà un “sentire” di friabilità

Mela e pera cv nashi

Quelli che si
ammorbidiscono
solo moderatamente e conservano
una texture friabile e
fratturabile

Variazione dei polisaccaridi durante il “softening” del frutto

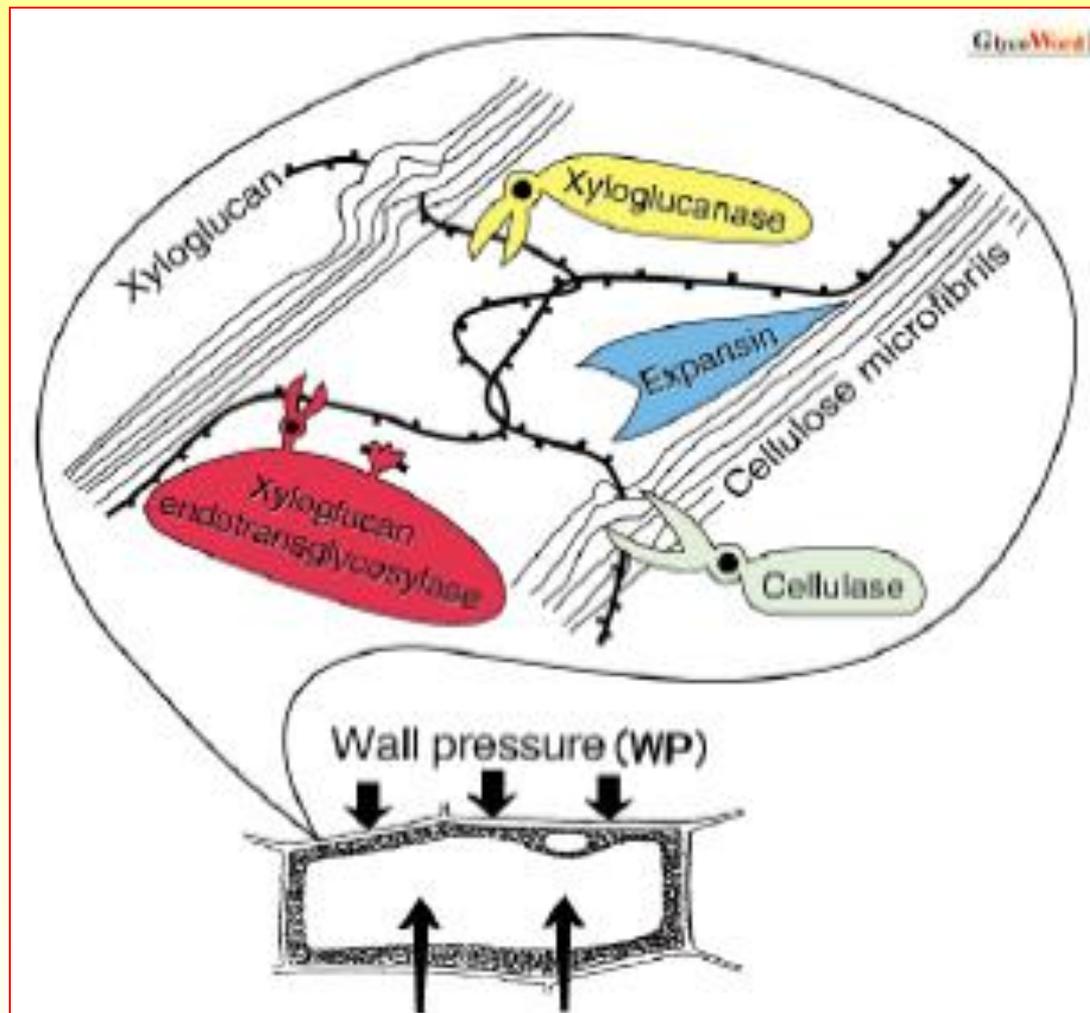
Studi chimici, microscopici, enzimatici e molecolari indicano che le alterazioni fisico-chimiche della parete e della lamella mediana sono i maggiori fattori della variazione della texture

Come..... non è ancora chiaro ???!!!!??

1980
“dogma”

Correlazione del “softening” con la depolimerizzazione dei polisaccaridi mediato da idrolasi (enzimi) associate alla parete cellulare

Notevoli problemi **METODOLOGICI** spesso dati in “vitro” non riflettono condizioni in “vivo”



Una volta che il processo di softening è cominciato, la velocità dei cambiamenti in texture sono in funzione del tipo di frutto e delle condizioni con cui il prodotto viene maneggiato.

Il softening dei frutti una volta iniziato è un processo irreversibile.

Da: A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity Saladié et al., Plant Phys., 2007

La spiegazione della mancanza di progresso nell'identificare i fattori individuali chiave del "fruit softening" include la possibilità che importanti variazioni associate al disassemblaggio della parete sono una conseguenza di numerosi enzimi che agiscono in concerto su multiple componenti strutturali, o che l'attività o le attività enzimatiche critiche non sono state identificate.

Comunque, una spiegazione alternativa è che la **degradazione dei polisaccaridi** non è la sola determinante del "fruit softening" e che altri processi fisiologici correlati al ripening giocano un ruolo chiave.

Polisaccaridi
pectici



Sono sottoposti a depolimerizzazione e solubilizzazione durante il “ripening”.
Questi processi sembrerebbero interdipendenti

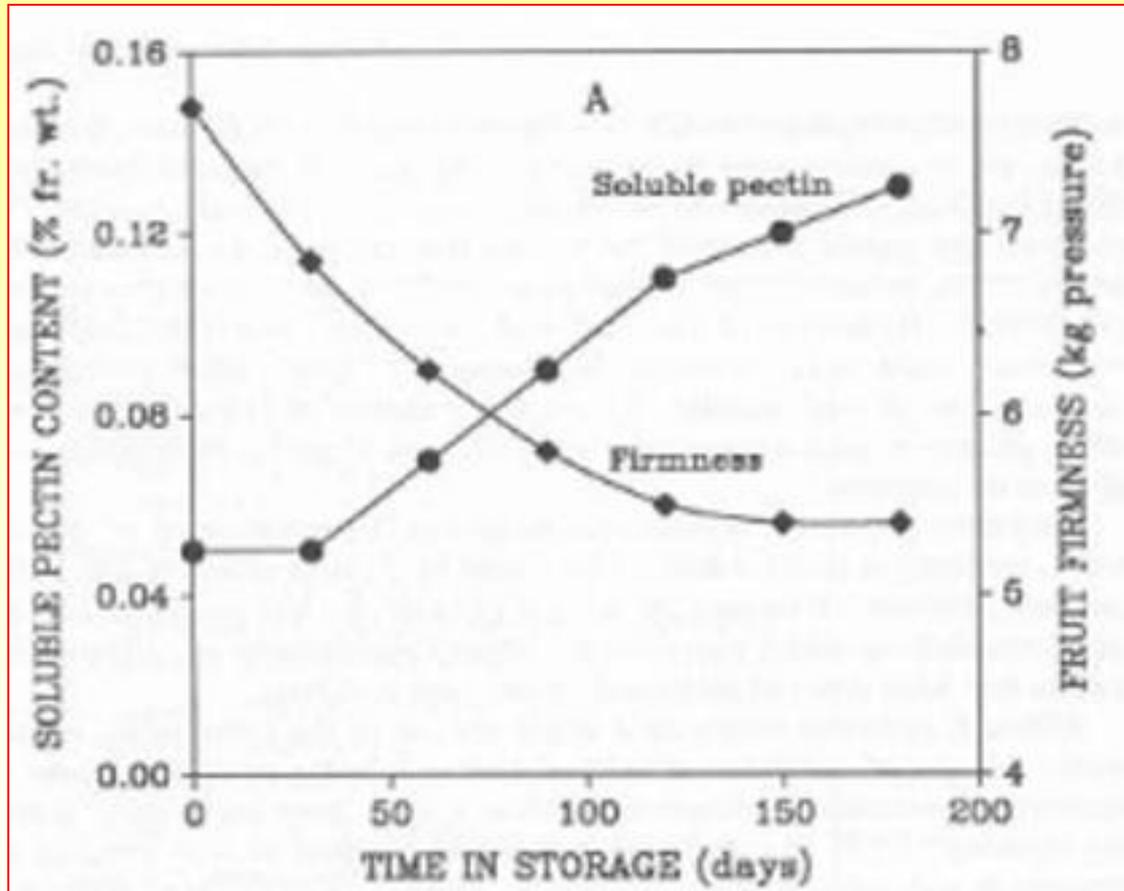


La **solubilizzazione** dà una misura della variazione di fase nelle proprietà fisico-chimiche dei polisaccaridi pectici che è indicativa della dissoluzione della parete

Durante il “softening” fino allo “scioglimento” in alcuni frutti c’è stretta correlazione tra swelling e solubilizzazione da moderata a pesante (pomodoro, kiwi, avocado)

Frutti che restavano friabili con il “ripening” non avevano swelling e la solubilizzazione era non determinabile

La **Depolarizzazione** è la riduzione della massa molecolare attraverso il taglio sia della catena lineare che ramificata. Può essere determinata anche da disaggregazione senza intervento di idrolasi



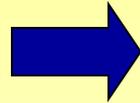
mela

Pectinasi

- **pectinametilesterasi (PME)**: de-esterifica la pectina a pectato e metanolo
- **pectina liasi (PL)**: attacca direttamente la pectina, tagliando i legami glicosidici interni
- **poligalatturonasi (PG)**: la reazione di taglio del poligalatturonato avviene per idrolisi dei legami glicosidici all'interno del polimero e produce oligomeri

Enzimi associati alla parete cellulare

Endo-PG



Catalizza l'idrolisi della catena lineare di 1-4 galatturonani. L'enzima richiede residui contigui di galatturonosil per iniziare e mantenere la sua azione

In pomodoro incrementa drammaticamente durante il "ripening" a causa di sintesi *de novo*, 2000 volte il livello di mRNA

Due isoforme

PG 1

Si accumula prima

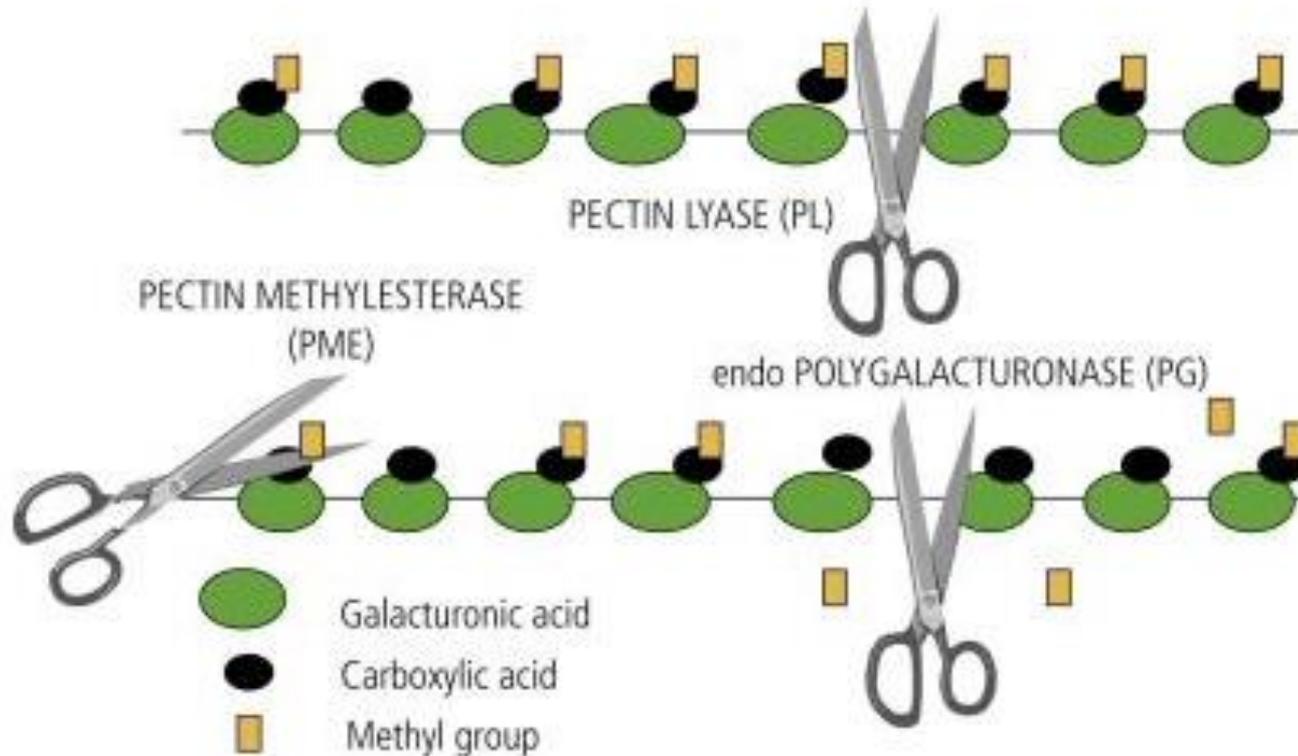
PG 2

PG 2A

Diventa la forma dominante successivamente

PG 2B

Mode of action of the main pectolytic enzymes



Tra le due isoforme, l'endopoligalatturonasi è molto più importante, nel senso che rompe la molecola di pectina verso il centro, producendo due molecole di circa la metà delle dimensioni originali e aumentando notevolmente la loro solubilità. La rimozione delle subunità terminali operata dalla esopoligalatturonasi, provoca tuttavia, solo una minima alterazione delle proprietà della molecola di pectina.

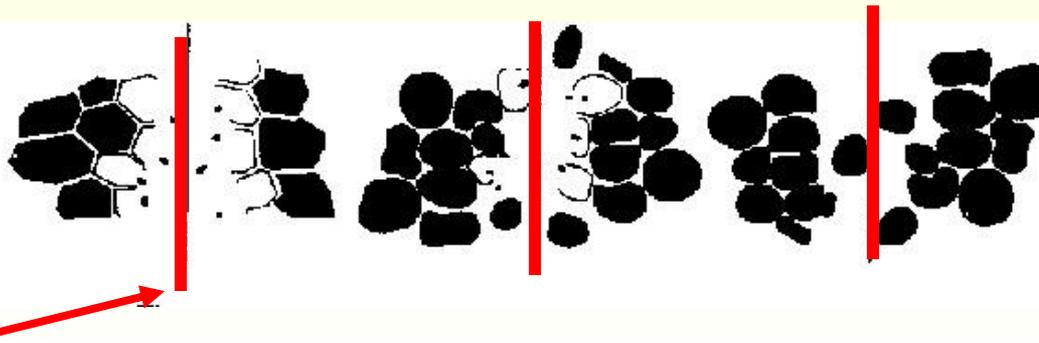
Intenerimento

- modificazioni degradative della cellulosa, emicellulosa, pectine e proteine che costituiscono la parete cellulare e la lamella mediana, ad opera di enzimi (poligalatturonasi, cellulasi, espansine etc.);
- idrolisi dei carboidrati di riserva (amido);
- aumento spazi intercellulari;
- diminuzione del turgore cellulare.

croccante-morbido

non farinoso

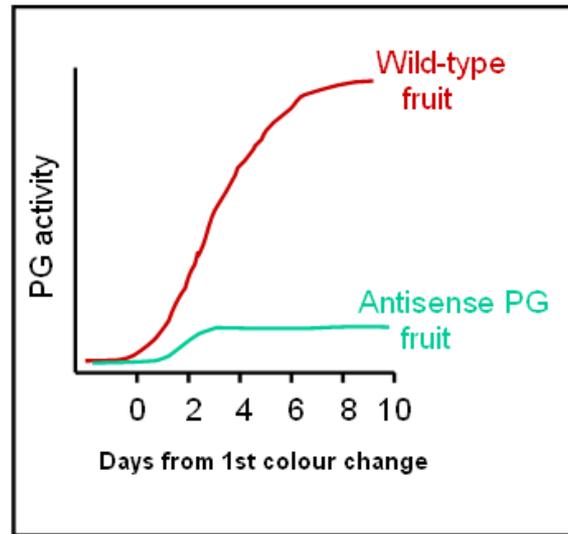
farinoso



Taglio/masticazione

Altering Fruit Ripening with Antisense RNA

Polygalacturonase (PG) is an enzyme that breaks down pectin in ripening fruit walls



Plants with an antisense PG transgene produce less PG. Walls soften more slowly

Many genes manipulated in the same way to answer basic questions:

- what is the role of hormones in ripening?
- what do particular enzymes do in fruit walls?

Analisi del softening in piante transgeniche ha riaperto il dibattito sull'importanza relativa delle PGA. In piante di pomodoro transgeniche nelle quali è stato virtualmente eliminato il livello di sintesi della PGA (99%), il softening del frutto non era significativamente differente dal normale frutto non trasformato. Allo stesso modo, quando il livello della PGA viene sovra espressa nel frutto che ne è invece carente, il softening risulta non significativamente modificato.



AC
(Ailsa Craig)
Normally
softening



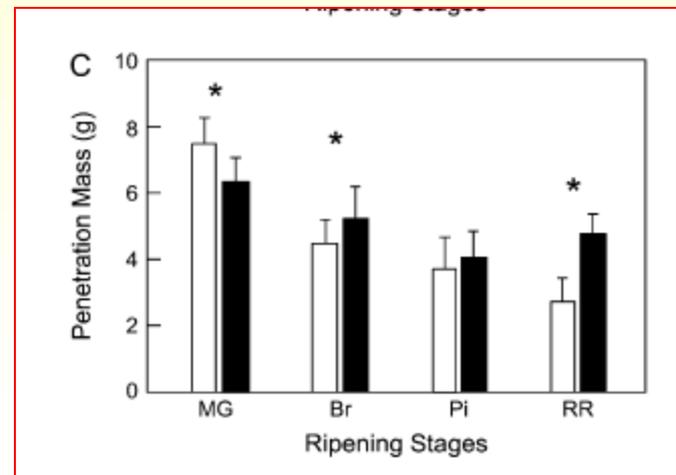
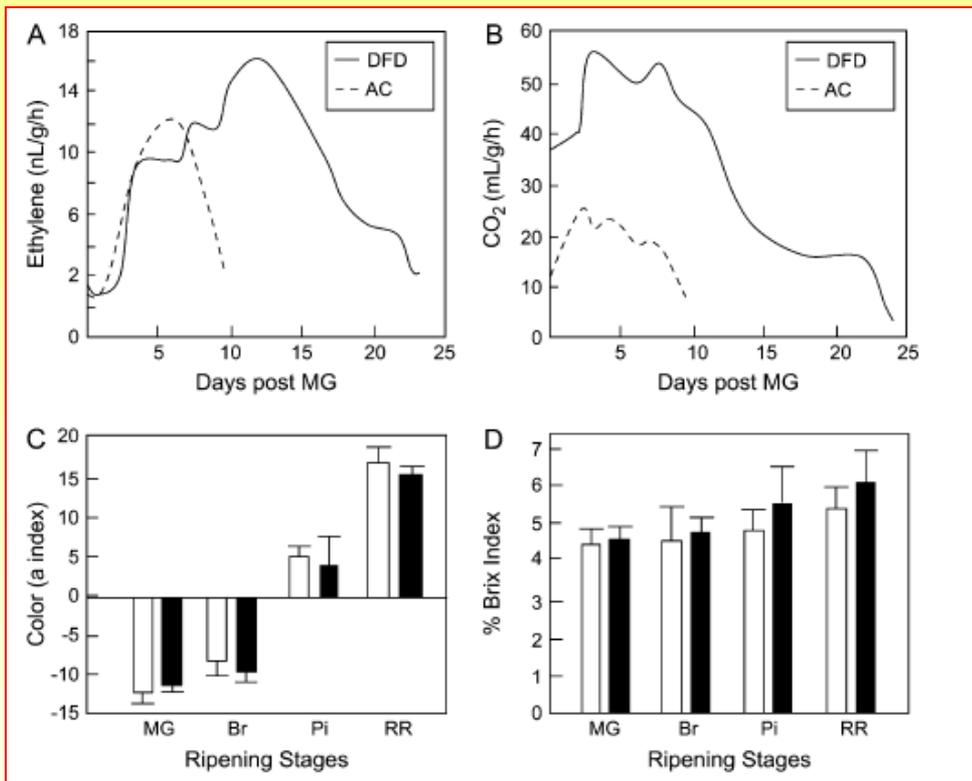
DFD
Delayed Fruit
Deterioration

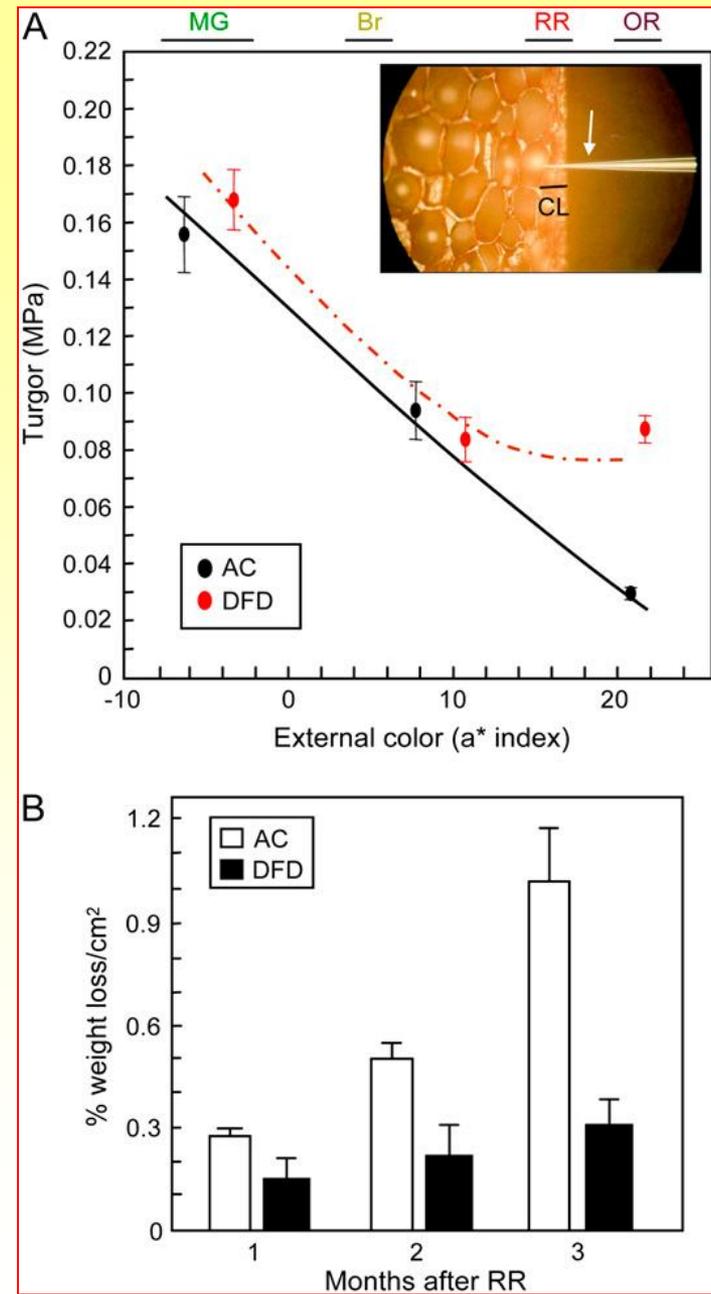
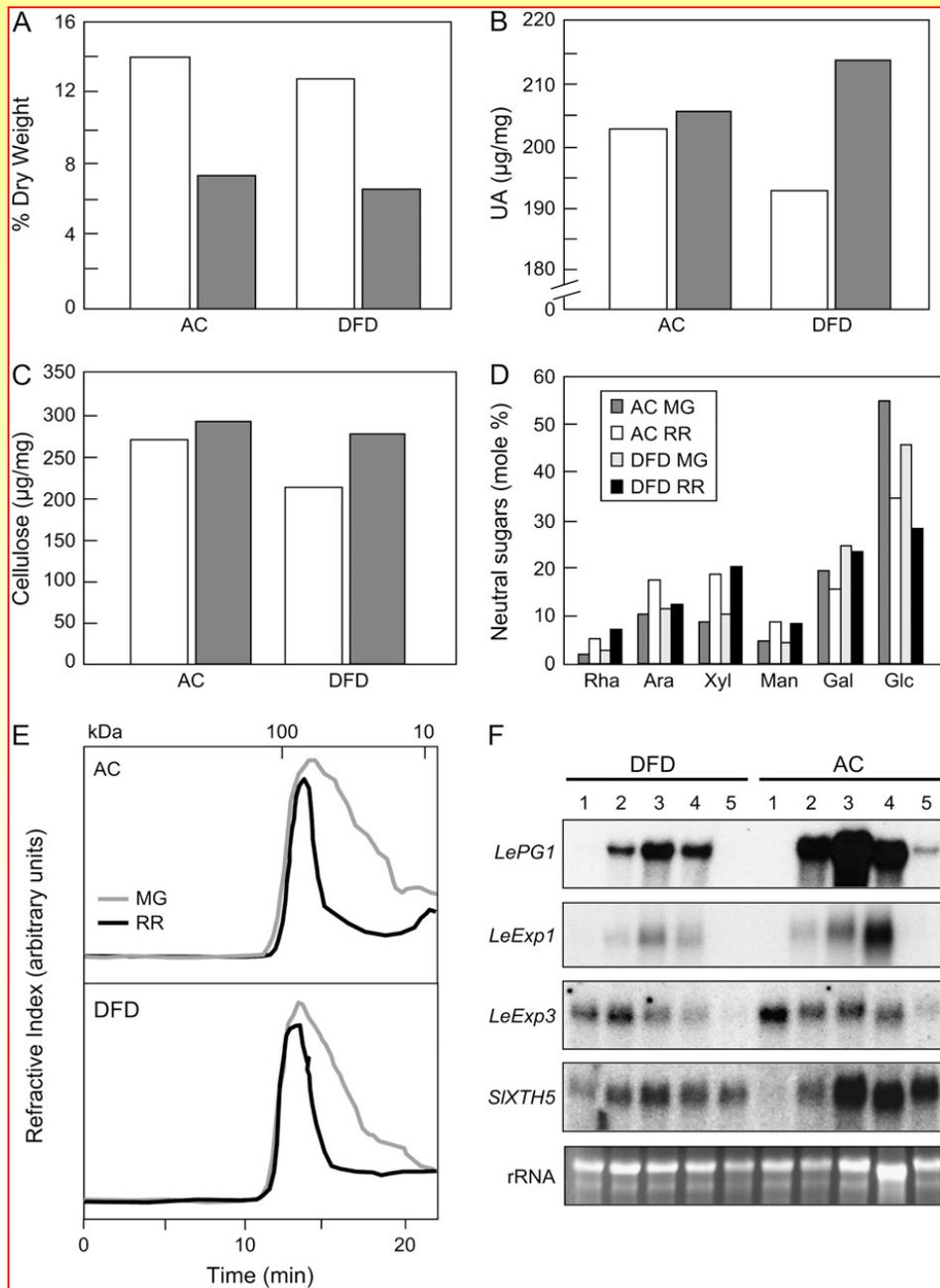


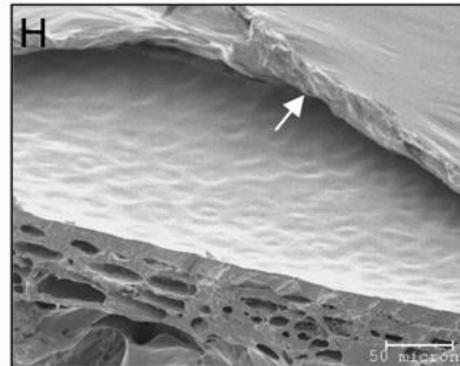
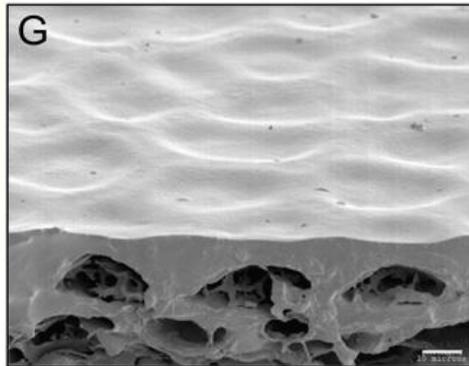
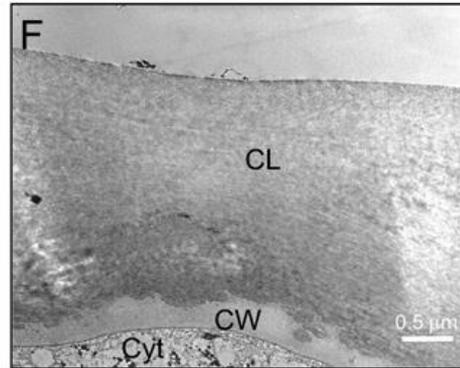
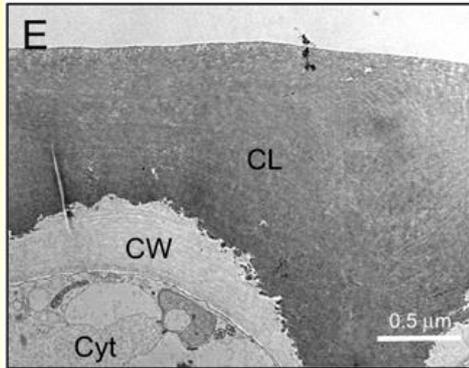
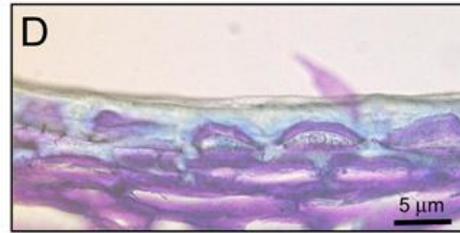
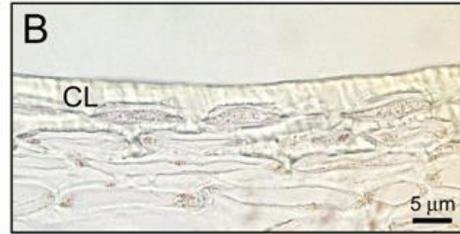
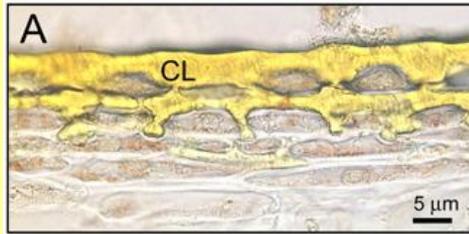
AC
(Ailsa Craig)



DFD







cuticola

DFD is unlike previously reported tomato mutants in that loss of fruit firmness is largely uncoupled from other aspects of ripening, thus providing a unique opportunity to examine the factors that contribute to fruit softening. Our results suggest that **multiple coordinated processes** are involved, including **disassembly of polysaccharide networks in the primary wall and middle lamella and transpirational water/turgor loss**.

In DFD fruit, the turgor and fruit firmness data indicate that softening of intact fruits results from an early decline in cellular turgor coincident with early changes in wall architecture, presumably as a result of wall relaxation. A second component is then provided by substantial **water transpiration**, which occurs in parallel with continued wall degradation and a reduction in intercellular adhesion. The **cuticle** itself is also thought to have an important influence on the biomechanical properties of ripening fruit (Petracek and Bukovac, 1995; Bargel and Neinhuis, 2004; Matas et al., 2004; Bargel and Neinhuis, 2005; Edelman et al., 2005) and studies with isolated tomato fruit cuticles (Bargel and Neinhuis, 2005) suggest that their relative contribution to tissue strength increases markedly during ripening, an idea that was previously suggested by analyses of intact tomato fruits (Jackman and Stanley, 1994).

Taken together, a growing body of evidence suggests that, as with cell wall metabolism, **dynamic changes in the structure and composition of the fruit cuticle** that lead to a reduction in fruit firmness **are likely to be an integral and regulated part of ripening**. The influence of the cuticle on fruit firmness would be both **direct**, acting as a load bearing matrix under tension, and **indirect** by regulating fruit water status. We note that our conclusions are based exclusively on studies with tomato and do not necessarily apply to all fruits.