



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO TECNOLOGICO
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Corso di Dottorato in Biodiversity in Agriculture and Forestry
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali
Settore Scientifico Disciplinare AGR/03

**STUDIO DEI FATTORI ECOFISIOLOGICI COINVOLTI NELLA
FORZATURA DEL LIMONE (*Citrus limon* (L.) Burm. f.)**

IL DOTTORE
DOTT.SSA EUGENIA GUCCIONE

IL COORDINATORE
CH.MO PROF. RICCARDO LO BIANCO

IL TUTOR
PROF. GIUSEPPE SORTINO

CO TUTOR
PROF.SSA ANNALISA MARCHESE

CICLO XXXVII
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2025

PREMESSA E OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA.....	1
CAPITOLO 1. INTRODUZIONE.....	4
1.1. Origine e diffusione degli agrumi.....	4
1.2. Il limone (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.).....	6
1.3. La rifioritura.....	7
1.4. <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f. cv. <i>Femminello zagara bianca</i>	8
1.5. Portinnesto.....	9
1.5.1. Portinnesto e suoi attributi.....	9
1.6. <i>Citrangae carrizo</i>	11
1.7. <i>Citrus volkameriana</i>	12
1.8. Strategie di irrigazione deficitaria.....	13
1.9. La “forzatura” del limone.....	14
1.10. La “forzatura” nel contesto delle strategie a deficit idrico controllato.....	17
CAPITOLO 2. GLI EFFETTI DELLA “FORZATURA” SULLA QUALITA’ DEI FRUTTI DI <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	20
The influence of water stress and two rootstocks on cv <i>Femminello Zagara Bianca</i> lemon (<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.) fruit quality.....	23
Abstract.....	23
2.1. Introduction.....	23
2.2. Materials and methods.....	25
2.2.1. Statistical analysis.....	26
2.3. Results and discussions.....	26
2.3.1. Physiological essays.....	26
2.3.2. Fruit weight and net production.....	27
2.3.3. Juice yield and characterization.....	28
2.3.4. Total polyphenol content.....	30
2.3.5. Color.....	31
2.4. Conclusions.....	32
CAPITOLO 3. GLI EFFETTI DELLA “FORZATURA” SU DUE DIVERSI PORTINNESTI.....	33
3.1. Disegno sperimentale.....	36
3.2. Campo sperimentale.....	39
3.3. Relazioni contenuto idrico del suolo - temperatura.....	40
3.4. Monitoraggio del potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}).....	48
3.5. Conduttanza stomatica (gs).....	55
3.6. Tasso fotosintetico netto (A).....	57
3.7. Tasso traspirativo (E).....	60
3.8. Efficienza d’uso dell’acqua (WUE).....	64
3.9. Conclusioni.....	66
CAPITOLO 4. DIAGNOSTICA FOGLIARE PER LA PREDIZIONE DEGLI STRESS ABIOTICI.....	67
4.1. Materiali e metodi.....	69
4.2. Risultati e discussioni.....	69
4.3. Flavonoidi.....	69
4.4. Clorofilla.....	72
4.5. Antociani.....	74
4.6. Nitrogen Balance Index (NBI).....	76
4.7. Conclusioni.....	79
CAPITOLO 5. MONITORAGGIO DELLA BIOMETRIA ED EFFETTO DEL DEFICIT IDRICO CONSIDERATI DUE DIVERSI PORTINNESTI.....	80
5.1. Materiali e metodi.....	84
5.2. Diametro del fusto (DBH).....	85
5.3. Altezza delle piante (H).....	87
5.4. Diametro, area e volume della chioma.....	89
5.5. Leaf Area Density (LAD).....	95
5.6. Conclusioni.....	97

<i>CAPITOLO 6. COINVOLGIMENTO DELLA PRODUZIONE DI ETILENE E DELLE POLIAMMINE NEL ‘RIND PITTING’ DEL LIMONE ‘FINO’</i>	<i>100</i>
Involvement of ethylene production and polyamines in rind pitting of ‘Fino’ lemon fruit	102
Abstract.....	102
6.1. Introduction	102
6.2. Material and methods	105
6.2.1. Experimental design and quality assessment.....	105
6.2.2. Physiological analysis.....	107
6.2.3. ACC extraction assay	107
6.2.4. Polyamine analysis	107
6.2.5. Total antioxidant activity.....	108
6.2.6. Statistical analysis.....	108
6.3. Results and discussion	108
6.4. Conclusion	117
References	118
<i>7. CONCLUSIONI</i>	<i>122</i>
<i>8. BIBLIOGRAFIA</i>	<i>125</i>

PREMESSA E OBIETTIVI DEL PROGETTO DI RICERCA

Nella presente tesi sono riportati i principali risultati dell'attività di ricerca svolta durante il triennio del corso di dottorato in *Biodiversity in Agriculture and Forestry* (Ciclo XXXVII). Il limone (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), una delle specie più coltivate e commercialmente rilevanti nel panorama agricolo mondiale, rappresenta un elemento cruciale per l'economia di numerosi paesi, inclusa l'Italia. La comprensione approfondita dei meccanismi alla base della fruttificazione è diventata di fondamentale importanza in un contesto in cui il cambiamento climatico e l'uso sostenibile delle risorse richiedono nuove soluzioni agronomiche e varietali. In particolare, lo studio dei fattori genetici ed ecofisiologici coinvolti può fornire strumenti utili per migliorare la produttività, la qualità dei frutti e la resilienza delle coltivazioni di limone in condizioni ambientali avverse. La fruttificazione del limone è un processo complesso, regolato da una combinazione di fattori genetici ed ecofisiologici, influenzati da condizioni ambientali e pratiche agronomiche adottate. Tra queste, la forzatura rappresenta una tecnica tradizionale, particolarmente diffusa in alcune regioni, il cui scopo è stimolare la fioritura e favorire una produzione fuori stagione, dall'elevato valore commerciale. La forzatura, che si basa principalmente sulla gestione controllata dell'irrigazione e delle risorse idriche, viene applicata per interrompere la fase di riposo vegetativo e indurre la pianta a fruttificare in periodi specifici. Sebbene questa tecnica sia ampiamente utilizzata, i suoi effetti a livello genetico e fisiologico non sono ancora completamente compresi. Pertanto, uno studio approfondito che indaghi l'interazione tra i fattori genetici, ecofisiologici e la pratica della forzatura può offrire nuovi spunti per migliorare la produttività e la qualità del frutto, ottimizzando al contempo le risorse naturali e l'efficienza agronomica. Fino ad oggi, la pratica della forzatura del limone in Sicilia è stata guidata principalmente dall'esperienza pratica nonché empirica, in quanto risulta assente una metodologia standardizzata che permetta la riproducibilità dei risultati nel tempo e nello spazio, rendendo difficile il progresso nella comprensione e nel miglioramento della tecnica, limitando il suo impatto e la sua applicabilità. Tuttavia, per abbandonare empirismo e irregolarità, la presente tesi si prefigge l'obiettivo di fornire risultati sostanziali per l'integrazione della forzatura del limone nel contesto dell'agricoltura di precisione.

Finora, la letteratura disponibile si è concentrata principalmente sui principi fondamentali della forzatura, senza offrire un protocollo dettagliato e accessibile agli operatori agricoli, in grado di ottimizzare la pratica stessa attraverso una gestione conservativa del limoneto ed una gestione ponderata della risorsa idrica la cui scarsità, nel contesto del cambiamento climatico, risulta essere uno dei fattori maggiormente limitanti e punto focale delle prossime

sfide ambientali. Pertanto, il presente progetto di ricerca mira a investigare gli effetti ecofisiologici della forzatura del limone, consentendo di aumentare e prolungare la produttività nel tempo, garantendo, allo stesso tempo, frutti di alta qualità che possono in futuro essere valorizzati dai marchi di origine. Attraverso una metodologia scientificamente fondata e replicabile, la forzatura del limone può uscire dall'aleatorietà e dall'empirismo migliorando non solo l'efficienza e la sostenibilità della produzione di limoni, ma contribuendo anche a proteggere e promuovere questo importante settore agricolo regionale.

La presente tesi è articolata in sei capitoli principali, volti ad approfondire gli effetti della *forzatura* e delle strategie di irrigazione a deficit controllato (DIC) sul limone (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), cultivar *Femminello Zagara Bianca*, innestata su due portinnesti, *Carrizo citrange* e *Citrus volkameriana*, in due annate agrarie consecutive.

Il *Capitolo 1* fornisce il quadro introduttivo e teorico, illustrando l'origine e la diffusione degli agrumi, le caratteristiche morfologiche e fisiologiche del limone e le peculiarità della cultivar utilizzata. Viene inoltre descritto il ruolo dei portinnesti nella gestione del limoneto e vengono inquadrare le diverse strategie irrigue sostenibili, con particolare riferimento alla pratica tradizionale della forzatura e alla sua possibile evoluzione verso un modello più conservativo e scientificamente fondato.

Il *Capitolo 2* analizza gli effetti della forzatura sulla qualità dei frutti invernali (primofiore), valutando in dettaglio parametri come peso, resa in succo, contenuto in polifenoli, colore della buccia e composizione chimica, in relazione al regime irriguo e al portinnesto. L'analisi comparativa ha permesso di evidenziare le differenze qualitative tra i frutti prodotti da piante sottoposte a stress idrico controllato e quelli derivanti da irrigazione convenzionale. L'articolo scientifico riportato è stato presentato durante il *V European Horticultural Congress - EHC2024 (SHE2024)*, organizzato dall'*International Society of Horticultural Science (ISHS)*, a Bucarest, Romania, dal 12 al 16 maggio 2024

Il *Capitolo 3* è dedicato allo studio delle risposte fisiologiche delle piante ai diversi trattamenti irrigui, con particolare attenzione al potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}), alla conduttanza stomatica, ai tassi fotosintetico e traspirativo, e all'efficienza d'uso dell'acqua. L'interazione tra portinnesto e regime idrico ha evidenziato risposte differenziate, che forniscono indicazioni utili per la scelta delle combinazioni più resilienti in contesti mediterranei.

Il *Capitolo 4* si concentra sulla diagnostica fogliare non distruttiva come strumento per la valutazione precoce dello stress abiotico, attraverso l'analisi di pigmenti fotosintetici, flavonoidi, antociani e dell'indice di bilancio azotato (NBI). Tali marcatori si sono dimostrati sensibili e affidabili per monitorare la condizione fisiologica delle piante in campo.

Il *Capitolo 5* affronta l'analisi morfometrica della vegetazione tramite tecnologia LiDAR, rilevando parametri come il diametro del fusto, l'altezza della pianta, la densità fogliare e il volume della chioma. Le informazioni raccolte hanno permesso di confrontare la plasticità adattativa dei due portinnesti in risposta ai trattamenti idrici e di valutarne l'idoneità agronomica.

Il *Capitolo 6* presenta i risultati di un approfondimento condotto su campioni di frutti di *Citrus limon* (L.) Burm. f. della cultivar *Fino* coltivati in Spagna in condizioni di fertirrigazione standard (SF) e intensiva (IF), investigando il ruolo delle poliammine e dell'etilene nella comparsa della fisiopatia post-raccolta denominata *rind pitting*. Questo studio, sebbene condotto in ambiente diverso, si inserisce nel più ampio obiettivo della tesi di comprendere le risposte fisiologiche e metaboliche del limone a pratiche agronomiche differenziate.

Nel loro insieme, i capitoli forniscono un contributo originale e multidisciplinare allo studio della forzatura del limone e pongono le basi per lo sviluppo di strategie irrigue più sostenibili e tecnologicamente avanzate, nel rispetto della pianta e delle esigenze produttive dei sistemi agrumicoli mediterranei.

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1. Origine e diffusione degli agrumi

Gli agrumi appartengono alla famiglia delle *Rutaceae*, una delle 21 famiglie dell'ordine *Sapindales*. Questa famiglia comprende circa 160 generi e oltre 1600 specie, suddivise in 7 sottofamiglie e 12 tribù, formata prevalentemente da alberi o arbusti adattati a climi tropicali e subtropicali. Una delle sottofamiglie, le *Aurantioideae*, include diversi generi, tra cui il genere *Citrus*, i cui frutti prendono il nome di *esperidio*. Questi frutti derivano da ovari singoli, con una cavità suddivisa in carpelli, corrispondenti ai segmenti che contengono le vescicole di succo. La loro origine è rimasta incerta fino a tempi recenti, generando dibattiti nel corso dei secoli.

Le prime testimonianze sull'origine degli agrumi provengono da antiche leggende, come quella delle mele d'oro nel giardino delle Esperidi. Secondo la mitologia, Eracle fu incaricato di compiere 12 fatiche come penitenza imposta da Euristeo, tra cui rubare le mele d'oro, simbolo d'immortalità, dal giardino delle Esperidi, le tre figlie di Esperide. Per secoli, diversi autori hanno identificato il giardino delle Esperidi in varie località, come la Siria o le coste libiche, anche se le fonti più autorevoli lo collocavano nell'ovest, oltre il monte Atlante (Risso and Poiteau, 1818). In greco antico, "Esperidi" significa infatti "Occidente", oltre che "figlie di Esperide". Questa leggenda si diffuse nell'VIII secolo a.C., largamente in anticipo rispetto alla comparsa dei primi agrumi, i cedri, in Occidente, intorno al IV secolo a.C.. Le prime fonti che associano i cedri alle mele d'oro non apparvero fino al III secolo d.C., quindi è improbabile che gli agrumi fossero i veri frutti d'oro del mito.

Nonostante ciò, con la pubblicazione nel 1646 dell'opera di G.B. Ferrari, padre gesuita, sulla coltivazione degli agrumi, *Hesperides sive de Malorum Aureorum Cultura et Usu* (Ferrari, 1646), si stabilì un legame duraturo tra i frutti leggendari e gli agrumi grazie ad un volume riccamente illustrato. Questa idea si radicò talmente tanto, anche tra autori successivi come *Volkamer* (1708), che il nome "Esperidi" divenne sinonimo di agrumi. Tale associazione è ormai parte della nostra cultura e si riflette in termini botanici che rimandano a questa origine mitologica, come "esperidio", *Citrus aurantium*, e *Aurantioideae*.



Fig.1 G. B. Ferrari (Siena, 1584 – 1655) *Hesperides Sive de Malorum Aureorum Cultura et Usu Libras Quatuor* - studi sul limone, 1646

Gli agrumi principalmente coltivati appartengono ai generi *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella* e sono originari di una vasta zona dell'Asia orientale compresa tra le regioni tropicali che si estendono dal 25° parallelo all'equatore e, sebbene siano noti gli areali d'origine di varie specie di mandarini (*Citrus reticulata* L.), arancio dolce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), limette, pummelo (*Citrus maxima* (Brum.) Merr.), cedro (*Citrus medica* L.) ed arancio amaro (*Citrus aurantium* L.), risultano ad oggi sconosciute area originaria ed entità botanica del limone (*Citrus limon* (L.) Burm f.) che è una specie di agrume di origine ibrida se si pensa che tutti gli agrumi coltivati si sono originati a partire da tre principali specie, *Citrus reticulata* L., *Citrus maxima* (Brum.) Merr. e *Citrus medica* L.

Le prime nozioni riguardanti origine e diffusione del genere *Citrus* sono da datare al 310 a.C. quando Teofrasto descrive l'albero e la biologia fiorale del cedro, seguito da Virgilio (70-19 a.C.), Dioscoride (60-79 a.C.) e Plinio il Vecchio (23-79 a.C.) che ne parla nella sua *Naturalis Historia* chiamandolo *malus assyria*, *malus medica* e *citrus*. Solo nel 1000-1100 d.C. gli Arabi torneranno a parlare del genere *Citrus* e in particolare del cedro, dell'arancio amaro e del limone. Nel XV secolo sorgono le *orangery* nei castelli reali. Nel 1737 viene

pubblicata il *Genera plantarum* di Linneo che descrive le tre specie principali del genere *Citrus*, *trifoliata*, *medica* e *aurantium*. Negli scritti linneiani compare una varietà botanica del cedro, il limone, denominato *Citrus medica limon*. In seguito, numerosi tassonomisti si occuparono delle sottofamiglie delle *Aurantioideae*, fino alla riproposizione, nel 1967, dell'opera di W. T. Swingle, *The Citrus industry*.

1.2. Il limone (*Citrus limon* (L.) Burm. f.)

La filogenesi del Limone consta di un "vero" progenitore, il cedro, e di un altro ibrido, l'arancio amaro (*C. aurantium* L.) che risulta a sua volta essere ibrido di *C. maxima* L. x *C. reticulata* L. .

Il limone (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) è un albero sempreverde appartenente alla famiglia delle *Rutaceae*. L'albero, coltivato in numerose regioni subtropicali e temperate del mondo, si distingue per la sua capacità di produrre frutti durante tutto l'anno, grazie al fenomeno della *rifioritura*. Gli alberi di limone raggiungono solitamente altezze tra i 3 ed i 6 metri, con chioma globosa e irregolare. Il tronco è eretto, breve e molto ramificato, con ramuli spinosi e corteccia grigio-bruna liscia. Le foglie sono sempreverdi, alterne, largamente ellittiche, lunghe fino a 8-10 cm con margine seghettato e picciolo leggermente alato e con diversa colorazione che varia in base all'età e flusso vegetativo della pianta. I germogli presentano una iniziale colorazione tendente al rosso dovuta alla presenza di pigmenti violacei che si degradano durante l'accrescimento del germoglio, la consistenza delle foglie mature risulta essere coriacea e la colorazione della pagina superiore verde scuro, la pagina inferiore, invece risulta essere più chiara.

L'infiorescenza del limone, nota come *zagara*, è ermafrodita e si presenta generalmente con fiori solitari o in coppie, situati all'ascella delle foglie. La corolla è composta da cinque petali, bianchi all'interno e bordati di viola, con 30-40 stami saldati a tubo alla base. Il profumo dolciastro intenso è caratteristico e attrae i pronubi che ne favoriscono l'impollinazione entomofila.

La presenza di questo pigmento violaceo nel germoglio e nei petali è un carattere la cui assenza ha permesso di identificare un mutante, il *Femminello zagara bianca*.

Non è raro che in base a varietà ed andamento stagionale possa verificarsi la totale assenza dell'apparato riproduttivo femminile. In condizioni climatiche favorevoli i fiori sono prodotti tutto l'anno, ma con flussi principali di fioritura in primavera per la produzione di limoni invernali e in settembre per i cosiddetti *verdelli*.

L'*esperidio* può essere ovale oppure oblungo, con apici appuntiti detti *umboni* e vi è possibile distinguere l'esocarpo, che prende il nome di *flavedo*, liscio o leggermente rugoso,

in base a varietà e fruttificazioni, varia nel colore dal verde, quando il frutto è acerbo, al giallo brillante a piena maturazione, contiene numerose ghiandole oleifere che secernono oli essenziali aromatici, e il mesocarpo bianco e spugnoso che prende il nome di *albedo*. All'interno, l'endocarpo del frutto è suddiviso in *logge* per mezzo di sottili membrane al cui interno troviamo le *vescicole*, contenenti una soluzione acquosa di zuccheri e acidi. All'interno delle logge possiamo trovare un numero variabile tra 4 e 8 ovuli che possono originare altrettanti semi poliembrionici di cui uno originario della fecondazione e i restanti nucellari originatesi per apogamia e quindi con patrimonio genetico identico a quello della pianta madre. L'entità del fenomeno della poliembrionia varia tanto in relazione a fattori endogeni quanto a fattori esogeni.

Il limone predilige climi caldi e temperati, con buona esposizione alla luce solare, e cresce meglio in terreni ben drenati e leggermente acidi, con un pH compreso tra 5,5 e 6,5. È sensibile alle basse temperature e può subire danni se esposto a gelate prolungate.

1.3. La rifioritura

Il fenomeno della rifioritura, che può essere più o meno elevato tanto in base a fattori genetici quanto all'applicazione di pratiche agronomiche, risulta essere uno dei maggiori fattori di interesse nei confronti della coltura del limone. Diverse fruttificazioni originano altrettante tipologie di frutti qui di seguito brevemente elencati:

- a. Fioriture di fine marzo (precocissime) – “marzani” caratterizzati da umbone schiacciato. Raggiungono la piena maturazione a settembre
- b. Fioriture di aprile, maggio e giugno – “limoni primofiore”, “limoni invernali”. raggiungono la piena maturazione tra settembre e marzo.
- c. Fioriture di fine giugno e luglio – “bianchetti” e “maiolini” caratterizzati da buccia giallo chiaro. Raggiungono la piena maturazione tra aprile e maggio.
- d. Fioritura estiva che si protrae fino all'inizio dell'autunno – “verdelli” caratterizzati da buccia liscia dal verde intenso al giallo pallido, limitato numero di semi. Raggiungono la piena maturazione tra giugno e settembre dell'anno successivo.

Le diverse cultivar di limone vengono ad oggi selezionate in base a caratteristiche come adattabilità climatica, attitudine alla rifioritura e tolleranza nei confronti del *malsecco*, malattia fungina il cui agente è il *Plenodomus tracheiphilus*.

1.4. *Citrus limon* (L.) Burm. f. cv. *Femminello zagara bianca*

Come già accennato, la cultivar prende il nome dalla sua peculiare assenza di pigmenti violacei in germogli e petali dei fiori. Risulta essere caratterizzata da una spiccata rifiorenza e attitudine verdellifera; verdelli e bianchetti, infatti, rappresentano più del 50% della produzione annuale.

DISTRIBUZIONE DELLA PRODUZIONE *FEMMINELLO ZAGARA BIANCA* CV.

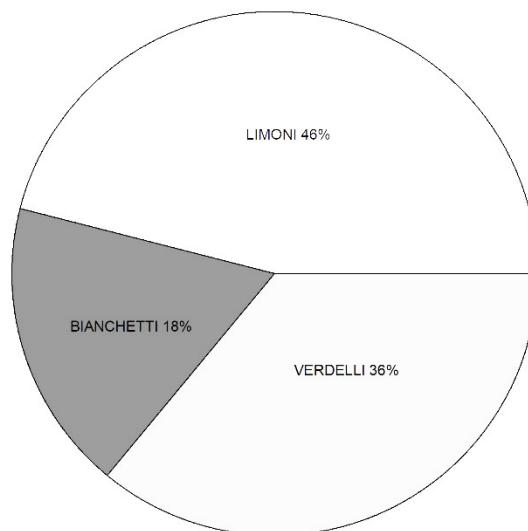


Fig.2 Distribuzione della produzione in piante della cv. *Femminello zagara bianca*

1.5. Portinnesto

La lista attuale dei portinnesti comprende sia varietà emerse naturalmente, in epoche passate o recenti, sia varietà ottenute mediante programmi di selezione mirati nell'ultimo secolo. Il principale vantaggio dell'uso di un portinnesto negli agrumi è la possibilità di uniformare la produzione. Per alcune varietà, come i mandarini, i portinnesti clonali sono l'unico modo per ottenere piante con la fruttificazione desiderata, poiché non crescono fedelmente su franco. Sebbene in teoria qualsiasi pianta sana di agrumi possa fungere da portinnesto, si usano di solito giovani piante di varietà selezionate. L'innesto riduce il tempo necessario per la fruttificazione, che avviene in 1-3 anni, rispetto ai 5 anni necessari per le piante da seme. Un'alternativa all'innesto è la propagazione tramite talee, che evita la fase giovanile senza portinnesto. La maggior parte degli alberi di agrumi viene coltivata per i frutti, e la scelta della marza si basa sulle caratteristiche desiderate per il consumo o il profitto. Tuttavia, molte delle varietà di agrumi più richieste non possiedono le migliori caratteristiche per la resistenza radicale, come la tolleranza alla salinità, a un pH elevato, alle inondazioni o la resistenza a malattie come *Phytophthora* spp, nematodi e *Candidatus liberibacter*. Anche condizioni climatiche estreme, come caldo, freddo o vento, possono danneggiare gli agrumi. Scegliere un portinnesto adeguato permette di ottimizzare la salute delle radici senza compromettere le caratteristiche del frutto. Ad esempio, l'arancio dolce (*Citrus sinensis*) è particolarmente sensibile alla *Phytophthora* spp., riportando così danni alla parte inferiore del tronco e all'apparato radicale, che spesso portano alla morte prematura dell'albero quando l'albero cresce su franco. Piantare varietà comuni autoradicate porta spesso a piante meno resistenti rispetto a quelle innestate su un portinnesto adeguato.

1.5.1. Portinnesto e suoi attributi

L'utilizzo di una cultivar selezionata appositamente per le eccellenti caratteristiche del tronco e delle radici può essere determinante per il successo della crescita e produzione degli alberi. Le qualità ideali del portinnesto variano in base all'ambiente, ai parassiti, alle malattie e alle pratiche di gestione adottate durante la vita dell'albero, fattori che possono mutare anche nello stesso luogo nel tempo. In questa sezione sono brevemente riportati alcuni dei tratti più importanti che caratterizzano un portinnesto.

- Ancoraggio: caratteristica fondamentale, lo è in particolar modo laddove eventi climatici estremi riguardanti i venti sono caratteristici.
- Compatibilità: La maggior parte dei portinnesti di agrumi è compatibile con le marze, ma ci sono delle eccezioni. Ad esempio, si sono riscontrate disaffinità tra alcune varietà come le arance dolci Roble, Pera e Shamouti, il Tangor Murcott e il limone

Eureka con portinnesti trifogliati come Swingle e altri ibridi (Garnsey *et al.*, 2001; Weathers *et al.*, 1955). Talvolta queste disaffinità emergono solo dopo diversi anni, quindi è importante essere prudenti nella scelta di nuove combinazioni di marza e portinnesto fino a quando non si avrà una maggiore esperienza d'uso. Questo fenomeno, noto come "crescita eccessiva", è particolarmente comune con portinnesti derivati da *P. trifoliata*. In casi estremi, una crescita eccessiva può indebolire l'unione dell'innesto o causare problemi fisiologici, ma una crescita moderata, come quella osservata con arancio dolce su *Carrizo* o *Swingle*, non sembra influire negativamente sulla forza dell'albero.

- Inondazioni o siccità: coltivati in molti areali caratterizzati da situazioni ambientali estreme, ad oggi i sistemi di gestione risultano essere focalizzati sulla razionalizzazione degli apporti irrigui con un occhio di riguardo alla mitigazione degli stress idrici. Sulla base della ricerca scientifica ad oggi condotta, *Citrus aurantium* e le selezioni di *Poncirus trifoliata* risultano essere tolleranti nei confronti dell'asfissia radicale e dagli effetti delle inondazioni, *Carrizo*, invece, risulta avere una buona tolleranza nei confronti della siccità (Zandalinas *et al.*, 2017).
- Macronutrienti, salinità e pH: sensibili alla salinità e del suolo e dell'acqua di irrigazione, in *Carrizo*, arancio trifogliato e swingle troviamo la maggior sensibilità alla salinità e all'elevata presenza di carbonio, soffrendo in particolare le carenze di macronutrienti, in particolare il Fe. La capacità di utilizzo e assorbimento dei nutrienti da parte dei diversi portinnesti è stata ampiamente testata, con particolare riguardo al Fe e ad oggi ancora difficilmente interpretate per quanto riguarda l'efficienza d'uso e i possibili casi di tossicità.
- Vigore: La dimensione degli alberi di agrumi è fortemente influenzata dal portinnesto. Ad esempio, il limone ruvido tende a produrre alberi altamente vigorosi, mentre l'arancio trifogliato Flying Dragon genera alberi con basso vigore. Si possono distinguere categorie ad alto (*Volkamer*), medio (*Carrizo* o *Swingle*) e basso vigore, anche detto *semidwarf* (Flying Dragon). Oltre al portinnesto, fattori come la varietà della marza, il tipo di suolo, le tecniche di gestione e le malattie influenzano la dimensione dell'albero. In generale, alberi con lo stesso portinnesto tendono a crescere in modo simile, indipendentemente dalla varietà della marza. Ad esempio, in uno studio in Florida condotto da Wutscher e Hill alberi di 18 anni di arancio dolce su portinnesto US-802 (alto vigore) erano alti 6,1 m, su Swingle (medio vigore) 4,5 m, e su US-897 (basso vigore) 2,7 m. Tuttavia, le pratiche di gestione e le malattie,

come il *Citrus Tristeza Virus* (CTV) o l'*Huanglongbing*, possono alterare l'influenza del portinnesto sulle dimensioni dell'albero.

- Resa e qualità dei frutti: Il portinnesto risulta avere grande impatto sulla resa e sulla qualità dei frutti. Questi effetti dipendono principalmente dall'adattamento del portinnesto alle condizioni di crescita e dalla sua tolleranza a malattie e fattori ambientali. In condizioni favorevoli, gli alberi più vigorosi tendono a produrre più frutti per albero. Poiché c'è una forte relazione tra la dimensione dell'albero e la resa per pianta, è importante considerare la grandezza dell'albero quando si valuta la resa per unità di superficie. Tuttavia, l'efficienza della resa e la densità di impianto devono essere ottimizzate per massimizzare la produzione per ettaro. La qualità del frutto dipende da vari fattori, come dimensione, forma, colore, resa in succo, solidi solubili totali e acidità, che variano in base alla marza e all'uso commerciale. Per l'arancia dolce comune destinata alla produzione di succo, i solidi solubili totali sono fondamentali, mentre per i pompelmi e i mandarini sono importanti anche dimensione, sapore e colore. In generale, *P. trifoliata* e i suoi ibridi, così come l'arancio amaro e *Carrizo*, migliorano la qualità del frutto, mentre il limone rugoso e il *Rangpur* hanno effetti meno favorevoli.

1.6. Citrange carrizo

Il *Carrizo* rappresenta un ibrido derivato dall'incrocio tra l'arancia "Washington Navel" e *Poncirus trifoliata*, risultato di un programma di selezione degli agrumi avviato dall'USDA nel 1909 a Riverside, in California. Sebbene *Carrizo* e *Troyer* siano frequentemente considerati identici, la realtà è che in molte località vengono mantenuti cloni distinti, e la questione della loro equivalenza rimane oggetto di dibattito tra gli esperti del settore (McCarty et al., 1974; Savage e Gardner, 1965).

Quando innestato con la maggior parte delle marze, *Carrizo* è in grado di garantire un'eccellente produzione già nei primi anni di vita degli alberi, e la qualità interna dei frutti è generalmente molto elevata, con dimensioni che variano da medie a grandi. *Carrizo* è un portinnesto vigoroso, capace di sviluppare alberi di dimensioni medio-grandi, in base alla cultivar della marza. Tuttavia, presenta alcune vulnerabilità: è particolarmente sensibile alla clorosi causata da alcali, e in determinate condizioni, gli alberi possono subire gravi danni a causa di carenze di ferro e altri micronutrienti, specialmente in terreni salini, calcarei o con pH particolarmente elevato.

Sebbene *Carrizo* tenda a tollerare livelli di acidità più elevati rispetto al limone su franco, questa caratteristica può, in alcune situazioni, causare problemi anche nelle varietà di *Valencia* e pompelmo, specialmente nelle zone di produzione più fresche. Al contrario, però, in regioni più calde, l'elevata acidità può essere vantaggiosa (Lee et al., 2009). In assenza di fattori limitanti per la crescita, come malattie, il *Carrizo* si dimostra un portinnesto eccellente per arance dolci, pompelmi e la maggior parte degli ibridi di mandarino.

I principali punti di forza del *Carrizo* includono una resistenza intermedia al marciume radicale causato da *Phytophthora* spp., una buona tolleranza ai nematodi e al virus del ring spot degli agrumi, oltre a una buona qualità interna dei frutti, un colore esterno che si sviluppa precocemente rispetto a quello del *Swingle* e una dimensione media dell'albero. Tuttavia, va notato che il *Carrizo* non è affine al limone *Eureka* e altri cloni simili. Nonostante ciò, il *Carrizo* rimane il portinnesto più utilizzato in diverse nazioni, tra cui Spagna, Sud Africa, Italia, Australia e California.

1.7. *Citrus volkameriana*

Il *Volkamer* (*Citrus volkameriana*) è considerato un ibrido tra mandarino e cedro, con origini che si rintracciano in Italia. Il nome limone "*Volkamer*" è stato attribuito in onore di JC *Volkamer*, un botanico tedesco del XVIII secolo (Saunt, 2000). Questo limone presenta molte similitudini con il limone innestato su franco, in particolare si osserva un marcato sviluppo vegetativo. Quando utilizzato in combinazione con selezioni di limone, *Volkamer* è spesso considerato una scelta eccellente per molte regioni, inclusa l'Africa meridionale, dove si adatta bene alle condizioni locali.

Tuttavia, è importante notare che il *Volkamer* è suscettibile al marciume radicale causato da *Phytophthora* spp. e ai danni derivanti dal freddo, sebbene mostri una leggera resistenza in più a entrambi questi problemi rispetto al limone grezzo. In Sud Africa, il portinnesto *Volkamer* è ritenuto particolarmente sensibile al virus del ring spot degli agrumi, ai nematodi degli agrumi e ha mostrato vulnerabilità alla peronospora degli agrumi in Florida. Nonostante queste limitazioni, il *Volkamer* si adatta a molteplici caratteristiche del suolo, inclusi terreni sabbiosi, situazioni con pH elevato e aree affette da salinità, dimostrando una certa versatilità.

In aggiunta, *Volkamer* non risulta sensibile a diversi viroidi che colpiscono gli agrumi, il che rappresenta un ulteriore vantaggio nella sua coltivazione. Il limone *Volkamer* si conferma un portinnesto di grande importanza in paesi come Messico, Repubblica Dominicana, Egitto e Israele, dove è ampiamente utilizzato con diverse marze di limone, contribuendo in modo significativo alla produzione agrumicola di queste regioni.

1.8. Strategie di irrigazione deficitaria

Il termine “deficit irrigation” (DI) appare per la prima volta agli inizi degli anni '70, ma solo nei primi anni '90 viene definito come “una strategia di ottimizzazione mediante la quale alle colture è inflitto di proposito un certo grado di carenza idrica e quindi di riduzione produttiva”, aprendo così la strada a una prospettiva di massimizzazione del profitto ed una riduzione della produzione. Tuttavia, l'applicazione della DI in contesti con evidente limitazione idrica si rivela essere una strategia valida (Ballester *et al.*, 2013).

Si distinguono tre tecniche di DI.

1. *Deficit Irrigation* (DI) propriamente detta: viene individuata una soglia di deficit costante applicata in tutte le fasi fenologiche.
2. *Regulated Deficit Irrigation* (RDI): deficit variabile applicato in base alle conoscenze relative alla coltura;
3. *Partial Root-Zone Drying* (PRD): divisione dell'apparato radicale in due porzioni adacquate alternativamente.

Sebbene la distinzione possa sembrare di facile intuibile applicazione, occorre rispondere a tre quesiti per l'applicazione della stessa e per la semplificazione. “Sotto quale soglia irrigare?” per la DI, “quando applicare il deficit?” per la RDI e “come applicare il deficit?” per la PRD (Capra, Consoli and Scicolone, 2008). Per una corretta ed organica comprensione delle tecniche di DI è necessario conoscerne i concetti cardine:

1. L'efficienza d'uso dell'acqua (WUE) diminuisce all'aumentare dei volumi somministrati
2. Il risparmio idrico dovuto alla riduzione dell'entità degli interventi irrigui rientra nell'economicità dell'azienda.
3. Se la disponibilità di suolo è limitata l'obiettivo coincide con la massimizzazione del reddito netto.

Ad oggi, la gestione sostenibile dell'irrigazione sembra essere una delle tematiche che ha più catturato l'attenzione tanto degli agricoltori tanto di operatori del settore e ricercatori, con l'elaborazione di sempre più accurate varietà di gestione delle tecniche di regulated deficit irrigation (RDI), puntando ad una gestione dell'intervento irriguo che possa essere dipendente da determinati stadi fenologici o da precise caratteristiche delle specie in esame per evitare il consumo di acqua. Pensando alla pianta come un sistema naturalmente fornito di biosensori in diretta comunicazione con l'ambiente attraverso la traspirazione, risulta ad

oggi possibile determinare facilmente lo stato idrico delle piante per l'ottimizzazione delle strategie irrigue.

Nel 1981, Chalmers et al., introducono il concetto di RDI, ad oggi impiegato in numerose produzioni vegetali, come una tecnica di controllo della crescita vegetativa per peschete ad alta densità (Chalmers, Mitchell and Heek, 1981). Nel 1990, English, (1990) definisce la RDI come una strategia di irrigazione applicata unicamente in alcune fasi del ciclo vegetativo della pianta e quindi imposto durante le fasi fenologiche che meno risentirebbero dello stress idrico evitando quindi le fasi di trapianto, semina, prime fasi di sviluppo e fecondazione fino, per le piante arboree ad allegagione e sviluppo dei frutti. La RDI è applicata con successo tanto sulle colture erbacee come barbabietole da zucchero, cotone, pomodoro e lattuga (Capra, Consoli and Scicolone, 2008) quanto sulle principali colture arboree da frutto come mandorlo, pistacchio, melo, albicocco, melograno, olivo, vite e, appunto, agrumi (Feres and Soriano, 2007; Santesteban, Miranda and Royo, 2011; Chenafi et al., 2016, 2016; Noguera-Artiaga et al., 2020; Andreu-Coll et al., 2024). L'impiego di strategie di RDI ha dimostrato avere vantaggi positivi sull'equilibrio vegeto-produttivo e sul miglioramento della WUE come rapporto sostanza secca prodotta/evapotraspirazione in seguito alla chiusura stomatica, senza però avere risvolti negativi sulla resa dei frutti in quanto il potenziale osmotico risulta essere inalterato.

1.9. La “forzatura” del limone

La *forzatura* del limone è una pratica tradizionale nella coltivazione del limone che viene effettuata mediante la sospensione di qualsiasi intervento irriguo durante la stagione estiva e fino al raggiungimento dell'accartocciamento fogliare. L'impiego di abbondanti turni irrigui e concimazione azotata, stimola così una abbondante fioritura estiva ed una raccolta di limoni l'anno successivo, che prendono il nome di “verdelli”. Il ricorso a tecniche di deficit idrico regolato (RDI) per la stimolazione e il controllo della fioritura, non è una innovazione strategica, bensì risulta essere stato già osservato, unitamente ai suoi effetti (Kaufmann, 1981; Pérez-Pérez et al., 2008; Hueso, Camacho and Gómez-del-Campo, 2021). Così, l'applicazione di un periodo di “*stretta*”, questo il termine che identifica l'intervallo temporale di applicazione della pratica agricola della forzatura, mediante sospensione degli apporti irrigui, si è configurata, nei secoli, come una pratica di enorme successo per gli agricoltori siciliani per l'ottenimento di una fruttificazione (verdelli) di enorme valore commerciale (Crescimanno et al., 1956).

Nel 1969, Monselise e Goren evidenziano come vi sia una certa ‘natura tropicale degli alberi di limone’, affermazione che trova ampio riscontro se pensiamo che lo stress idrico gioca

un ruolo importante nell'induzione a fiore del limone, a differenza degli alberi decidui in cui lo stimolo è principalmente termico. Basti pensare ad arance, mandarini e pompelmi che per indurre la dormienza prefioritura necessitano obbligatoriamente delle basse temperature invernali a differenza del limone, in cui il riposo invernale è necessario. La fioritura estiva, secondo Torrisi (1952), è strettamente correlata al periodo di ecodormienza all'inizio di gennaio e che nel caso della differenziazione fiorale a seguito dello stress idrico, è proprio quest'ultimo ad agire come stimolo per la formazione del fiore, la cui differenziazione è visibile a partire da 7-10 giorni prima dell'intervento irriguo che pone termine al periodo di stress. Proprio nella fase finale del periodo di stress è quindi possibile osservare un considerevole aumento della percentuale di gemme differenziate a fiore entro lo stadio di separazione dei sepali, organogenesi che viene completata in seguito supportata dalla ripresa dell'irrigazione. Il quadro ormonale così configurato vede nell'azione delle gibberelline (GAs) e nei loro antagonisti la chiave per la soppressione della fioritura estiva, dovuta all'alterazione della sintesi proteica all'interno delle gemme.

Sicuramente la forzatura e la sua applicazione modificano il calendario di fioritura annuale, con una cospicua produzione di verdelli che si aggira intorno al 40% della produzione totale (Fig.1) e una produzione di limoni delle varie fioriture che viene ridotta a circa il 60% della produzione totale con un aspetto non sempre convenzionale e dovuto alle differenti condizioni climatiche durante il loro sviluppo.

La conoscenza della pratica della forzatura è sicuramente limitata, e sebbene la sua storia affondi le radici in Egitto (Reuther, 1973), Spagna e Israele, viene ampiamente adottata unicamente in Sicilia. Fu Alfonso Spagna, nel 1867, ad osservare l'effetto di irregolari irrigazioni in un agrumeto abbandonato, seguito unicamente dal Chiar.mo Prof. Crescimanno dell'Istituto di Coltivazioni Arboree dell'Università di Palermo (Crescimanno *et al.*, 1956) che accuratamente attenzionò il fenomeno ed i suoi effetti sulle fruttificazioni. Barbera, Carimi e Leone (1988), hanno osservato successivamente che il potenziale idrico fogliare, all'alba, in piante stressate da circa un mese, con un contenuto idrico prossimo al punto di appassimento, è di circa -1.3 MPa. Un problema di grande importanza, negli anni, è risultato invece essere l'individualità dell'optimum di stress, in quanto ogni combinazione cultivar e portinnesto rappresenta un sistema a sé, difficilmente generalizzato. Un eccessivo stress potrebbe avere effetti negativi sulla vitalità e sull'equilibrio della pianta, a causa di una eccessiva abscissione fogliare o in seguito ad irreparabili danni all'apparato radicale.

Torrisi (1952), inoltre, osserva come la percentuale di fiori abortiti, il cui valore normale riporta essere il 20%, in piante forzate raggiunge il 60%, con una abscissione dei frutti,

osservata da Calabrese (1966), del 52%, valori non chiaramente sostenibili nell'ottica di una produzione di qualità e allo stesso tempo remunerativa. Riguardo la qualità, sarà lo stesso Calabrese (Calabrese and Di Marco, 1981) a osservare come frutti invernali, ovvero il primo flusso successivo all'applicazione della forzatura, riscontri un valore di resa in succo inferiore, ad oggi parametro cruciale e fondamentale per la commercializzazione, ed un ritardo di tre mesi nel raggiungimento della maturità commerciale.

Sono state numerose negli anni le soluzioni fornite per l'individuazione del miglior momento per interrompere la "secca", dal consumo idrico del 50% (Torrise, 1952), all'impiego del potenziale fogliare (Ψ_{leaf}) come parametro sufficiente per il monitoraggio (Barbera et al., 1979), ma nessuna di queste si è poi naturalmente trasformata in un modello facilmente adottabile dagli agricoltori. La ricerca scientifica in tal senso si è mossa attenzionando più il contenuto idrico del suolo che risulta però essere un indicatore parziale dello stato idrico della pianta, in quanto strettamente dipendente dalla tessitura del suolo e dagli effetti che questo ha sulla ritenzione idrica.

Viene riscontrata oggettività nei dati riscontrati all'analisi dell'apparato fogliare se si pensa che il fusto risulta essere uno dei migliori indicatori dello stato idrico della pianta e di come questa risponde allo stress idrico (Kramer 1988;).

Scholander et al. (1965) evidenziano come il potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}), attraverso una camera a pressione, possa essere valutato, anche se risulta ad oggi essere una tecnica che necessita di tempo e alta densità di lavoro non in grado di fornire informazioni e dati in tempo reale sullo stato idrico del fusto e le letture relative invece al potenziale idrico fogliare sono già risultate inefficaci per la programmazione degli interventi irrigui (Bates and Hall, 1981; Jones, 1985, 1990). Altre alternative in passato utilizzate per la stima del contenuto idrico delle piante sono l'utilizzo dell'evapotraspirazione della coltura (ET_c), ottenuto a partire dall'evapotraspirazione di riferimento (ET_0) e dal coefficiente culturale (K_c), e può essere stimato facilmente sulla base del metodo FAO-56 (Allen et al., 1998).

Come accennato precedentemente, l'anno successivo alla applicazione della *forzatura* vengono raccolti i "verdelli", facilmente riconoscibili per il loro epicarpo verde, spesso e rugoso, una forma rotondeggiante e dalla presenza di pochi semi, quasi nella totalità abortiti, caratteristiche tutte determinate dall'andamento climatico dei primi due mesi di sviluppo con le temperature elevate estive inibitorie del cambiamento di colorazione dal verde al giallo. L'attitudine alla rifioritura è comune alla quasi totalità delle cultivar di limone, ma alcune varietà risultano averne una più spiccata e prendono il nome di "*verdellifere*", anche se alcune varietà risultano originare prodotti con un inferiore valore qualitativo. In Sicilia la

cultivar maggiormente impiegata è la cv “*femminello*” e i suoi cloni, *Zagara bianca*, *Santa Teresa* e *Continella*, scarsa attitudine alla rifioritura è invece riscontrata nell’*Interdonato*.



Fig. 3: Frutti di limone (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) cv *Femminello Zagara Bianca* “verdello” della stagione 2023 del campo sperimentale del progetto di ricerca.

I limoni verdelli risultano essere una delle produzioni di maggiore spicco e interesse, con un prezzo medio in costante aumento nel mese di ottobre 2024 (ISMEA MERCATI, 2024), rappresentando ad oggi un importante prodotto legato all’agricoltura siciliana.



Fig. 4: Prezzo medio Limone Verdello Luglio – Ottobre 2024
Fonte:

1.10. La “forzatura” nel contesto delle strategie a deficit idrico controllato

Nell’ultimo decennio, i cambiamenti climatici hanno avuto un grande impatto sulle produzioni agricole e sulla gestione dell’agricoltura, tanto a causa del surriscaldamento globale, quanto a causa dell’aumento della popolazione mondiale.

Vi è quindi l’esigenza di trovare un nuovo e sostenibile approccio che sia tanto conservativo nei confronti del patrimonio culturale tanto delle risorse idriche, nel contesto del cambiamento climatico.

Nel caso del limone (*C. limon*), la tecnica della “forzatura”, trova nell’ottenimento dei “verdelli”, una delle produzioni con il più alto valore commerciale, frutti che nella biologia della fruttificazione del limone rappresentano una produzione, come già accennato, forzata e ottenibile unicamente a seguito della sospensione di qualsiasi apporto irriguo durante la stagione estiva, con un’epoca e una durata altamente variabili in base alla natura del terreno e all’andamento derivanti dalla fioritura estiva.

Un approccio quindi integrato delle tecniche agricole e genomiche e il ricorso ad una agricoltura 3.0 sono oggi, a livello mondiale, sfide che il mondo della ricerca si trova ad affrontare. Un approccio integrato risulta essere quindi la chiave per una gestione ecosostenibile e compatibile di gestione dell’agrumeto. L’individuazione di una soglia di deficit idrico controllato che permetta di ottenere la fioritura fuori stagione che origina i verdelli è una delle possibili soluzioni all’eccessivo stress idrico che garantisca di ottenere prodotti qualitativamente competitivi sul mercato senza influenzare le fioriture e le fruttificazioni successive.

In tal senso, la ricerca bibliografica è lacunosa, sebbene la ricerca su colture in regime di deficit idrico controllato (DIC) siano numerose, sulla pratica della *forzatura* in campo agricolo non sono presenti recenti lavori.

La disponibilità idrica per le colture agrarie risulta essere ad oggi un fattore limitante che sempre più porta ad un incremento nei costi di gestione e negli investimenti per l’incremento dell’efficienza d’uso dell’acqua. Sebbene la letteratura sia chiara sull’ottenimento di raccolte ottimali quando il contenuto idrico del suolo raggiunge livelli prossimi alla capacità di campo (FC) con livelli di acqua prontamente disponibili (RAW) ottimali, la teoria ad oggi non è più applicabile in tutti i casi o comunque laddove si opti per una gestione sostenibile delle risorse idriche, portando così allo sviluppo di approcci sostenibili limitanti dello sfruttamento della risorsa idrica e al perfezionamento della produttività dell’acqua.

È anche però un dato di fatto che le esigenze idriche variano tra le specie, rendendo la programmazione delle strategie irrigue sempre più complessa per gli agricoltori, così come è elevata la variabilità delle risposte che le specie danno alla siccità. In particolare, nel caso delle piante a ciclo C3, vengono distinti due ampi gruppi, quello delle piante con comportamento isoidrico e quello delle piante con comportamento anisoidrico che si distinguono proprio sulla base del comportamento stomatico in risposta alla siccità.

Le piante isoidriche tendono ad effettuare la chiusura stomatica durante i periodi di siccità per evitare la disidratazione e le cadute del potenziale fogliare (Ψ_{leaf}), riscontrando però effetti dannosi sugli scambi gassosi. Secondo Tardieu and Simonneau (1998), diminuisce la

fotosintesi. Al contrario, quando l'apporto idrico del suolo diminuisce, le piante anisoidriche mantengono gli stomi fogliari aperti per ottimizzare la fotoassimilazione e la traspirazione, consentendo una riduzione del potenziale idrico fogliare (Ψ_{leaf}). Altri processi in queste piante, includono aggiustamenti osmotici e, quando la siccità colpisce, le piante isoidriche spesso chiudono gli stomi per evitare la disidratazione e la diminuzione del potenziale idrico della foglia (Ψ_{leaf}); tuttavia, questo comportamento ha effetti dannosi sugli scambi gassosi e riduce la fotosintesi. La disponibilità di acqua nel suolo e la pressione del vapore atmosferico sono tra i numerosi fattori ambientali che influenzano l'apertura stomatica in condizioni di siccità (Pantin *et al.*, 2013). La sensibilità al deficit di pressione di vapore atmosferico (VPD) è una strategia primaria con cui le piante regolano gli scambi gassosi (Grossiord *et al.*, 2020). Un aumento della VPD o una riduzione del contenuto idrico del suolo porta a una diminuzione della conduttanza stomatica (g_s) o a una cascata del Ψ_{stem} , che diventa più ampia e duratura quando un'elevata richiesta di acqua atmosferica si combina con uno stress idrico del suolo (Pou *et al.*, 2012). Questa capacità delle piante di regolare la perdita di acqua per traspirazione e di minimizzare le fluttuazioni del potenziale idrico definisce le piante come isoidriche o anisoidriche (Dal Santo *et al.*, 2016). Le specie più isoidriche sono inclini al deficit del C, mentre quelle più anisoidriche hanno maggiori probabilità di morire per disseccamento. Ciononostante, l'esatto meccanismo fisico con cui conduttanza stomatica (g_s) e potenziale idrico sono coordinati è ad oggi rimasto oggetto di dibattito (Yang *et al.*, 2021) e successivamente affrontato nel presente lavoro di tesi, sebbene il comportamento isoidrico-anisoidrico e le sue implicazioni nella fotosintesi di diverse cultivar di vite (Hochberg *et al.*, 2013) e nella cinetica di apertura stomatica di altre specie legnose (Meinzer *et al.*, 2017) siano stati già ampiamente investigati.

Le peculiarità fisiologiche delle piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. sopra esposte e l'approfondita indagine delle relazioni ecofisiologiche e genetiche correlate alla fioritura e all'effetto dello stress indotto hanno però permesso di determinare delle soglie di stress idrico la cui tolleranza è risultata essere strettamente dipendente dall'influenza del portinnesto. Nella presente tesi verranno quindi esaminate le principali relazioni-reazioni e i risultati ottenuti quando il limoneto viene, in sostituzione della forzatura, sottoposto ad un DIC.

CAPITOLO 2. GLI EFFETTI DELLA “FORZATURA” SULLA QUALITÀ DEI FRUTTI DI *Citrus limon* (L.) Burm. f.

Sebbene sia stato generalmente riconosciuto che la disponibilità idrica influisce in modo significativo sulla crescita vegetativa delle piante, le relazioni precise tra l'acqua disponibile e i parametri di crescita non sono ancora state universalmente quantificate. Questa lacuna conoscitiva rappresenta un ostacolo per l'ottimizzazione delle strategie di gestione irrigua, fondamentali per massimizzare sia lo sviluppo vegetativo che la produttività delle colture. Analogamente, la necessità di un periodo di stress idrico controllato per stimolare la fioritura è considerata cruciale; tuttavia, non è stata ancora stabilita in modo scientificamente rigoroso la durata ideale e l'intensità ottimale di tale stress. Riguardo agli effetti della siccità sulla formazione, lo sviluppo e la conservazione di fiori e frutti, esistono solo conoscenze generiche, senza studi quantitativi sufficientemente dettagliati che colleghino tali effetti alle specifiche caratteristiche delle varietà coltivate. In particolare, rimangono poco esplorati i legami diretti tra stress idrico, parametri di crescita e rese produttive. In uno studio condotto su oltre 210 agrumeti selezionati in Iran, si è osservato che il rendimento medio ponderato del limone era di 21,7 tonnellate per ettaro. La produttività dell'acqua di irrigazione è stata stimata a 1,94 kg/m³, con possibili variazioni dipendenti dai sistemi di irrigazione, ad esempio nei sistemi a goccia rispetto a quelli di superficie, la resa dei frutti e la produttività dell'acqua sono aumentate rispettivamente del 43% e 89%, mentre il volume dell'acqua utilizzata è diminuito del 20% (Shahrokhnia *et al.*, 2022). Oltre all'aumento quantitativo della resa, una gestione ottimale dell'irrigazione determina anche miglioramenti qualitativi significativi. Tra questi si annoverano una maggiore consistenza, un sapore più intenso e un contenuto dei solidi solubili totali più elevato nei frutti, fattori determinanti per la soddisfazione dei consumatori e per migliorare la competitività dei prodotti sul mercato. La comprensione e la quantificazione dettagliata delle interazioni tra disponibilità idrica, stress controllato e parametri produttivi rimangono prioritarie per sviluppare strategie irrigue più efficaci, capaci di rispondere alle esigenze di produttività sostenibile e qualità del prodotto agricolo (Carr, 2012). Nelle condizioni tipiche del clima mediterraneo, la crescita delle colture non è significativamente limitata dalle radiazioni solari, ma piuttosto dall'acqua, che rappresenta il fattore principale di limitazione per lo sviluppo delle piante. In quest'ottica, diventa fondamentale adottare strategie mirate a ridurre il consumo idrico e aumentare l'efficienza nell'uso dell'acqua, promuovendo pratiche agricole sostenibili. Tra le tecniche che si sono dimostrate particolarmente efficaci vi è l'irrigazione deficitaria (DI), che consente di massimizzare la produttività dell'acqua disponibile stabilizzando i livelli di resa

anche in condizioni di risorse idriche limitate (García-Tejero et al., 2011b). Molti studi hanno evidenziato come la risposta degli agrumi all'applicazione del DI dipenda principalmente dal grado di stress idrico a cui la coltura è sottoposta in specifiche fasi fenologiche (Goldhamer e Salinas, 2000). Tra le varie strategie DI, l'irrigazione a deficit regolato (RDI) è quella maggiormente adottata per ottimizzare l'uso dell'acqua in numerose colture arboree sia da frutto che da legno. Questa pratica si basa sull'applicazione di stress idrico controllato in funzione dello stadio fenologico della pianta, considerando attentamente i periodi in cui l'evapotraspirazione raggiunge i massimi livelli come il periodo estivo e le fasi di fenologiche di crescita più critiche, durante le quali l'apporto idrico non dovrebbe essere limitato (Chalmers et al., 1986).

Gli effetti positivi di queste pratiche sono stati ampiamente documentati in numerose colture, ma la loro applicazione su larga scala è ancora in una fase iniziale. Persistono infatti diverse incertezze, tra cui la capacità di prevedere con precisione la resa delle colture in seguito all'applicazione di stress idrico in differenti momenti del ciclo di crescita. A tale proposito, Doorenbos e Kassam (1979) hanno sviluppato un'equazione per stimare la produttività delle colture in funzione dell'uso dell'acqua, basandosi sui lavori di Stewart et al. (1977). Questo modello si fonda sul fattore di proporzionalità K_Y , che lega la perdita di resa alla riduzione relativa dell'evapotraspirazione.

Inoltre, Doorenbos e Kassam (1979) hanno fornito valori di K_Y specifici per numerose colture, calcolati sia per singole fasi di crescita che per l'intera stagione produttiva. Questi dati costituiscono la base per lo sviluppo di modelli predittivi capaci di stimare le perdite di resa (Y_i) in condizioni di deficit idrico.

Un aspetto cruciale di queste modellazioni consiste nell'identificare i momenti più adatti per applicare il deficit idrico in relazione alla sensibilità delle colture nelle diverse fasi fenologiche. Jensen (1968) ha proposto un modello additivo per valutare gli effetti dell'irrigazione a deficit sulla resa, basandosi sulla traspirazione delle colture in ogni fase di crescita. Questo modello si fonda su relazioni lineari che legano la traspirazione delle piante alla riduzione della resa, con pendenze proporzionali all'intensità dello stress. La sua applicazione ha permesso di confrontare gli effetti del deficit idrico su colture diverse, evidenziando la possibilità di ottimizzare l'uso dell'acqua mantenendo livelli di produttività sostenibili.

Questi approcci rappresentano un passo importante verso una gestione più efficiente e razionale delle risorse idriche, ma richiedono ulteriori approfondimenti per integrare le variabili climatiche, le caratteristiche specifiche delle colture e le necessità di sostenibilità ambientale.

Uno degli aspetti più critici per l'applicazione corretta della tecnica della *forzatura* è individuare il livello ideale di stress idrico al quale riprendere l'irrigazione dopo il periodo di secca (ovvero l'intervallo tra un'irrigazione e l'altra). Se lo stress non raggiungesse livelli significativi, la risposta in termini di fioritura potrebbe risultare insufficiente. Al contrario, uno stress idrico eccessivo comporta conseguenze negative significative, come un'eccessiva filloptosi, danni al sistema radicale e una percentuale elevata di aborto floreale. Inoltre, i frutti derivanti dalla fioritura primaverile e quelli ancora presenti sugli alberi dalla fioritura estiva dell'anno precedente possono subire gravi danni a causa di un periodo di siccità prolungato. In particolare, la percentuale di distacco anticipato dei frutti invernali raggiunge valori molto alti, e la loro qualità può essere compromessa.

Per quanto riguarda gli effetti dello stress idrico sulle diverse colture di limoni, questo studio si propone di analizzare la relazione tra la durata del periodo secco e le risposte quantitative e qualitative degli alberi. Si raccomanda l'applicazione di livelli moderati di stress idrico, poiché un livello troppo elevato può causare una caduta significativa dei frutti derivanti dalla fioritura estiva dell'anno precedente, che stanno per giungere a maturazione. Questa caduta sembra essere legata alla senescenza dei tessuti e a disturbi vegetativi causati dalla competizione tra diversi organi di accumulo delle risorse, ma questa ipotesi necessita di ulteriori approfondimenti scientifici.

Un altro aspetto critico è la perdita d'acqua nei piccoli frutti invernali, che può indurre la loro caduta in condizioni di elevato stress idrico, con conseguente riduzione del raccolto finale. Questo fenomeno evidenzia l'importanza di bilanciare accuratamente i livelli di stress idrico per evitare perdite produttive significative e mantenere una buona qualità complessiva dei frutti. La comprensione più approfondita di questi meccanismi rappresenta un obiettivo fondamentale per migliorare ulteriormente l'efficacia e la sostenibilità della pratica della forzatura attraverso lo stress idrico.

Alla luce di tali considerazioni è stato quindi investigato l'effetto che la pratica della forzatura ha avuto su frutti invernali di limone, i cosiddetti *primofiore*, e l'effetto dei due portinnesti sulla qualità degli stessi, specchio della risposta allo stress idrico e di come la sua influenza può causare significative riduzioni o perdite in termini qualitativi.

The influence of water stress and two rootstocks on cv *Femminello Zagara Bianca* lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) fruit quality

E. Guccione^{1a}, A. Allegra¹, P. Inglese¹, P.J. Zapata², M.J. Giménez², F.P. Marra¹, G. Sortino¹

¹ Department of Agricultural, Food and Forest Sciences – University of Palermo, Viale delle Scienze, building 4, entrance H - 90128 Palermo, Italy. 90128, Italy.

² Department of Agri-Food Technology, EPSO, University Miguel Hernández, Ctra. Beniel km. 3.2, Alicante, Orihuela 03312, Spain.

Abstract

“Forzatura” is an ancient water stress management technique still practiced today by southern Italian growers who intend to exploit re-flowering that characterizes *Femminello Zagara Bianca* lemon fruit (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) to obtain an out-of-season flowering that originates “verdelli” fruiting, available during the summer season. However, “forzatura” turns out not to be respectful of the lemon plant causing a significant and rapid depletion of the plant resource which leads to a drastic reduction in the life of the lemon grove.

The aim of the present study was to investigate the effects of forcing on quality parameters of “primofiore” lemons of *Femminello Zagara bianca* trees grafted on two different rootstocks, *Citrus volkameriana* Pasc. and *Citrus sinensis* [L.] Osb. × *Poncirus trifoliata* [L.], comparing “forzatura” technique at 0% of field capacity (F), the effect of two irrigation strategies, 25% and 50% of field capacity (FC), and a control one (100% FC), which allowed the achievement of summer flowering without the suspension of irrigation by maintaining moderate stress values quantified with stem water potential (Ψ_{stem}), leaves chlorophyll content and nitrogen balance index (NBI). Results showed that the adoption of deficit irrigation strategies provided fruits with higher juice yield for *Carrizo* rootstock, while in terms of net production, fruit weight, polyphenol content and TSS/TA ratio, *C. volkameriana* rootstock had higher values. A lower green index, quantified by observing the parameter a^* , was proven to be higher in the two different irrigation strategies thesis, meaning that the degreening process was probably caused by drought.

Keywords: *Femminello Zagara Bianca*, *Citrus limon* (L.) Burm. f., *Citrango carrizo*, *Citrus volkameriana*, Forzatura technique, drought stress, deficit irrigation strategies post-harvest.

2.1. Introduction

“Forzatura” technique is an ancient agronomic practice that has its roots in the early 40s of the last century, giving rise to the so-called ‘verdelli’, which in the biology of lemon fruiting represent an out-of-season crop due to the suspension of irrigation in the summer months that

may last for about three weeks until the leaf crumpling is reached. Timing and application of water withdrawal period depend strictly on pedological, varietal and environmental parameters, the latter being decisive today in the context of climate change.

At the first symptoms of leaf crumpling, the abstention from irrigation ends and is followed by small irrigations at shorter intervals than in the previous period and by nitrogen fertilization with a prompt effect designed to promote a conspicuous flowering that will originate, in the following summer, “verdelli” lemons, with a high commercial value (Crescimanno et al., 1956). To date, the scientific production is limited to a few articles for the practice itself and almost nothing about the effects it has on subsequent fruiting; however, it is possible to assume that being extremely impoverishing, it may have an influence on subsequent productions, determining changes in production itself and in the main quality parameters of the fruits. The choice of a suitable rootstock is fundamental in citriculture, it is in fact well known that these have an effect not only on tree vigor and size, but also on yield, fruit dimension and numerous quality factors. Although, it is not clear how rootstocks exert their influence on the aforementioned parameters, but plant water relationships, mineral status and phytohormones were found to be among the major factors involved (Castle, 1995). The larger fruit size conferred by invigorating rootstocks is known to be inversely correlated with the accumulation of soluble solids and titratable acidity. Adapting strategies that are conservative towards the lemon grove is essential for the protection of citrus biodiversity and for prolonging plant life span. At the same time, however, the positioning of the product on the market and the guarantee for the consumer of a good that is available with the widest commercial window are as necessary as the response of the same to high quality standards. Thanks to the help of deficient irrigation strategies as an alternative to “forzatura”, it was possible to achieve summer flowering without the total suspension of irrigation inputs, maintaining moderate levels of water stress quantified through the measurement of stem water potential (Ψ_{stem}), leaves chlorophyll content and nitrogen balance index (NBI). Ψ_{stem} is in fact a fundamental indicator for the correct planning of irrigation interventions (Naor, 2000) and the decrease in leaves chlorophyll content caused by the reduction of photosynthetic efficiency a further symptom of stress in plants. It is well known that water stress or the total absence of water damage the photosynthetic apparatus causing a reduction in the chlorophyll content (Zhang et al., 2018) since chlorophyll and carotenoids are closely linked to stress tolerance in plants (Baker and Rosenqvist, 2004).

On the basis of these considerations, the aim of the present experiment was to study the combined effect of rootstock genotype and two different controlled water deficit

regimes, on crop yield and quality of winter ‘Primofiore’ lemon fruits *Citrus limon* (L.) Burm. f. of *Femminello Zagara Bianca*.

2.2 Materials and methods

The experiment was carried out in 2023 at the experimental fields of the Università degli Studi di Palermo (Italy) on 160 three-year-old potted lemon trees *Citrus limon* (L.) Burm. f. of *Femminello Zagara Bianca* grafted onto *Citrus volkameriana* Pasc. (*Volkamer*), a natural hybrid of mandarin × citron of Italian origin proven to be adaptable to various soil types, including sandy soils with high pH values, and that exhibits tolerance to high salinity also facilitating rapid growth of the scion and ensuring high and early yields (Ziogas *et al.*, 2023), and *Citrus sinensis* [L.] Osb. × *Poncirus trifoliata* [L.] (*Carrizo*), widely used in lemon growing, with small and deciduous dimensions but with fruits with excellent quality characteristics. Irrigation treatments applied during 2023 season, from 200 to 255 (Julian days), i.e. water regimes were: 0(F), 25% (25) and 50% (50) of the field capacity, plus a control sample at 100% of the field capacity (CTR). Soil was a sandy loam, with 13% silt, clay 10% and sand 77%. Soil water content was measured throughout the experiment (DOY 200 – 255 of 2023) with Waterscout SM100 and WatchDog series 1650 dataloggers (Spectrum Technologies USA Inc., Bridgend, UK). Plant growth in terms of trunk cross sectional diameter at 15 cm, current-year shoot length and leaf area index (LAI) were measured before and during the experiment (data not shown). Midday stem water potential was measured on 6 trees per treatment per rootstock (n=48) through a Scholander pressure chamber (PMS Instrument Co., Albany USA). Values were expressed in MPa. Leaves were covered with aluminum foil one hour prior to the analysis for stem water potential balance. ‘Primofiore’ crop yield per tree was measured at harvest time, which occurred during the first ten days of January. Twenty-five ‘Primofiore’ fruit were harvested manually from 30 trees for each treatment (n=200) rootstock × water regime). Fruit were then sanitized by dipping in chlorinated water (100 ppm of free chlorine) for 360 seconds. All cutting surfaces have been disinfected to avoid possible contamination. The following parameters were measured and determined: fruit weight; juice yield expressed as percentage of fresh weight with the following equation: % juice content = (JM/FM) × 100, (JM: juice mass (g), and FM: fruit mass (g)); , total soluble solids (TSS) measured by digital refractometer (Atago Palette PR-32 - Tokyo, Japan) and expressed in °Brix; pH and titratable acidity (TA) of the juice determined with an automatic titrator (Crison Instrument, Titromatic 8653, Spain) by titrating with 0.1M NaOH to an endpoint of pH 8.2 and expressed as a percentage of citric acid; total polyphenol content (TPC) measured in duplicate in each

sample of flavedo by using the Folin-Ciocalteu reagent as previously reported by Giménez *et al.* (2023). Results were expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE) 100 g⁻¹ FW; Peel color, measured with a portable colorimeter (Minolta CR 400 HEAD, Minolta, Osaka, Japan), equipped with an 8-mm measuring head and a C illuminant (6774 K), was used and CIELab coordinates expressed as *a** index. The instrument was calibrated using the manufacturer's standard white plate. Three measurements were made in the equatorial region of each of the fruit. Chlorophyll leaves content and nitrogen balance index (chlorophyll and flavonoids foliar ratio) were measured with the Dualex 4 scientific optical leaf clip meter (Dx4, FORCE-A, Orsay, France) and expressed as Dualex units.

2.2.1. Statistical analysis

The experimental design consisted of 8 treatments (2 rootstocks x 4 water regimes) and one control. 25 fruits per treatment were used as single replicates. Analysis of variance was applied (Systat 13.0 for Windows was used as statistical software). Significance of data ($p \leq 0.05$) was evaluated with Tukey's test.

2.3. Results and discussions

2.3.1. Physiological essays

Stem water potential is one of the most investigated parameters to certify the actual level of stress of a fruit tree crop, correlating the values that the phenological manifestations of the plants can therefore provide the basis for bringing a practice such as ‘forzatura’ back into the context of precision agriculture. Differences Ψ_{stem} (data not shown) between the two rootstocks were significant; *Carrizo* rootstock, in fact, turned out to have a greater resistance to water stress demonstrated by the higher values of Ψ_{stem} in correspondence of leaf crumpling, when the period of suspension of irrigation is interrupted, values were in fact -3.7MPa for lemon trees grafted on *Carrizo*, against the value of -2.8 MPa reached by lemon trees grafted on *C. Volkameriana*. The drought resistance of rootstocks of the genus citrus is highly variable between the different species (Syvertsen and Levy, 2005) and, in particular, resistant rootstocks are found to have a higher efficiency of their antioxidant system (Zandalinas *et al.*, 2017). The trend in the total leaves chlorophyll content (CHL) is generally decreasing compared to control values during sampling days and significant differences are found between the two rootstocks. At the end of the analyses, in fact, CHL content of the lemon trees grafted on *Volkamer* is lower when compared to the samples grafted on *Carrizo*, a trend that is found in all these with average values of 30.97 and 25 Dualex units for the

CTR thesis of *Carrizo* and *Volkamer*, respectively. Water stress is in fact one of the abiotic factors that have the greatest impact on the growth, development and production of citrus plants and plants can therefore show different and conflicting abilities in the ability to tolerate drought. The decrease in CHL, in fact, is a symptom generally related to oxidative stress in conditions of water scarcity that occurs due to its degradation and phosphoxidation. A similar trend is also confirmed by the NBI analysis, given by the relationship between CHL leaves content and flavonoid (FLV) leaves content of plants; Flavonoids, in fact, products of secondary metabolism, have been shown to be stimulated in their accumulation following conditions of water stress (Ma *et al.*, 2014), thus being able to act as an early detection signal for the activation of their metabolism, which has fundamental functions not only in the growth and development of plants, but also in the defense against stress. CTR values of both rootstocks are in fact always significantly lower than the values of the stressed thesis. In *Carrizo* rootstock for example, the value of the CTR samples is on average 24 Dulaex units during the entire summer period of analysis (JD 199-DOY 255) and the thesis F, at the point of maximum withering with Ψ_{stem} equal to -3.7 Mpa reports an NBI value equal to 36.31 Dualex units. Significant but less conspicuous differences are reported by *C. Volkameriana* rootstock, with a value of 34.62 Dualex units in correspondence of the highest value of Ψ_{stem} , compared to 31.00 Dualex units of CTR on the same day of survey.

2.3.2. Fruit weight and net production

Production and quality of citrus fruits are two aspects strongly influenced by climatic conditions and orchard management; vegetative growth and production are in fact extremely competitive with each other for available resources such as carbohydrates and mineral nutrients and the inductive effects of water stress have been investigated in citrus species such as sweet orange and lime. The degree of induction was therefore found to be proportional to the severity and duration of the stress (Southwick and Davenport, 1986). Degree and persistence of the stress condition have been seen to affect the availability and carbon partitioning for tree growth and yield in terms of production and fruit weight. 25 and 50 irrigation regimes showed higher values in terms of average weight and net production when compared to CTR and F with an average intra-rootstock difference of around 35 grams (Tab. 1). In *Carrizo* grafted trees, no significant differences were found in terms of average fruit weight between CTR and F thesis and between 25 and 50 irrigation regimes. In *C. Volkameriana* grafted trees, the highest weight mean value was in 25 irrigation regime, suggesting that this effect is due to the greater susceptibility of the same to water stress. The

net production per tree and the average weight of the fruits are two extremely related factors that show the same trend, highlighting and confirming the significant differences between the two rootstocks ($R^2 = 0.995$). The production of medium-sized fruits is indeed a positive factor in the market as they are more visually pleasing and have a higher commercial value. *C. Volkameriana* grafting was found to be the best in terms of average fruit weight (Al-Jaleel, Zekri and Hammam, 2005; Georgiou, 2009). The average production values per tree, considering the young age of the plant and the conspicuous differences in biometric terms, were once again found to be influenced by the rootstock effect. In *Carrizo* rootstock there were no significant differences between CTR and F irrigation regimes, which were significantly different from both the 25 and 50 irrigation regimes, which was the highest average value recorded. The highest values of net production per tree were found in lemon trees grafted on *C. Volkameriana* rootstock, which showed significant differences in all these with a net production per tree in the CTR samples. The highest values was recorded in 25 irrigation regime with a net production of almost 5 kg/tree, followed by 50 and F irrigation regimes, the latter showing the lowest net production. Those results therefore suggest that vigorous rootstocks develop more extensive root systems with greater water use efficiency.

Table 1 Crop yield (kg/tree) and average fruit weight (g) of “Primofiore” *Citrus limon* (L.) Burm. f. fruits grafted on *Volkamer* and *Carrizo* rootstocks grown, from 200 to 255 JD, under three different irrigation regimes, 25% of field capacity (FC), 50% FC and no irrigation (“forzatura”) (F). Control (CTR) samples were maintained at 100% FC during summer. At each sampling date, different capital letters indicate significant differences between rootstocks, different lowercase letters indicate substantial changes between water regimes at Tukey's test ($p \leq 0.05$). Data are mean \pm S.E. (n = 25 for fruit and 30 trees for crop yield).

ROOTSTOCK	THESIS	CROP YIELD (kg/tree)	FRUIT WEIGHT (g)
<i>VOLKAMER</i>	CTR	1.35 \pm 0.01 Aa	150.21 \pm 0.10 Ab
	25	1.43 \pm 0.05 Ab	160.02 \pm 0.30 Aa
	50	1.25 \pm 0.02 Ab	145.09 \pm 0.10 Ac
	F	1.10 \pm 0.06 Ac	138.7 \pm 0.20 Ad
<i>CARRIZO</i>	CTR	1.06 \pm 0.04 Bc	117.54 \pm 0.09 Bb
	25	1.10 \pm 0.03 Ab	121.67 \pm 0.04 Ba
	50	1.31 \pm 0.05 Aa	121.86 \pm 0.20 Ba
	F	1.05 \pm 0.01 Bc	117.14 \pm 0.15 Bb

2.3.3. Juice yield and characterization

Juice yield defines the marketability of lemon fruit, and it is set at 21% of fresh weight. Values close to 40% were recorded on *Carrizo* at thesis 25 irrigation regimes, (Tab. 2). The

same trend has been observed on the *Volkamer* rootstock, although the values are generally significantly lower (6%) than *Carrizo* rootstock. These results therefore confirm what has been observed about the yield in juice of “Eureka” lemons grafted onto *Volkamer* by Al-Jaleel, Zekri and Hammam (2005), laying the groundwork for the use of alternative water regimes to exploit the potential of *Carrizo*, as already noted in 'Moro' Blood Oranges by Incesu *et al.*, (2013). Rootstock significantly influenced TSS; indeed, *Carrizo* showed higher values than *Volkamer* in all irrigation regimes. No significant differences were found in-between the irrigation regimes in *Volkamer* trees, while the irrigation regime accounted for significant differences in *Carrizo* grafted trees. TSS is a parameter that should not be overlooked since it contributes significantly to the quality of the fruit (Al-Jaleel, Zekri and Hammam, 2005). Also, in the case of the TA analysis, significant differences were found in rootstocks, a decrease in values was in fact observed when comparing the two. The highest values were observed in both rootstocks with the CTR treatment and in *Volkamer* grafted trees there were no significant differences with 25 and 50 irrigation regimes, while thesis F recorded a value more than half lower than CTR. The same trend was observed in *Carrizo* rootstock, whose values are, in all theses, 2% higher than in *Volkamer*. The trees of all the tested theses, in both the rootstocks investigated, produced fruits that have similar TSS/TA ratio values, showing no significant differences except in the F thesis grafted on *Volkamer*, which reports a value twice as high as the other treatments both within the same rootstock and when compared with *Carrizo*. Obtained results showed that vigorous lemon rootstocks produce fruits with a lower content of TSS and TA.

Table 2 Juice yield (%), TSS (°Brix), TA (%), pH and TSSA/TA ratio of “Primofiore” *Citrus limon* (L.) Burm. f. fruits grafted on *Volkamer* and *Carrizo* rootstocks grown under three different irrigation regimes, 25% of field capacity (FC), 50% FC and no irrigation (“forzatura”) (F). Control (CTR) samples were maintained at 100% FC during summer. At each sampling date, different capital letters indicate significant differences between rootstocks, different lowercase letters indicate substantial changes between treatments. At each sampling date, letters ns indicate no change between treatments. $p \leq 0.05$ was used in Tukey's test. Data are given as mean \pm S.E. (n = 75).

ROOTSTOCK	THESIS	JUICE YIELD (%)	TSS (°BRIX)	TA (%)	pH	TSS/TA RATIO
<i>VOLKAMER</i>	CTR	22.70 \pm 0.10 Bc	7.57 \pm 0.01 Bb	5.12 \pm 0.07 Ba	2.50 \pm 0.01 Bb	1.47 \pm 0.03 Bb
	25	32.04 \pm 0.06 Ba	7.67 \pm 0.06 Bb	4.71 \pm 0.01 Ab	2.48 \pm 0.08 Bb	1.62 \pm 0.03 Bb
	50	21.92 \pm 0.05 Bc	7.67 \pm 0.03 Bb	4.41 \pm 0.03 Bb	2.93 \pm 0.04 Bb	1.71 \pm 0.01 Bb
	F	25.93 \pm 0.07 Bb	8.13 \pm 0.03 Ba	2.21 \pm 0.07 Bc	3.44 \pm 0.02 Aa	3.67 \pm 0.06 Aa
<i>CARRIZO</i>	CTR	28.36 \pm 0.01 Ac	8.77 \pm 0.01 Ab	7.27 \pm 0.06 Aa	2.97 \pm 0.03 Bb	1.2 \pm 0.05 Ba
	25	39.84 \pm 0.08 Aa	8.57 \pm 0.04 Ac	5.56 \pm 0.05 Ad	2.44 \pm 0.07 Bb	1.87 \pm 0.03 Ba
	50	24.51 \pm 0.04 Ad	8.60 \pm 0.03 Ac	5.58 \pm 0.04 Ac	3.33 \pm 0.06 Aa	1.53 \pm 0.02 Ba
	F	33.92 \pm 0.02 Ab	8.90 \pm 0.01 Aa	4.33 \pm 0.06 Ab	3.38 \pm 0.01 Aa	1.4 \pm 0.01 Ba

2.3.4. Total polyphenol content

Polyphenol content analysis showed that rootstock has an influence on TPC in lemon fruits. In addition, there were significant differences between treatments. Compared to CTR samples, the fully stressed thesis F and the two controlled water deficit theses 25 and 50, show an increase in both rootstocks. *Volkamer* grafted trees had fruits that were found to have a higher content in forced thesis F (309.79 GAE 100 g⁻¹ FW.), results that confirm what was observed by Ziogas *et al.*, (2023), followed by theses 25 and 50, which are not significantly different from each other. The results therefore suggest that phenolic content varies not only according to the variety and its genetic profile (Chen *et al.*, 2021) but also based on the effects induced by the rootstock. These effects are then amplified when particular agronomical practices are adopted, such as in this case the total suspension of irrigation inputs or the adoption of deficit irrigation regimes.

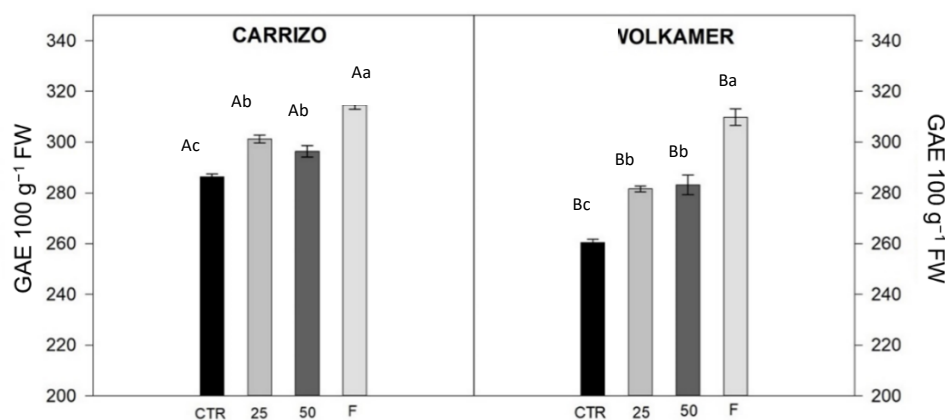


Figure 1 Total polyphenol content (TPC) gallic acid equivalent (GAE) 100 g⁻¹ FW of “Primofiore” *Citrus limon* (L.) Burm. f. fruits grafted on *Volkamer* and *Carrizo* rootstocks grown under three different irrigation regimes, 25% of field capacity (FC), 50% FC and no irrigation (“forzatura”) (F). Control (CTR) samples were maintained at 100% FC during summer. At each sampling date, different capital letters indicate significant differences between rootstocks, different lowercase letters indicate substantial changes between treatments. At each sampling date, letters ns indicate no change between treatments. $p \leq 0.05$ was used in Tukey's test. Data are given as mean \pm S.E. (n = 75).

2.3.5. Color

The colorimetric coordinate a^* was then studied, the greenness can in fact be measured as the loss of a^* itself. The degreening process, which is essential for the marketing of the product, takes place only in the presence of temperatures whose daily average is equal to or lower than 10.5°C (Brotons *et al.*, 2013), climatic trend that was not registered during winter fruiting and until harvest and which allows the degradation of chlorophyll and the synthesis of carotenes (Sinclair, 1984). The degradation of chlorophyll therefore allows the previous and masked carotenoids already present in the lemon to appear giving the yellow color, and it is precisely for this reason that it may be sufficient to observe the colorimetric parameter a^* to quantify the degree of chlorophyll degradation. No significant differences were found between rootstocks and it emerged that CTR fruits were found to have the highest values, the best performance was recorded in the samples of thesis 25, in both rootstocks, with a value of a lower, respectively -4.36 in *Volkamer* and -3.16 in *Carrizo*. This result suggests that small and constant irrigation inputs that do not cause high degrees of stress in the plant can be effective in speeding up the degradation of chlorophyll even when the right climatic requirements are not present.

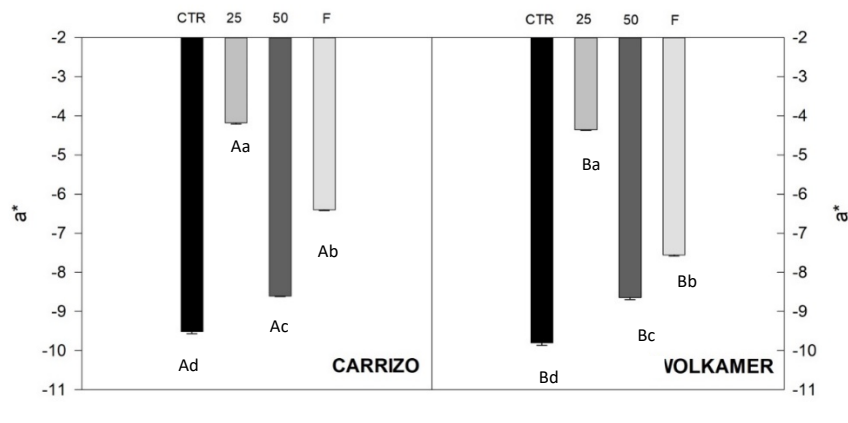


Figure 2 a* values of “Primofiore” *Citrus limon* (L.) Burm. f. fruits grafted on *Volkamer* and *Carrizo* rootstocks grown under three different irrigation regimes, 25% of field capacity (FC), 50% FC and no irrigation (“forzatura”) (F). Control (CTR) samples were maintained at 100% FC during summer. At each sampling date, different capital letters indicate significant differences between rootstocks, different lowercase letters indicate substantial changes between treatments. At each sampling date, letters ns indicate no change between treatments. $p \leq 0.05$ was used in Tukey's test. Data are given as mean \pm S.E. (n = 75).

2.4. Conclusions

In conclusion, the present study lays the foundations for the adoption of alternative strategies for obtaining off-season production that have a high market value such as ‘verdelli’, with no reduction of fruit and allowing, in some cases, also the improvement of some quality parameters of fundamental importance such as the solid soluble content, titratable acidity and their ratio. Results showed that the adoption of different water stress strategies provided fruits with higher juice yield for *Carrizo* rootstock, while in terms of net production, fruit weight, polyphenol content and TSS/TA ratio, *Volkamer* rootstock had higher values. On colorimetric index a*, a lower green index was found in the two different irrigation strategies thesis 25 and 50, meaning that the degreening process could possibly be accelerated by the presence of moderate but more prolonged water stress that did not significantly affects the physiological profile of lemon trees. The influence of rootstock is consistent, and the aim of future studies will be to identify which best graft/rootstock combination lends itself to the application of regulate deficit irrigation strategies.

CAPITOLO 3. GLI EFFETTI DELLA “FORZATURA” SU DUE DIVERSI PORTINNESTI.

La scelta del portinnesto, come è noto, è una scelta cruciale, ancor più quando si tratta di specie appartenenti al genere *Citrus*, la cui annosa problematica legata al CTV, *Closterovirus* vettore della *tristeza degli agrumi*, risulta essere ad oggi la più grande sfida che gli agrumicoltori sono costretti ad affrontare.

Il quadro sintomatico prevede riduzione di sviluppo, spiccata filloptosi e disseccamento dei rami e la presenza sottocorticale di profonde scanalature longitudinali. Su piante innestate può essere notato uno sviluppo maggiore del nesto rispetto al portinnesto e infine, la morte della pianta. I principali vettori sono afidi come il *Toxoptera citricida*, insetto con capacità di trasmissione del virus cinque volte superiore rispetto agli altri afidi presenti nella regione mediterranea. Il virus può essere facilmente diffuso con materiale di propagazione infetto e con un rischio aggravato dalle importazioni illegali di agrumi infetti, spesso introdotti prima della fine del periodo di quarantena.

La malattia, originaria del sud-est asiatico, si è diffusa rapidamente in diverse aree del mondo, provocando gravi epidemie in Argentina, Venezuela, Brasile e Florida. Ha causato la perdita di oltre 70 milioni di piante di agrumi, di cui 40 milioni concentrate tra Cipro, Israele e Spagna, i tre paesi del bacino del Mediterraneo maggiormente colpiti dalla *tristeza*. Tuttavia, il virus ha colpito anche altri paesi mediterranei, come Tunisia, Turchia, Marocco e Malta. In Italia, la *Tristeza* è stata segnalata per la prima volta nel 1956, probabilmente introdotta dalla Spagna. Per decenni, tuttavia, i focolai sono rimasti sporadici e di limitata entità. Negli ultimi anni, invece, la diffusione del virus ha subito una significativa accelerazione anche nel nostro territorio. Il virus colpisce in modo molto più aggressivo le piante innestate su arancio amaro, che costituiscono la maggior parte delle coltivazioni mediterranee, incluse quelle italiane. Risultano invece più resistenti altre specie, come mandarino *Cleopatra*, limone rugoso, pummelo, arancio trifogliato e citrange.

A livello comunitario, la normativa è regolata dalla direttiva 2000/29, recepita in Italia con il decreto legislativo 214/2005, ma a livello nazionale l'ultimo intervento risale al 1996. Questo provvedimento prevede l'abbattimento dell'intero agrumeto se le infezioni superano il 30% delle piante, dato che non esistono insetticidi efficaci contro gli afidi vettori del CTV.

Il virus, con elevato tasso di mutazione, può essere identificato tramite tecnologie avanzate di analisi e sequenziamento per identificare rapidamente i profili genetici.

Altra problematica connessa all'agrumicoltura risulta essere il *Mal secco degli agrumi*, malattia fungina trasmessa dal *Plenodomus tracheiphilus*, fungo che attacca principalmente limone, cedro e bergamotto. La malattia si diffonde principalmente attraverso i conidi, spore che riescono a penetrare nella pianta sfruttando ferite presenti sui tessuti. Questo processo avviene con maggiore frequenza nei mesi tra ottobre e febbraio, quando l'umidità e le piogge creano le condizioni ideali per la propagazione del fungo. Una volta entrato nella pianta, il fungo si insedia nei vasi legnosi, causando la cosiddetta sindrome delle tracheomicosi. I primi segnali dell'infezione si notano sulle foglie apicali, che iniziano a perdere colore, assumendo una tonalità più chiara o giallastra, soprattutto lungo le nervature. Con il tempo, le foglie iniziano a cadere e i rametti si disseccano progressivamente. Se l'infezione interessa principalmente la parte superiore della pianta, il decorso può essere lento, ma spesso si osserva l'emissione di numerosi polloni. Tuttavia, quando il fungo attacca direttamente le radici, la malattia evolve molto più rapidamente, portando alla morte della pianta in breve tempo. Un segno caratteristico della presenza del fungo è la colorazione salmone del legno infetto, che ne facilita il riconoscimento. Nel frattempo, la pianta comincia a mostrare segni di avvizzimento, con le parti apicali che si defogliano gradualmente. In alcuni casi, l'infezione può avere un decorso fulminante, con la morte improvvisa della pianta. Per contrastare questa malattia, è fondamentale adottare alcune misure preventive e di controllo. Prima di tutto, è necessario estirpare le ceppaie delle piante infette per evitare che diventino un focolaio di propagazione. Anche i rami colpiti devono essere eliminati e bruciati, tagliandoli almeno 30 centimetri sotto la parte secca. Durante queste operazioni, è importante disinfettare gli attrezzi utilizzati e proteggere le superfici di taglio con mastici appositi. Un'altra precauzione utile è evitare di lavorare il terreno nei mesi più a rischio, da metà autunno fino a primavera inoltrata, per non favorire la diffusione del fungo. Nei periodi critici, come l'autunno e l'inverno, è consigliabile proteggere il limoneto con coperture adeguate, come reti o incannucciati, per ridurre i danni causati da eventi atmosferici come grandinate o gelate, che possono aumentare la vulnerabilità delle piante. Le operazioni di potatura, invece, dovrebbero essere programmate per la tarda primavera, quando il rischio di infezione è più basso. Durante la potatura, è utile anche eliminare i polloni che si sviluppano al di sotto del punto d'innesto, poiché possono indebolire ulteriormente la pianta. Infine, è importante evitare eccessi di concimazioni azotate, che potrebbero favorire indirettamente l'insorgere della malattia. Seguendo queste precauzioni, è possibile limitare i danni provocati dalla malattia e garantire una maggiore salute e produttività delle piante di limone, preservando al tempo stesso l'equilibrio del limoneto.

Considerate queste due minacce, l'induzione di un ulteriore stress, in questo caso quello idrico causato dalla forzatura, aumenta la suscettibilità della pianta. Sebbene infatti vi siano dei portinnesti resistenti, gli stessi rispondono diversamente alla tecnica agronomica della *forzatura* causando perdite e variazioni quali-quantitative della produzione. In questo capitolo verranno investigati gli effetti della forzatura sul sistema pianta e le prospettive future tenendo conto della migliore combinazione nastro-portinnesto.

3.1. Disegno sperimentale

La produzione bibliografica, limitata a pochi articoli, ha fino ad ora fornito semplicemente un indirizzo sui principi alla base della forzatura senza però fornire un protocollo che sia replicabile e di facile comprensione anche agli operatori del settore.

L'individuazione di corrette strategie per la gestione della *forzatura* può consentire, in futuro, un aumento della competitività delle produzioni attraverso la valorizzazione della coltivazione del limone quale risorsa economica dell'Italia meridionale, e più in particolare della Sicilia. In Italia, infatti, la coltura del limone interessa circa 26.000 ha, di questi 23.200 ha sono presenti in Sicilia (ISTAT, 2020). Le proprietà salutistiche del limone sono state da lungo tempo ormai note ed è altamente ricco in composti bioattivi, tra i quali polifenoli, micronutrienti e vitamine, acidi organici, sali minerali e oli essenziali: (Benavente-García and Castillo, 2008; Del Río et al., 2004; Di Vaio et al., 2010). Al sud Italia le principali cultivar sono rappresentate da *Femminello*, *Monachello*, *Interdonato*, *Lunario* e *Lemox*. La cultivar oggetto del presente progetto di ricerca è il *Femminello*, in particolare la selezione *zagara bianca*, mutante caratterizzato dalla presenza di fiori bianchi simili all'arancio e non violacei come in tutti gli altri limoni. Diversi studi hanno inoltre evidenziato come metà della sua produzione sia da attribuire a bianchetti e verdelli. Noto per la sua plasticità di adattamento, è una cultivar-policlonale che costituisce la base varietale della limonicoltura italiana, (80% della superficie investite) e costituisce inoltre la base varietale della IGP "limone di Siracusa". Grazie alla sua spiccata *rifiorenza*, inoltre, è quella che meglio si presta all'applicazione della pratica della *forzatura*. Affinché la crescente domanda di limoni freschi durante il periodo estivo venga pienamente soddisfatta, infatti, la *forzatura*, che consiste nella sospensione dell'irrigazione nella prima decade di luglio fino a quando non compaiano le prime manifestazione di accartocciamento fogliare, sintomo di deficit idrico severo (Crescimanno et al., 1956; Barbera et al. 1985, Barbera e Carimi, 1988), è la pratica che permette di ottenere i cosiddetti *verdelli*. Gli alberi rispondono al recupero dallo stato di stress idrico, in seguito alla ripresa dell'irrigazione, con una intensa fioritura, che da luogo a frutti denominati *verdelli* che maturano in piena estate e sono caratterizzati da una intensa colorazione verde dell'epicarpo. Nella modulazione della *forzatura* come pratica di gestione agronomica del limoneto, la sua durata varia in base a terreno e cultivar, non avendo consentito, ad oggi, l'individuazione di un protocollo di gestione universale. La successiva ripresa delle irrigazioni è preceduta da importanti concimazioni e dall'apporto di più modeste quantità di acqua ma a intervalli più ravvicinati rispetto al periodo antecedente la forzatura. Le varietà con buona attività verdellifera reagiscono al recupero dallo stato di stress idrico in una decina di giorni emettendo un elevato numero di germogli e fiori, per un

periodo di circa un mese. Sulla differenziazione delle gemme a fiore che portano alla produzione di fiori che danno luogo ai *verdelli* e sulla modalità di realizzazione ottimale della secca, Torrisi (1952) ha riferito che “il punto ottimale di appassimento nella secca deve aggirarsi nella perdita di circa il 50% di acqua”. Inoltre, differenze significative sono state segnalate tra le cultivar con produzione verdellifera precoce, ovvero le cultivar che emettono fiori dopo 3-5 giorni dalla ripresa dell’adacquamento, e le cultivar vedellifere tardive, ovvero quelle che emettono fiori 15-20 giorni dopo la ripresa delle irrigazioni. Dal punto di vista qualitativo, risulta che i limoni precoci, infatti, sono caratterizzati da bassissima succosità ed elevata acidità e sono quasi equiparabili ai *maiolini*. Tra i parametri correlati alla massima intensità di secca (es. acido citrico), la misura del potenziale elettrico dei frutti risulta essere quello più accurato in quanto legato alla vitalità e alla necessità d’intervenire per normalizzare le condizioni esterne che regolano il metabolismo della pianta; è stato infatti osservato come i valori più bassi di questo siano stati registrati in corrispondenza del picco della *secca*, momento oltre il quale non proseguire la forzatura, momento precedentemente determinato empiricamente attraverso la valutazione, seppur soggettiva, del grado di accartocciamento fogliare o mediante il monitoraggio dell’umidità relativa fogliare. Sulla base delle conoscenze degli autori, i cambiamenti nella qualità della frutta durante la maturazione non sono però stati studiati finora, in particolare negli ambienti dell’Italia meridionale.

Le piante di limone oggetto del presente progetto di ricerca appartengono alla cultivar *Femminello zagara bianca* innestate su *Carrizo* (*Citrus sinensis* Osbeck x *Poncirus trifoliata* Raf.) e *Volkamer* (*Citrus volkameriana*). Il limone *Volkameriano* conferisce elevata produttività e precoce entrata in produzione anticipando l’epoca di raccolta. I frutti hanno pezzatura elevata e minore contenuto in solidi solubili e acidità. Tollera suoli salini e calcarei e ben si adatta anche a suoli sabbiosi. È sensibile ad asfissia radicale e suscettibile alla *Phytophthora*. Il *Carrizo* appartiene invece ad un gruppo di ibridi denominato *Citrango* insieme a *Troyer* e C35 e sono attualmente i portinnesti maggiormente utilizzati in sostituzione dell’arancio amaro. Inducono vigoria medio-elevata e buona produttività, sono tolleranti nei confronti di diverse di diverse patologie eccezion fatta per l’exocortite e sono sensibili a terreni calcarei e salini. Per quanto riguarda i frutti, l’innesto su *Citrango* garantisce una più elevata produttività in confronto a limoni innestati su arancio amaro e frutti con più elevata resa in succo.

L’entità dallo stress idrico e la modulazione del periodo di “stretta”, mediante un approccio integrato, possono essere oggettivati e validati attraverso l’individuazione di marker fisiologici, biochimici e molecolari, correlati con il livello di stress raggiunto dalla pianta. A

tal proposito, il rapido sviluppo delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha facilitato la rilevazione e la elaborazione di grandi masse di dati (big data) molecolari sugli agrumi; con i numerosi dati genomici attualmente disponibili per i Citrus, depositati in database facilmente fruibili, quali CitGVD, le relazioni genetiche e i marcatori molecolari possono essere valutati per lo sviluppo di strategie di selezione molecolare e genomica (Li *et al.*, 2020). Studi molecolari sulla fioritura in piante modello hanno permesso di identificare i meccanismi regolatori di processi fisiologici quali la vernalizzazione, il fotoperiodo, l'orologio circadiano e gli ormoni coinvolti quali gibberelline (GA) (Khan *et al.*, 2014). Tali studi hanno portato alla scoperta di molti geni coinvolti nell'induzione della fioritura: locus di fioritura T (FT), Constans (CO), soppressore della sovraespressione di Constans 1 (SOC1), Flowering Locus C (FLC), Leafy (LFY) (Wahl *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2014). Tra questi, FT codifica un florigeno che si comporta come un segnale mobile. Il gene SOC1 regola l'espressione dei geni di identità del meristema floreale (LFY), ed è connesso all'induzione floreale, sviluppo dell'infiorescenza e fioritura (Liu *et al.*, 2008). I geni – FLC, short vegetative phase (SVP), terminal flower 1 (TFL1), twin sister of FT (TSF), brother of FT e TFL1 (BFT) – agiscono da soppressori dello sviluppo dei fiori e della fioritura (Michaels e Amasino, 1999; Guitton *et al.*, 2012; Kazan e Lyons, 2016). Negli agrumi alcuni recenti esperimenti hanno evidenziato che questi geni sono anche regolatori chiave di sviluppo del fiore e tempo di fioritura (Li *et al.*, 2010; Chica e Albino, 2013; Li *et al.*, 2020).

3.2. Campo sperimentale

Ottanta piante di due anni *Femminello Zagara bianca* innestato su *Citrus volkameriana* e ottanta piante di due anni di *Femminello zagara bianca* innestato su *Carrizo* di altezza minima 100 cm sono state posizionate, a settembre 2022, in mastelli da 50 litri presso i campi sperimentali del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Forestali dell'Università degli Studi di Palermo. Sei campioni di suolo sono stati prelevati da sei vasi al fine di caratterizzarlo dal punto di vista chimico-fisico (Tab.1). Il terreno presenta la seguente tessitura e caratteristiche chimico fisiche:

TESSITURA	
Sabbia	77%
Limo	13%
Argilla	10%

Tab.1: Granulometria del terreno

CARATTERISTICHE CHIMICHE DEL SUOLO	
pH	7.9
P assimilabile	206 mg/kg ⁻¹
N	1,83 g/kg ⁻¹
C organico	7%
Ca	45,88 mg/kg ⁻¹
Mg	3,61 mg/kg ⁻¹
K	2,45 mg/kg ⁻¹
Na	0,37 mg/kg ⁻¹
Capacità di Scambio Cationico	43 meq/100g
Conducibilità elettrica	0,42 dS/m ⁻¹

Tab.2: Analisi chimiche dei campioni di suolo del sito sperimentale

L'acqua di irrigazione utilizzata durante le prove sperimentali presentava le seguenti caratteristiche, misurate tramite GroLine HI9814 (Hanna Instruments) (Tab.3)

ACQUA D'IRRIGAZIONE	
pH	7,22
Conducibilità elettrica (EC)	1,03 mS/cm
Residuo fisso (TDS)	510 ppm

Tab.3: Parametri dell'acqua di irrigazione

Tre tesi più una di controllo (CTR) sono state oggetto della sperimentazione e sono qui di seguito brevemente riportate:

1. Controllo (CTR) - 100%, ovvero mantenute a capacità di campo
2. 50: 50% della capacità di campo
3. 25: 25% della capacità di campo
4. F: Forzatura, applicazione della *secca* fino ai primi sintomi di accartocciamento fogliare (Crescimanno et al., 1956). Interrotta a causa di una improvvisa ondata di calore che ha compromesso la tesi in oggetto che è stata successivamente reidratata e monitorata per osservare i tempi di risposta

Il 19 luglio 2023 e il 18 luglio 2024 (DOY 200) sei repliche per tesi per portinnesto (n=48) secondo la logica del disegno sperimentale *split-plot*, sono state sottoposte a quattro diversi trattamenti per un periodo di 53 giorni (da DOY 200 a DOY 252). L'appezzamento è stato quindi diviso in blocchi omogenei (split) e poi sono state assegnate casualmente le diverse condizioni sperimentali (plot) ai blocchi per meglio controllare fattori di variabilità indesiderati come, ad esempio, la nota differenza biometrica conferita dai due portinnesti. I vasi sono stati coperti con del film plastico bianco e sigillati per evitare qualsiasi perdita dovuta a fenomeni di evaporazione e la traspirazione è stata monitorata mediante pesata dei vasi.

Tutti i vasi sono stati quindi portati a capacità di campo e si è atteso che raggiungessero le soglie prestabilite. I potenziali sono stati misurati durante i circa sei giorni che sono risultati necessari per il raggiungimento di tali soglie idriche e il controllo è sempre stato regolarmente idratato. Le soglie di deficit idrico sono quindi state mantenute stabili nel tempo e fino alla fine della prova.

Contestualmente al rilievo dei parametri ecofisiologici, sono stati prelevati campioni di foglie per la successiva estrazione dell'RNA per gli studi molecolari previsti dal progetto di ricerca.

3.3. Relazioni contenuto idrico del suolo - temperatura

Per ricondurre la pratica agronomica della forzatura nel contesto dell'agricoltura di precisione e per consentirne una gestione che sia quanto più puntuale e di facile determinazione ci si è avvalsi di sensoristica per la determinazione del contenuto d'acqua volumetrico del suolo (VWC) e della temperatura del suolo. I sensori in questione,

WatchDog serie 1400 e 1600 dotati di sonde SM100 (Spectrum Technologies, INC). La WatchDog 1400 è una microstazione meteorologica versatile prodotta da Spectrum Technologies, progettata per monitorare vari parametri ambientali. La WatchDog 1650 è dotata di sensori interni per temperatura e umidità relativa, oltre a quattro porte esterne che permettono il collegamento di sensori aggiuntivi, come quelli per l'umidità del suolo, la bagnatura fogliare e la radiazione solare. La sonda SM 100, quando collegata alle microstazioni, misura il contenuto volumetrico d'acqua nel suolo o la temperatura dello stesso.

Le sonde sono state installate a 25 cm dal piano di campo e le microstazioni programmate per registrare ogni 15 minuti. Le microstazioni così configurate sono state installate, durante entrambe le annate, 2023 e 2024, all'inizio di luglio e mantenute per tutta la durata dell'esperimento.

Per esaminare la relazione tra temperatura e contenuto idrico volumetrico del suolo, è stato adottato un approccio basato sull'integrazione temporale dei dati. L'analisi è stata realizzata su dati registrati ad intervalli di 15 minuti per osservare come i cambiamenti nelle due variabili evolvono nel tempo e come influenzano l'andamento del suolo in un contesto agricolo. L'integrazione dei dati è fondamentale per analizzare i comportamenti complessivi e non solo le fluttuazioni istantanee che possono essere causate da eventi brevi o variabili di tipo meteorologico. Quando si esaminano fenomeni complessi come l'effetto della temperatura sull'umidità del suolo, è essenziale considerare l'impatto accumulato nel tempo, poiché le interazioni tra temperatura e umidità non si verificano in modo immediato, ma si sviluppano progressivamente. L'approccio di integrare i dati nel tempo consente di eliminare il rumore o le fluttuazioni giornaliere che potrebbero distorcere l'interpretazione dei dati. L'integrazione permette quindi di ottenere una visione più chiara e robusta della relazione tra le due variabili. In altre parole, anziché concentrarsi su come la temperatura e l'umidità cambiano ogni giorno, osserviamo come accumulano e si sommano nel tempo, dando un'immagine più precisa delle dinamiche globali. Il modello utilizzato ha previsto la somma cumulativa delle variabili di temperatura e contenuto idrico volumetrico, calcolando l'integrazione dei dati ogni 15 minuti (ovvero ogni quarto d'ora). Questo è stato fatto moltiplicando il valore di ogni misurazione per 15 minuti (l'intervallo di tempo tra le rilevazioni). Per esempio:

$$\textit{Temperatura integrata} = \textit{Temperatura}(\text{°C}) \times 15 \textit{minuti}$$

$$\textit{VWC integrata} = \textit{Volumetric Water Content}(\%) \times 15 \textit{minuti}$$

La somma cumulativa è calcolata utilizzando la funzione *cumsum()*, che calcola la somma progressiva, ovvero l'integrale numerico, per ogni valore dei dati:

$$T_{cumulato}(i) = \sum_{k=1}^i T_k \cdot \Delta t$$

$$VWC_{cumulata}(i) = \sum_{k=1}^i VWC_k \cdot \Delta t$$

$\Delta t=15$ minuti. In pratica, l'integrazione cumulativa somma tutti i valori precedenti di temperatura e VWC fino al momento i , per ottenere il valore accumulato fino a quel punto. Questo processo aiuta a visualizzare l'effetto accumulato nel tempo, ed è importante per modellare fenomeni come la dinamica termica e idrica nel suolo. Una volta che i dati sono stati accumulati, si è applicata una regressione lineare per identificare la relazione tra la temperatura cumulativa e il contenuto idrico volumetrico cumulativo. La regressione lineare ha restituito il seguente modello:

$$y = 0.50x + 4695.77 \quad y = 0.41x + 592.08$$

dove y rappresenta il contenuto idrico volumetrico cumulato, e x rappresenta la temperatura cumulata. L'elevato valore di $R^2=1.00$ indica che il modello spiega il 100% della variabilità del contenuto idrico del suolo in funzione della temperatura accumulata nel tempo. Questo risultato conferma la presenza di una relazione fortemente positiva tra temperatura e umidità del suolo, suggerendo che l'aumento della temperatura nel tempo porta a un incremento corrispondente del contenuto idrico nel suolo. Le unità di misura riflettono l'integrazione temporale ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}$ per la temperatura e $\% \cdot \text{min}$ per il VWC). Per la realizzazione del grafico, l'integrazione dei dati è una metodologia potente per analizzare fenomeni che si sviluppano nel tempo, come l'effetto cumulativo della temperatura sul contenuto idrico del suolo. Per verificare l'effettiva correlazione tra i valori di temperatura e VWC del suolo è stato necessario integrare i dati, passaggio utile se si pensa all'elevata variabilità dei valori a causa di eventi a breve termine come nel caso dell'annata del 2023, dove una forte ondata di calore ha compromesso le piante soggette a forzatura, evento che ha reso necessario definire un secondo campione di piante forzate. Mediante l'integrazione dei valori cumulati si fa sì che la variazione dovuta anche a fattori come l'irrigazione permetta di osservare delle tendenze a lungo termine, eliminando possibili rumori o valori anormali tipici dei dati ambientali. L'effetto della temperatura e dell'umidità del suolo, infatti, influenzano i sistemi naturali non soltanto in

un momento specifico, ma il loro effetto può perpetuarsi nel tempo. L'elevata correlazione positiva tra valori cumulativi mostra come i due processi siano fortemente connessi. Nel caso dei campioni di controllo (CTR), i campioni non soggetti a tipo di perturbazione alcuna, è stato possibile dimostrare come la tendenza sia del tutto lineare, operazione che può essere utile in agricoltura. Basti pensare che una elevata correlazione tra temperatura cumulata e contenuto idrico volumetrico nel suolo (VWC) cumulato può essere utile per la previsione di un eventuale fabbisogno idrico della coltura, sia nel contesto della pratica agronomica della forzatura, sia su base stagionale.

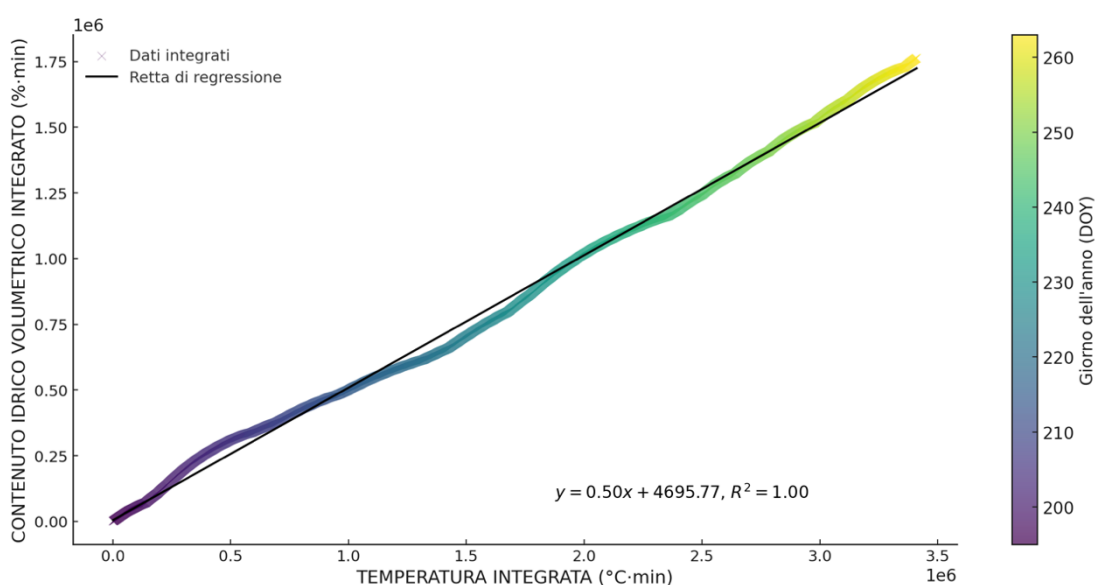


Fig.1: Correlazione tra temperatura (°C) e contenuto idrico volumetrico del suolo (VWC) (%) integrate in campioni di controllo (CTR) di *Femminello zagara bianca x Carrizo* e *Femminello Zagara Bianca x Volkamer* durante il periodo di applicazione della *forzatura* nell'anno 2023.

Una volta constatata l'effettiva forte correlazione presente tra temperatura e VWC integrate nelle piante CTR, per le altre tesi si è proceduto analogamente analizzando l'effettiva correlazione tra stato idrico del suolo e temperatura del suolo. Come riferimento sono stati presi gli effettivi giorni di campionamento che coincidono con le misure del potenziale idrico del fusto, lasciando emergere che anche in questo caso vi è una forte correlazione tra i due parametri oggetto di studio con un coefficiente di determinazione R^2 compreso tra -0.97 per la tesi 50 e -0.99 per la tesi CTR.

VOLKAMER

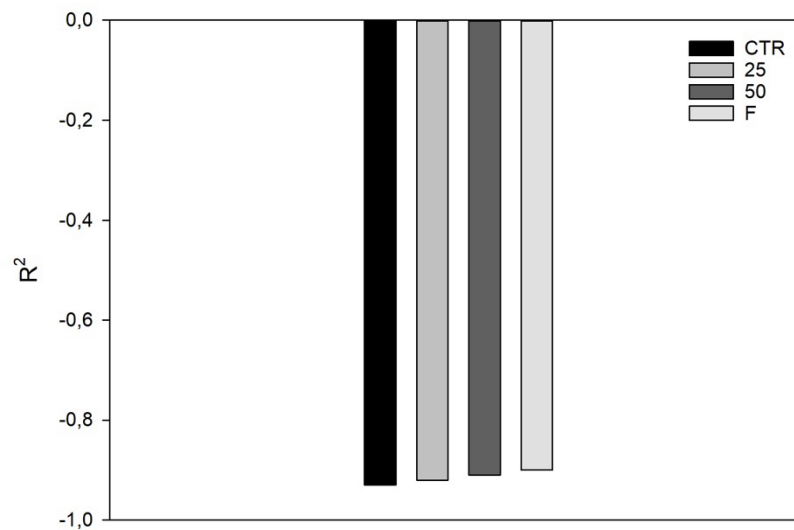


Fig.2: Correlazione tra temperatura (°C) e contenuto idrico volumetrico del suolo (VWC) (%) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. cv *Femminello Zagara Bianca x Volkamer* durante il periodo di applicazione della *forzatura*.

La correlazione tra VWC e temperatura del suolo riflette l'interazione tra la disponibilità idrica del suolo e le condizioni ambientali che influenzano la domanda idrica delle piante. In genere, con l'aumento della temperatura, l'umidità del suolo (VWC) tende a diminuire a causa dei maggiori tassi di evaporazione dalla superficie del suolo e dell'aumento della traspirazione da parte delle piante. Questa relazione inversa si osserva spesso in sistemi ben drenati o stressati, dove il suolo non può reintegrare l'acqua abbastanza rapidamente da compensare queste perdite. Tuttavia, la forza e la direzione della correlazione dipendono da diversi fattori come irrigazione o precipitazioni, in quanto in condizioni di irrigazione o di buona irrigazione, la relazione tra VWC e temperatura può indebolirsi perché il suolo mantiene un'adeguata umidità, indipendentemente dalle variazioni di temperatura. Altro ruolo importante è quello del tipo di terreno, terreni più pesanti e con una maggiore ritenzione idrica possono infatti contrastare le perdite rapide di VWC, riducendo potenzialmente la correlazione con la temperatura.

Ma per semplificare l'individuazione del momento esatto per la ripresa degli interventi irrigui è stato necessario correlare parametri agronomici come temperatura del suolo e contenuto idrico del suolo con un parametro strettamente legato alla fisiologia della pianta come il potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}), che risulta essere il migliore indicatore dello stato idrico della pianta con valori direttamente riconducibili a fasi di stress più o meno severe (Boyer, 1989)

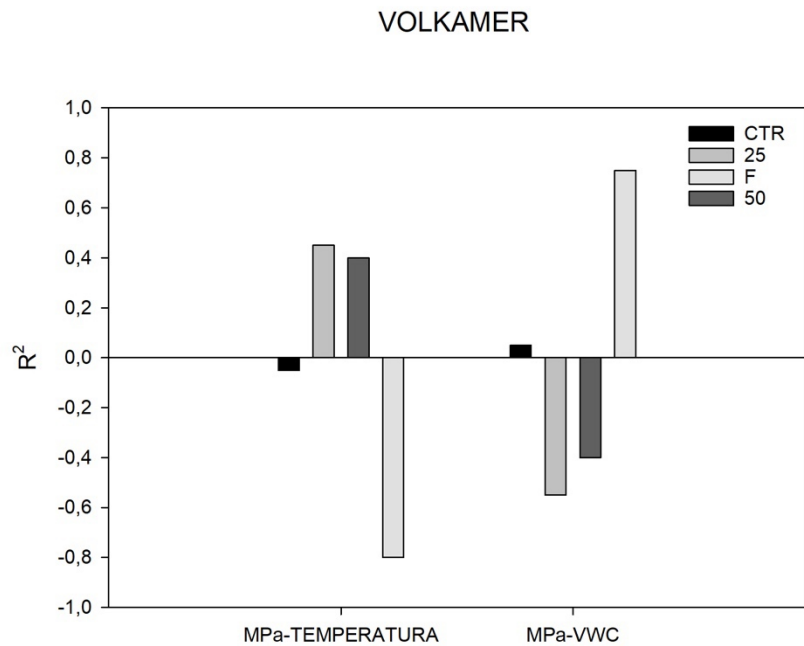


Fig.3: Correlazione tra temperatura (°C), contenuto idrico volumetrico del suolo (VWC) (%) e potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}) (MPa) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. cv *Femminello Zagara Bianca x Volkameriana* durante il periodo di applicazione della *forzatura*.

Nella tesi F, la correlazione tra Ψ_{stem} come misura dello stress idrico e fattori ambientali come la temperatura ed il contenuto idrico volumetrico del suolo (VWC) è più forte perché le piante in condizioni di stress sono più sensibili ai cambiamenti dell'ambiente circostante. Questa maggiore sensibilità è dovuta alla limitata disponibilità di acqua, che rende critiche anche le piccole fluttuazioni della temperatura o dell'umidità del suolo. Quando le piante sono sotto stress idrico, operano vicino ai loro limiti fisiologici. Ciò significa che faticano a mantenere un costante ritmo di assorbimento di acqua per soddisfare le loro esigenze. In fig. 3 è possibile notare come ad esempio, la maggiore perdita di acqua per processi evaporativi e traspirativi e le elevate temperature, rendendo più difficile per le piante la normale sopravvivenza, rendendo il VWC un fattore critico, poiché anche piccoli cambiamenti nell'umidità del suolo possono avere un impatto significativo sulla capacità delle piante di accedere all'acqua. Di conseguenza, la temperatura ha un'influenza maggiore sull'MPa nelle piante stressate, creando una correlazione più forte. Le piante stressate in generale, e con tendenza isoidrica, attuano dei meccanismi adattativi come la chiusura stomatica per conservare l'acqua, riducendo i tassi di traspirazione. Tuttavia, quando la temperatura aumenta, la loro capacità di bilanciare l'assunzione e la perdita di acqua diventa ulteriormente compromessa, rafforzando così la correlazione tra MPa e temperatura, e qualsiasi quantità di umidità disponibile diventa fondamentale, rafforzando la correlazione

tra MPa e VWC. Analogamente, in condizioni di limitazione idrica, l'umidità del suolo diventa una risorsa vitale. Qualsiasi riduzione del VWC influisce direttamente sulla capacità della pianta di accedere all'acqua, determinando una relazione più forte tra MPa e VWC. Anche piccole variazioni del contenuto idrico del suolo possono avere un impatto significativo sui livelli di stress della pianta, che si riflette nelle misurazioni di MPa. In condizioni di minore stress, con delle strategie di DIC, l'irrigazione limitata o i suoli più secchi costringono le piante a dipendere esclusivamente dal VWC disponibile, mentre l'esposizione a temperature più elevate accentua lo stress idrico, amplificando il suo legame con MPa. Le piante che però risultano avere un valore più moderato di stress sono maggiormente in grado di tamponare queste fluttuazioni. La maggiore disponibilità di umidità nel suolo permette la limitazione dei meccanismi adattativi, di conseguenza, le relazioni tra MPa, temperatura e VWC sono più deboli perché la pianta ha più risorse per mantenere la stabilità. In sintesi, da come è possibile evincere dai grafici, le correlazioni più forti nelle tesi stressate derivano dalla maggiore dipendenza che piante in queste condizioni hanno nei confronti dei parametri ambientali per la loro sopravvivenza. La loro limitata capacità di tamponare i cambiamenti rende l'MPa strettamente legato sia alla temperatura che all'umidità del suolo, dando luogo a relazioni più pronunciate.

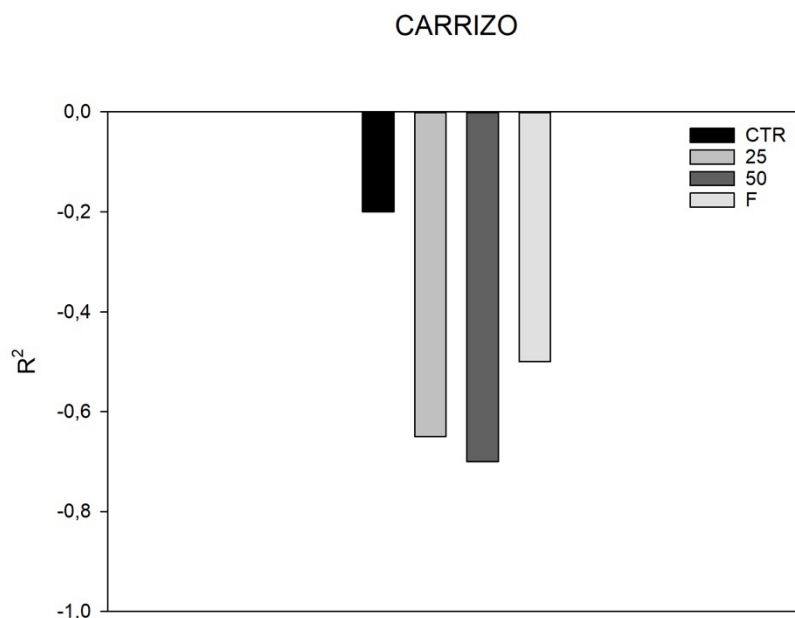


Fig.4: Correlazione tra temperatura (°C) contenuto idrico volumetrico del suolo (VWC) (%) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. cv *Femminello Zagara Bianca* x *Citrango carrizo* durante il periodo di applicazione della forzatura.

Nel caso delle piante innestate su *Citrango carrizo*, viene osservato una tendenza differente, mostrando come vi sia una minore correlazione temperatura-VWC nella tesi F. Emerge come i periodi di irrigazione limitata ma continua, come nel caso della tesi 25, portano ad una stabilizzazione del VWC, facendo apparire la correlazione più debole. Le piante nella tesi F, invece, mostrano di avere sviluppato una maggiore tolleranza allo stress o comunque una pronta risposta in termini di chiusura stomatica all'aumentare della temperatura. Questo comportamento limiterebbe la perdita d'acqua per traspirazione, influenzando meno il VWC rispetto alle altre tesi.

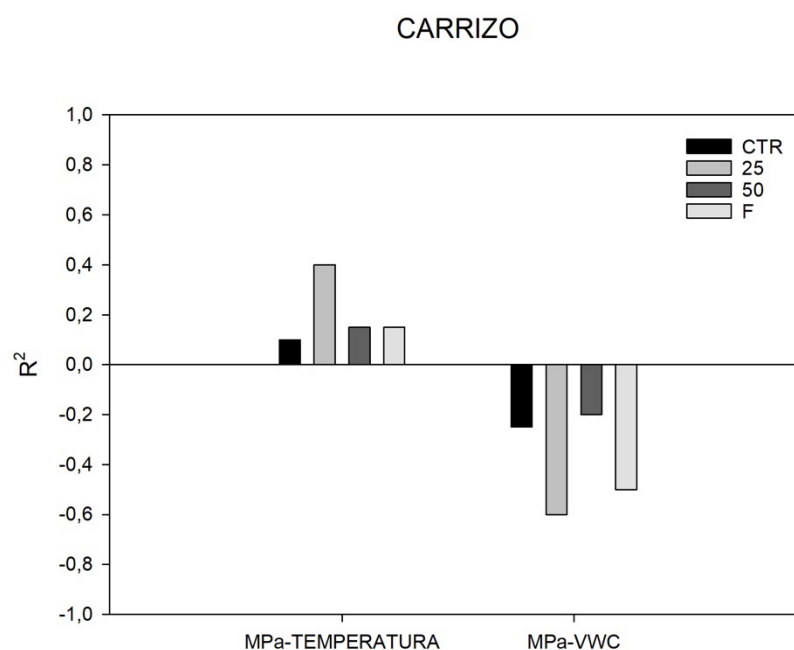


Fig.5: Correlazione tra temperatura (°C), contenuto idrico volumetrico del suolo (VWC) (%) e potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}) (MPa) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. cv *Femminello Zagara Bianca x Citrango carrizo* durante il periodo di applicazione della *forzatura*.

In entrambi i portinnesti, la correlazione tra MPa e VWC è generalmente negativa, indicando che, quando il contenuto d'acqua diminuisce, il potenziale idrico del fusto (MPa) aumenta. La correlazione tra MPa e temperatura è generalmente positiva, evidenziando come, per effetto dei processi traspirativi e della diminuzione della disponibilità. Nel caso del *Citrango carrizo*, però, è possibile notare come vi siano correlazioni meno marcate evidenziando come, nel caso delle piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*, gli effetti della temperatura sembrano più marcati, specialmente per la tesi sottoposta a forzatura, suggerendo che la risposta della pianta, in questo caso misurata attraverso il Ψ_{stem} , a questi fattori è più sensibile rispetto a quanto indicato all'analisi delle risposte delle piante innestate su *Carrizo*.

I risultati ottenuti fanno così intendere come vi sia una effettiva resistenza che viene conferita dal portinnesto e che essendo così marcata può determinare l'effettiva attitudine alla *forzatura* o meno.

3.4. Monitoraggio del potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem})

Il monitoraggio del potenziale idrico del fusto è un parametro fondamentale per valutare lo stato idrico delle piante l'effettivo stress della pianta (Scholander *et al.*, 1964). La metodologia, tuttavia risulta essere *time consuming*, richiedendo tempo e assoluta precisione da parte dell'operatore. La camera di Scholander, anche conosciuta come camera a pressione, è uno strumento cruciale per la misurazione del potenziale idrico nelle piante, particolarmente nelle specie arboree. Sviluppata da P.F. Scholander negli anni '60, questa tecnologia ha rivoluzionato lo studio della fisiologia vegetale fornendo un metodo diretto e preciso per determinare lo stato idrico delle piante.

Questo metodo è apprezzato per la sua semplicità, portabilità relativa e capacità di fornire misurazioni dirette, ed è spesso considerato uno standard di riferimento per la validazione di altre tecniche. Tuttavia, presenta alcune limitazioni significative: il processo è laborioso, il che riduce la frequenza e l'estensione spaziale delle misurazioni. Inoltre, l'uso di un cilindro di gas compresso, solitamente azoto, per generare la pressione necessaria all'interno della camera, comporta problemi legati alla sicurezza come, ad esempio, incidenti legati all'alta pressione e difficoltà operative, come la necessità di sostituire periodicamente i cilindri, che può rallentare le operazioni. Infine, l'interpretazione del momento esatto in cui l'acqua appare nello xilema può variare in base all'esperienza dell'operatore, introducendo una componente soggettiva nella misurazione. Tuttavia, ad oggi, la misurazione mediante camera di Scholander è la tecnica consolidata utilizzata per misurare il potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}), fondamentale per stimare lo stress idrico delle piante nonché un elemento cruciale per ottimizzare l'utilizzo delle risorse idriche, migliorare la quantità e la qualità delle rese agricole nell'ottica anche dell'incremento dei profitti degli agricoltori (Schaible and Aillery, 2012; Fulton *et al.*, 2014; Vellidis *et al.*, 2016). Per la misurazione della pressione della linfa xilematica, la porzione basale di una foglia viene chiusa un'ora prima delle analisi in fogli di alluminio impedendo l'evaporazione dalla foglia racchiusa e, poiché si presume che i fasci vascolari siano interconnessi al nodo, il processo ha consentito il raggiungimento dell'equilibrio con il potenziale nello stelo. La foglia recisa viene poi posta all'interno della camera a pressione, lasciando l'estremità tagliata del picciolo all'esterno. La pressione nella camera viene gradualmente aumentata fino a provocare l'espulsione

dell'acqua dello xilema dall'estremità recisa. Questo punto corrisponde alla pressione di equilibrio, che rappresenta il valore misurato. Sebbene fattori come la variabilità climatica e l'intensità della luce solare possano influire sull'affidabilità delle singole misurazioni (Schaible and Aillery, 2012), il metodo della camera a pressione rimane ampiamente utilizzato.

In piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. è stato già osservato come limite superiore e inferiore dello stato idrico varino generalmente tra -1.5 MPa in condizioni ottimali e -3.0 Mpa in condizioni di forte stress idrico (Ortuno *et al.*, 2006).



Fig. 6: Camera a pressione o camera di Scholander

I diversi trattamenti sono stati applicati per 53 giorni, con differenti giorni di ripresa dell'irrigazione che sono stati determinati in base al caratteristico sintomo dell'accartocciamento fogliare. Tutte le valutazioni fogliari sono state eseguite utilizzando foglie mature uniformi e completamente espanse dall'area centrale dello stelo di ciascuna delle sei repliche per tipo di pianta e trattamento. È stata considerata rappresentativa di ogni singola pianta la media delle misurazioni effettuate per due foglie.

Come riportato in letteratura, i valori di potenziale idrico del fusto, oltre ad essere chiara espressione dello stato idrico della pianta, sono direttamente influenzati dall'ambiente circostante (Ortuno *et al.*, 2006). Per tale motivo, durante il biennio 2023-2024 sono stati monitorati i tre principali parametri ambientali mediante capannina meteo WatchDog 1650 (Spectrum, Inc.), in quanto l'interpretazione degli indicatori dello stato idrico delle piante necessitano di un riferimento, in questo caso i campioni di controllo CTR, come riferimento che rifletta la risposta dell'indicatore dello stato idrico degli alberi completamente irrigati alle condizioni meteorologiche.

Di seguito i valori ambientali minimi, medi e massimi relativi al periodo di sperimentazioni nel 2023 e nel 2024.

1A. 2023	Temperature (°C)	RH (%)	Dew Point (°C)
MEDIA	33,8 ± 9,0	51,8 ± 21	20,4 ± 5,1
MASSIMA	55,5	94,7	36,8
MINIMA	21,2	8,3	6,9

1B. 2024	Temperature (°C)	RH (%)	Dew Point (°C)
MEDIA	29.5	64.0	21.4
MASSIMA	45.4	99.9	29.7
MINIMA	20,4	6,8	5,2

Tab. 1A e 1B: temperatura (°C), umidità relativa (RH%) e punto di rugiada (Dew point °C) durante i periodi di applicazione dei trattamenti nel biennio 2023-2024



Fig. 7: Campo sperimentale nel 2023

Le analisi del primo anno di sperimentazioni, condotte dal 19 luglio 2023 (DOY 200) al 10 settembre 2023 (DOY 253) hanno evidenziato differenze significative in termini di potenziale idrico del fusto sia tra le tesi, sia tra i due diversi portinnesti.

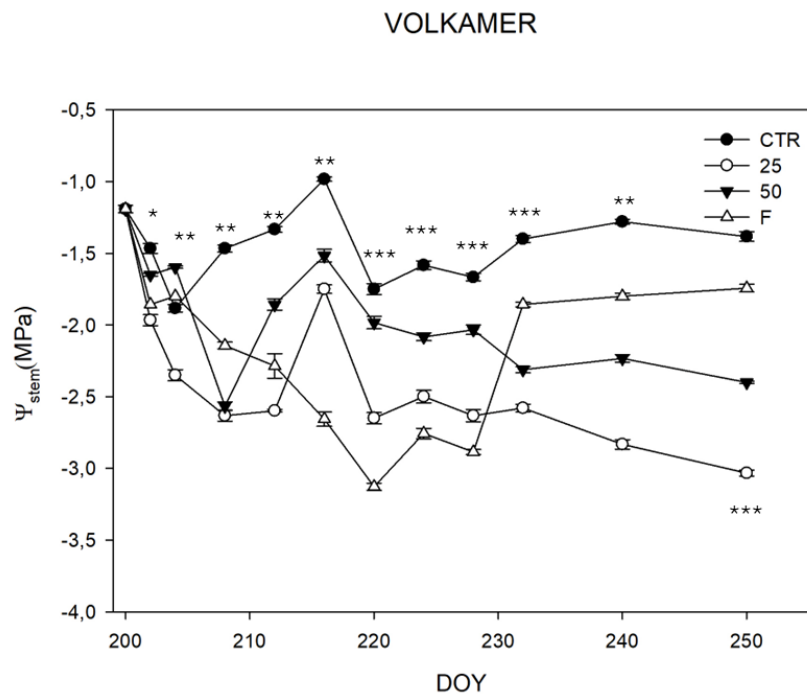


Fig. 8: Potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem} (MPa)) registrati durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Le piante a capacità di campo riportavano un valore di circa -1,2 MPa per entrambi i portinnesti. I valori di potenziale sono poi stati acquisiti fino al raggiungimento delle soglie, definite su base traspirativa. È possibile osservare come vi sia una pronta risposta nel momento in cui le soglie (25, 50, 100%) vengono ripristinate mediante irrigazione (DOY 214) e come, in corrispondenza dell'ondata di calore del 2023 vi sia una repentina caduta del potenziale (DOY 220). In corrispondenza dell'accartocciamento fogliare per la tesi forzata (DOY 228) viene quindi effettuata una abbondante irrigazione alla quale le piante rispondono con valori del potenziale del fusto pari a -1,9 MPa per la tesi *Volkamer* e -1,3 MPa per la tesi *Carrizo*, che risulta avere valori pari alla tesi di controllo CTR. Per quanto riguarda le tesi 25 e 50, che riportano valori significativamente differenti durante tutto il periodo del trattamento, queste risultano stabilizzarsi intorno a valori del potenziale compresi tra -2,0 e -2,5 MPa per gli alberi innestati su *Volkamer* e valori compresi tra -2,5 e -2,8 MPa per gli alberi innestati su *Carrizo* e raggiungere il punto di appassimento in corrispondenza del DOY 251 con un valore di Ψ_{stem} di -3,7 Mpa per le piante innestate su *Carrizo* (fig. 9).

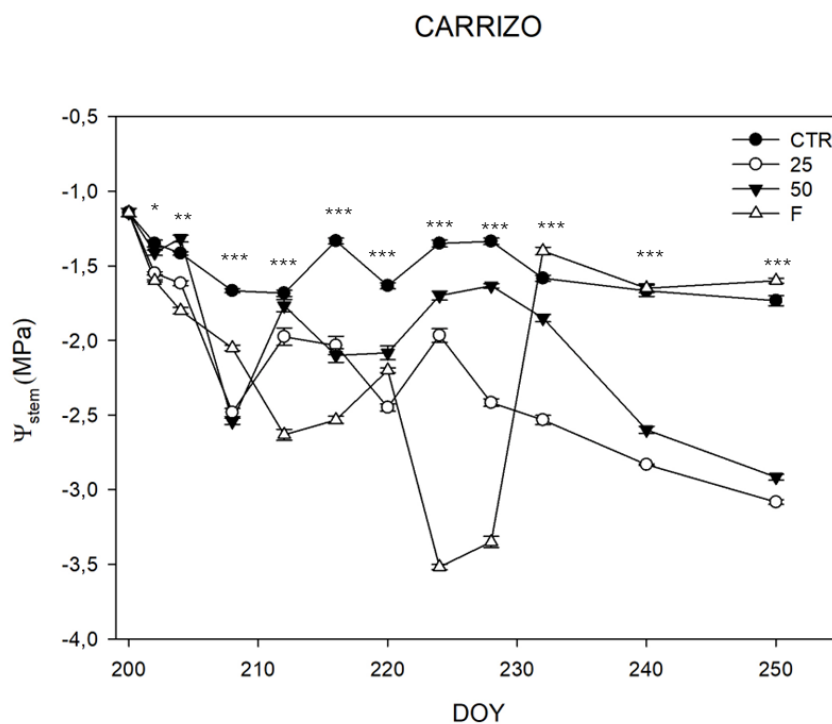


Fig. 9: Potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem} (MPa)) registrati durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* innestate su *Citrango carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Queste differenze osservate all'analisi dei potenziali del fusto una maggiore resistenza da parte delle piante innestate su *Carrizo*, che sostengono valori di potenziali più elevati, con una migliore risposta in termini di ritorno a valori pari a quelli del controllo, evento non riscontrabile nelle piante innestate su *Volkamer*. I valori così raggiunti indicano la presenza di un importante livello di stress idrico, che nelle piante soggette a DIC aumenta con una velocità di circa 0,35 MPa d⁻¹.

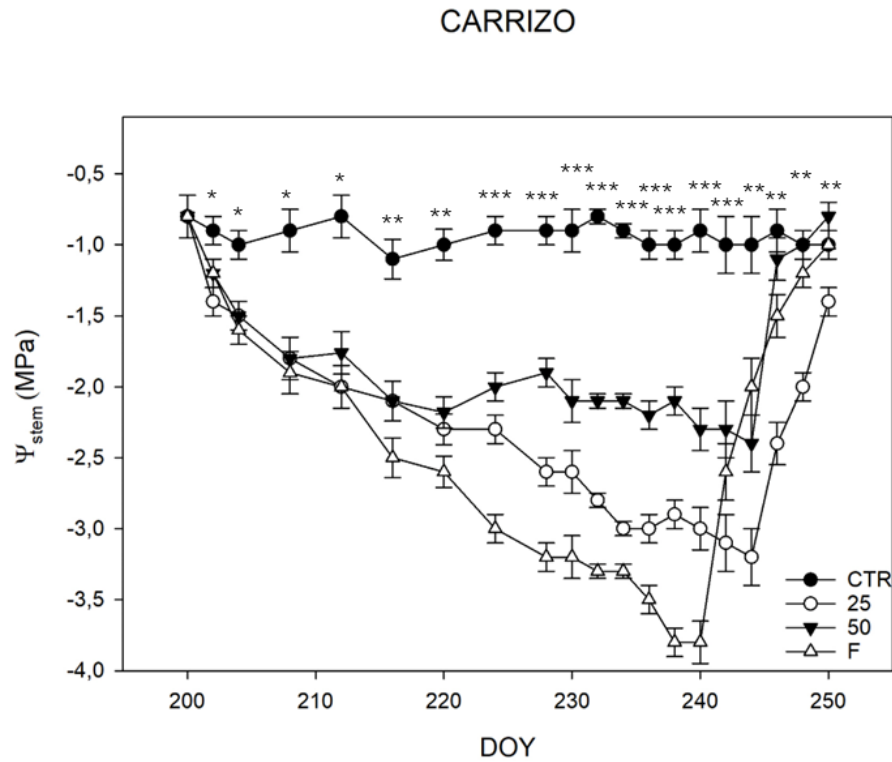


Fig. 10: Potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem} (MPa)) registrati durante l'estate 2024 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

VOLKAMER

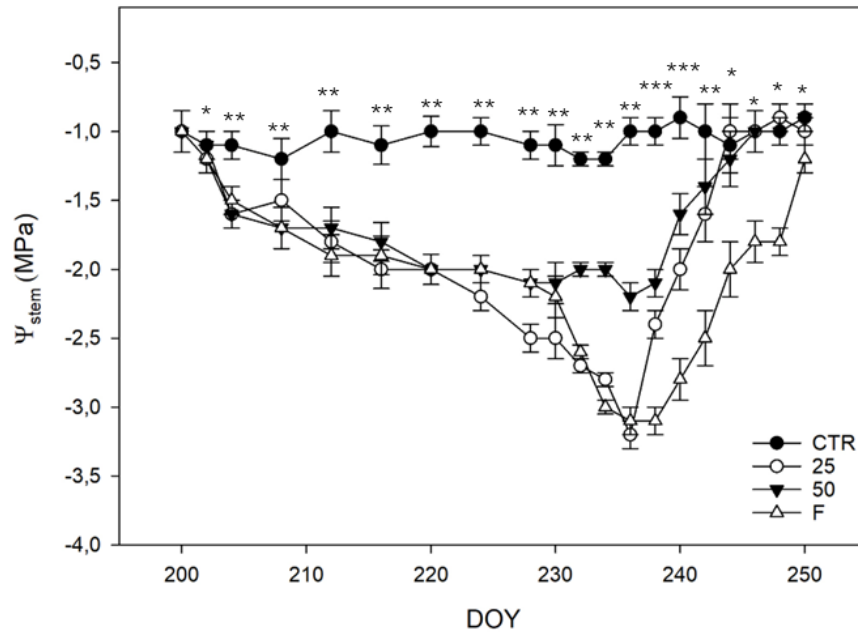


Fig. 11: Potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem} (MPa)) registrati durante l'estate 2024 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In Figg. 10-11 sono riportati i valori di potenziale relativi al secondo anno di applicazione dei trattamenti, dove le differenze tra i due portinnesti sono riconfermate e in cui è possibile osservare nel dettaglio la risalita del potenziale. Al confronto statistico dei due anni non sono state riscontrate differenze significative, il che implica che l'applicazione dei trattamenti non ha causato danni alle piante oggetto di sperimentazione.

Per monitorare l'effettiva ripresa delle piante, una volta raggiunti livelli di potenziale pari ai valori delle piante di controllo (DOY 268) sono stati misurati gli scambi gassosi fogliari mediante un CIRAS-2 (PP Systems, Amesbury, MA, USA). Per effettuare le misurazioni è stato utilizzato uno scambiatore di gas chiuso CIRAS-2 (PP-systems, Hitchin, Regno Unito). Le lamine fogliari sono state completamente racchiuse all'interno di una cuvetta fogliare universale PLC 6 in modalità a circuito chiuso e portata d'aria attraverso la cuvetta di $0,5\text{--}1,5 \text{ L min}^{-1}$. Sono state effettuate dieci misurazioni consecutive a intervalli di 3 secondi.

Lo stress idrico riduce l'assimilazione di CO_2 , la conduttanza stomatica (g_s) e la traspirazione (E) (García-Sánchez *et al.*, 2007) e la comunicazione tra gli apparati radicali e le foglie può far sì che la risposta alla mancanza di contenuto idrico del suolo si traduca in segnali fogliari che causano la chiusura stomatica (Davies and Zhang, 1991) o nella produzione di acido abscissico (ABA), che, sintetizzato nelle radici viene trasdotto alle foglie, o, in aggiunta ai

meccanismi per la resistenza alla siccità vi è l'aumento dello sviluppo delle radici o la riduzione dell'area fogliare (Zhang and Davies, 1990).

3.5. Conduttanza stomatica (gs)

Nelle piante soggette a DIC con tesi 50 sono stati riscontrati valori di conduttanza stomatica (gs) pari ai campioni di controllo. Le piante soggette a DIC con tesi 50 sono stati riscontrati, nel *Carrizo*, valori significativamente inferiori, e nel *Volkamer* non sono evidenziabili differenze significative. I campioni soggetti a forzatura riportano valori significativamente inferiori. Lo stress idrico al quale le piante sono state sottoposte ha causato una riduzione significativa riflettendo un grado di regolazione stomatica importante. Il mancato recupero dei valori di gs indica, secondo Davies e Zhang (1987) che durante lo stress idrico vi è un importante cambiamento ormonale all'interno della foglia, riconducibile ad incrementi nell'acido abscissico o un decremento di citochinine, questa regolazione stomatica potrebbe così essere attribuibile ad un meccanismo di sicurezza per una ripresa di turgore più efficiente.

I parametri relativi agli scambi gassosi fogliari (gs, E, A) sono significativamente più elevati nei campioni di controllo e nelle piante soggette a DIC 50, con significative differenze tra i portinnesti.

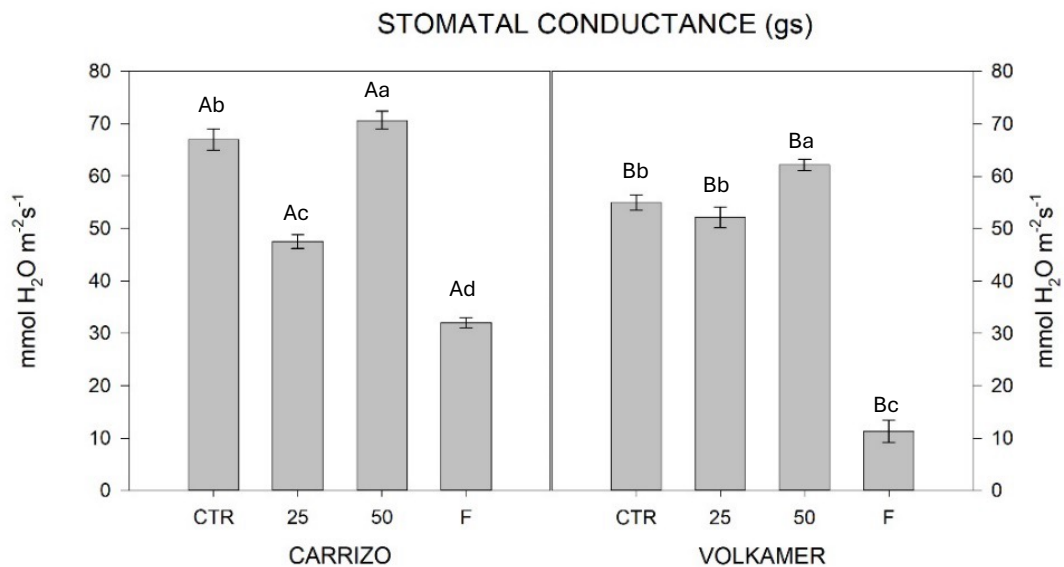


Fig. 12: Conduttanza stomatica (gs) registrata al termine della *forzatura* durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo* e *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere maiuscole diverse indicano differenze significative tra i portinnesti e tra i trattamenti, mentre lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti per ogni portinnesto.

Sono di seguito invece riportati i valori di conduttanza stomatica (g_s) relativi alla campagna 2024, che forniscono dettagliatamente l'andamento del parametro g_s , i cui valori relativi alle tre tesi a DIC risultano essere significativamente differenti da loro con un andamento più che proporzionale alla effettiva intensità dello stress applicato. Anche durante quest'anno di sperimentazioni risultano esservi sostanziali differenze tra i due portinnesti che possono, per deduzione, risultare intrinseche.

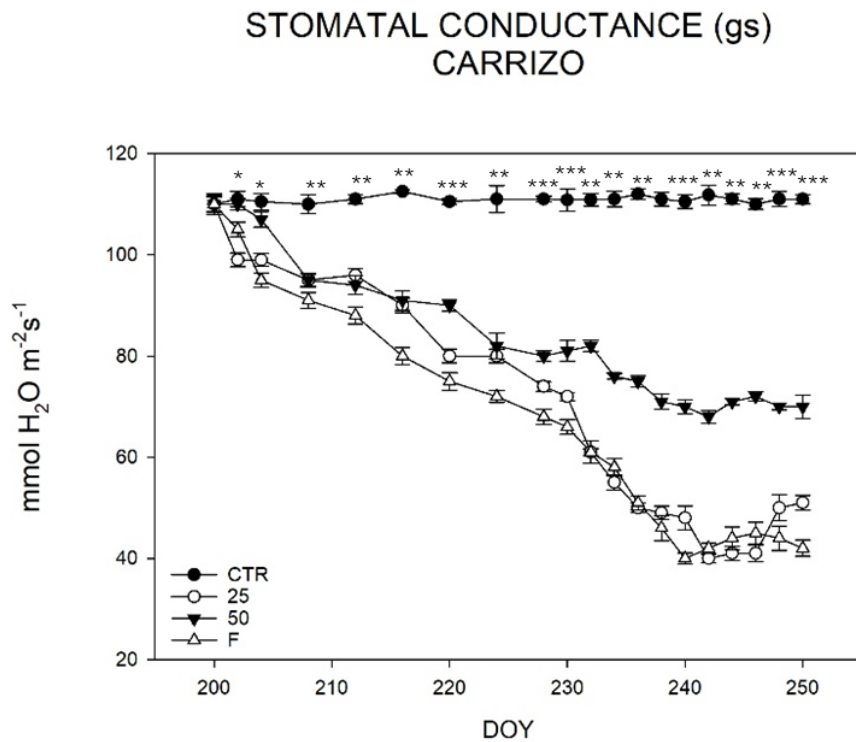


Fig. 13: Conduttanza stomatica (g_s) registrata durante l'estate 2024 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrangue carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

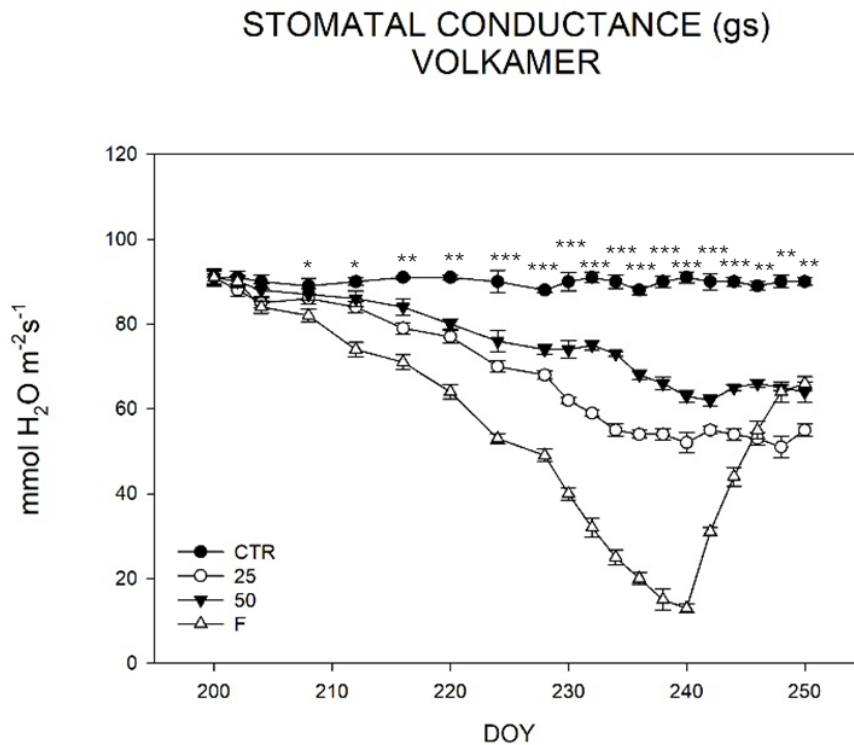


Fig. 14: Conduttanza stomatica (gs) registrata durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

3.6. Tasso fotosintetico netto (A)

Il bilanciamento tra ripresa della conduttanza stomatica e tasso fotosintetico implica che il ruolo principale degli stomi è l'ottimizzazione tra l'assimilazione di CO_2 e la perdita d'acqua per traspirazione (Gebre and Kuhns, 1993; Torrecillas *et al.*, 1999). La riduzione di A, che nel caso della tesi F innestata su *Volkamer* risulta addirittura negativo, mostra lo stesso trend di gs; la generale riduzione di A è infatti generalmente, in caso di stress idrico, ascrivibile ad un intermediario ormonale come l'acido abscissico (ABA), responsabile della regolazione della conduttanza stomatica, generato, come riportato da Gomez-Cadenas *et al.* (1996), da radici e foglie di agrumi in risposta alla disidratazione del suolo.

È possibile quindi intuire come l'ABA potrebbe di fatto essere un modulatore delle risposte degli scambi gassosi allo stress idrico, culminando nella chiusura stomatica. Questo è un chiaro meccanismo adattativo per la prevenzione della chiusura stomatica, anche se non sono da escludere altri fattori limitanti non stomatici correlati alla riduzione di A. In questo caso risulta essere stata l'eccessiva perdita di turgore fogliare culminata nell'accartocciamento fogliare ad avere e a far protrarre i valori significativamente inferiori di A, quando comparati con il CTR e i DIC 25 e 50. Il recupero completo di A dopo la ripresa della irrigazione è

stato osservato in molti studi con velocità di recupero variabili negli studi, che dipendevano dal grado e dalla velocità di declino in A durante l'imposizione dello stress (Xu, Zhou and Shimizu, 2010; Flexas *et al.*, 2012, Cano, López and Warren, 2014).

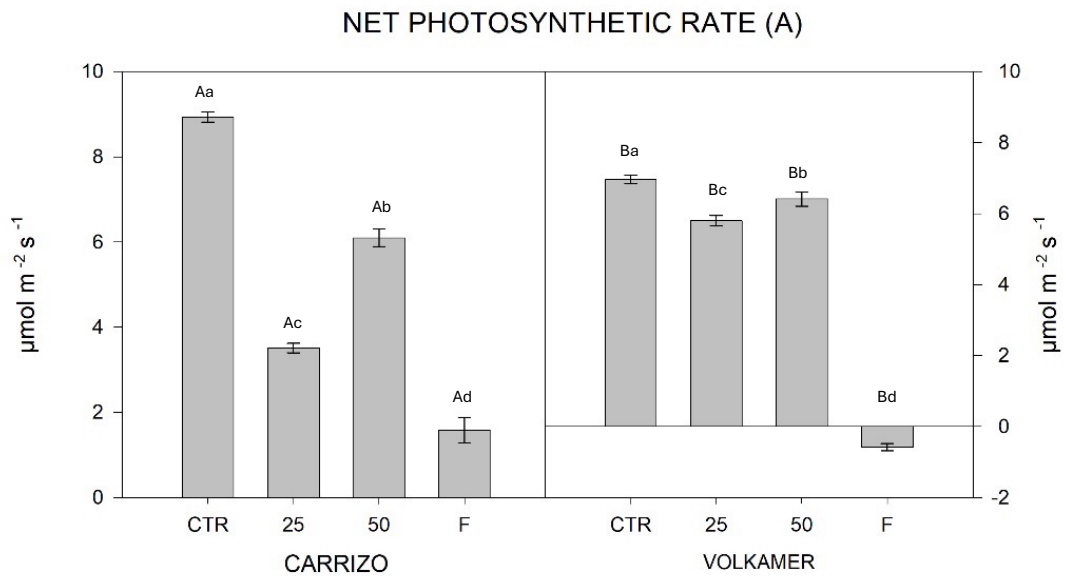


Fig. 15: Tasso fotosintetico (A) registrato al termine della *forzatura* durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrangae carrizo* e *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento lettere maiuscole diverse indicano differenze significative tra i portinnesti e tra i trattamenti, mentre lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti per ogni portinnesto.

Viene di seguito riportato l'andamento dei dati relativi all'intero periodo di applicazione del DIC nel corso del 2024, i cui valori finali non evidenziano differenze statisticamente significative rispetto ai dati rilevati nell'annata 2023

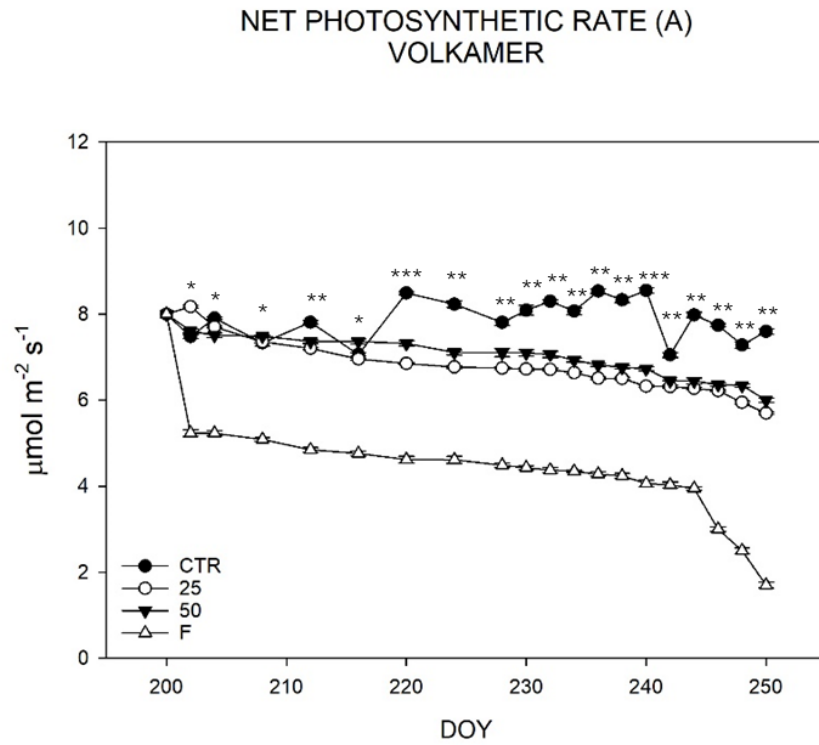


Fig. 16: Tasso fotosintetico (A) registrato durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

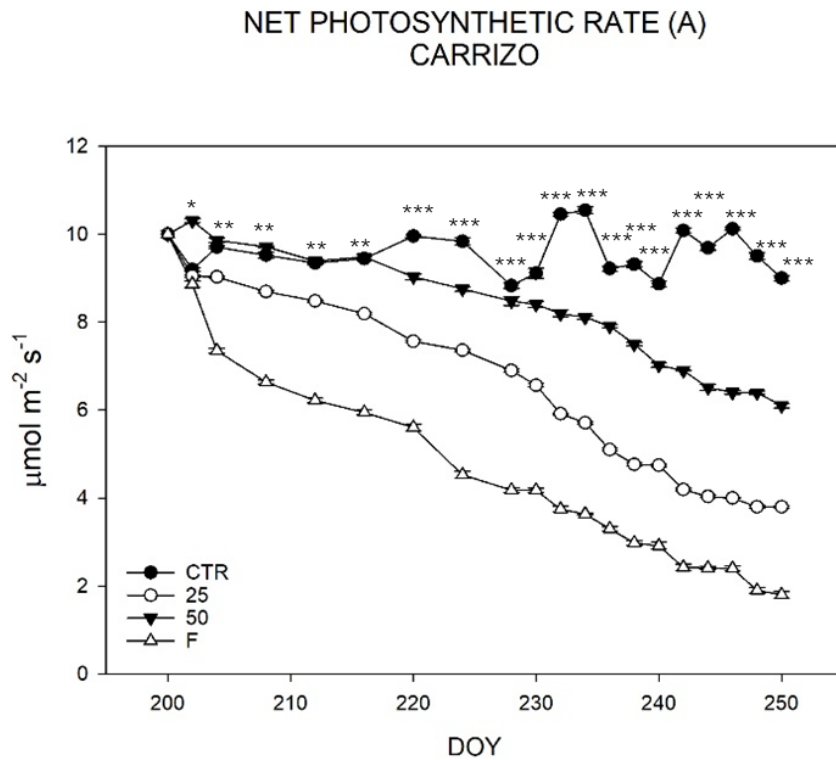


Fig. 17: Tasso fotosintetico (A) registrato durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrangue carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.7. Tasso traspirativo (E)

Relativamente al tasso traspirativo, i valori più bassi del 2023 sono stati registrati nelle piante soggette a DIC 25 e forzatura (F) se comparate con la tesi di controllo CTR e la tesi a DIC 50.

Le differenze biometriche tra le piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. cv *Femminello Zagara bianca* innestate su *Volkamer* e *Carrizo* sono evidenti e di seguito discusse ma è possibile supporre come il *Volkamer*, che risulta avere una maggior LAD ma un E generalmente più basso, arrivando più velocemente al punto d'appassimento di -3.1 MPa, con conseguente osmoregolazione carente. Inversamente, le piante innestate su *Carrizo*, con un E significativamente più elevato ma LAD più bassa, risultavano avere un tasso di consumo idrico minore con conseguente punto di appassimento raggiunto in maggior tempo.

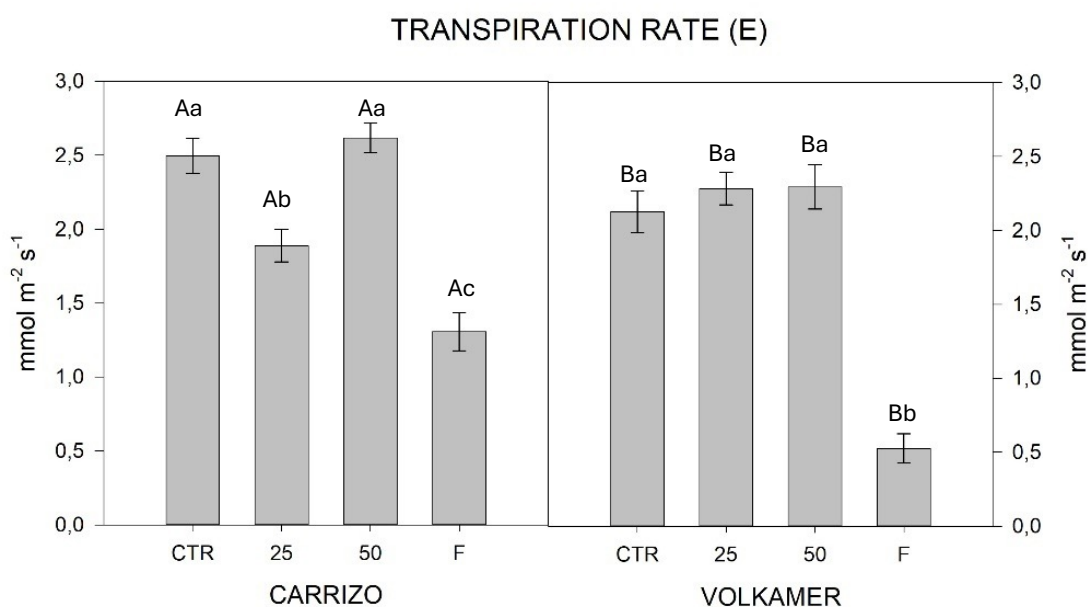


Fig. 18: Tasso traspirativo (E) registrato al termine della *forzatura* durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrangue carrizo* e *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di, lettere maiuscole diverse indicano differenze significative tra i portinnesti e tra i trattamenti, mentre lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti per ogni portinnesto.

In Figg. 19-20 è possibile osservare l'andamento durante l'annata 2024, in cui i trend per entrambi i portinnesti riconfermano i dati ottenuti durante il 2023 alla fine delle sperimentazioni, senza riportare differenze significative tra i due anni.

TRANSPIRATION RATE (E) CARRIZO

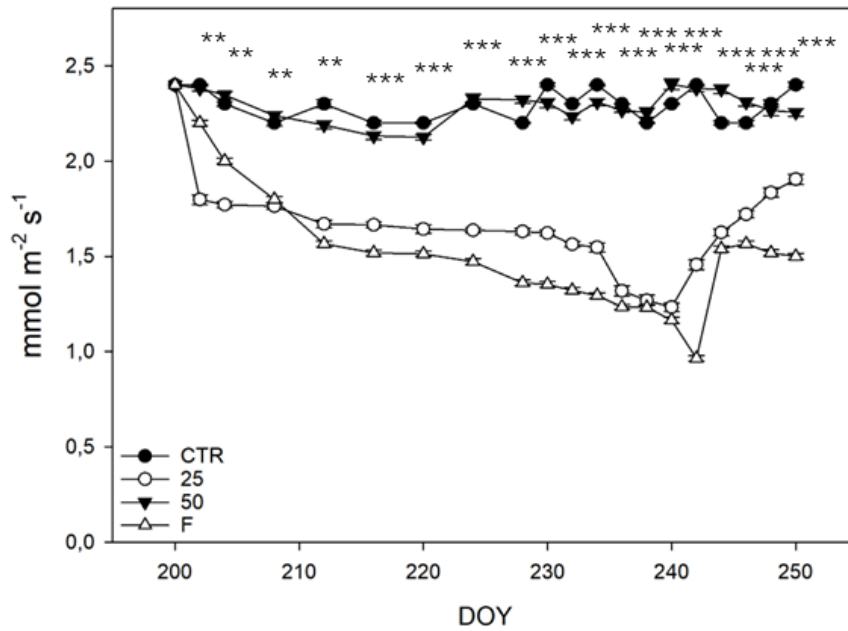


Fig. 19: Tasso traspirativo (E) registrato durante l'estate 2024 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrang carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

TRANSPIRATION RATE (E) VOLKAMER

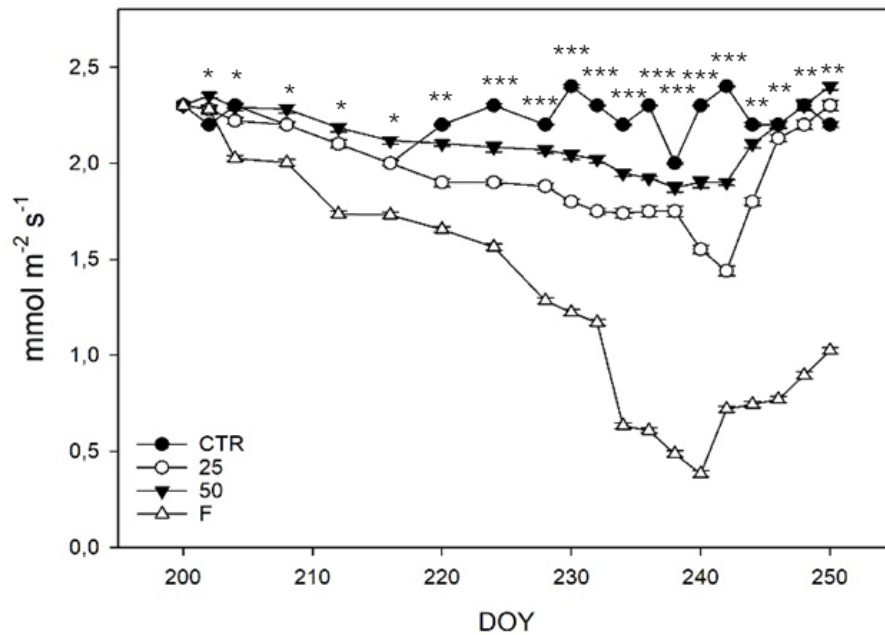


Fig. 20: Tasso traspirativo (E) registrato durante l'estate 2024 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La traspirazione risulta quindi essere dipesa maggiormente dalla maggiore densità fogliare delle piante innestate su *Volkamer* in quanto, la misurazione effettuata alla fine del periodo di analisi e una volta recuperato, dal punto di vista di potenziale del fusto. Il consumo di acqua, nel 2023, durante il periodo di analisi risultava variare tra 6 e 12 kg di acqua per vaso per le tesi innestate su *Carrizo*, rispettivamente per i campioni CTR e F, e 4,5 e 11,2 kg di acqua per le piante innestate su *Volkamer*. Valori significativamente inferiori sono stati registrati per le tesi 25 e 50 in entrambi i portinnesti (Figg. 19, 20). Differenze significative sono state riscontrate tra i due portinnesti durante il periodo di analisi. È noto che le differenze morfologiche tra le piante possono influenzare la loro resistenza allo stress idrico (Lei, Yin and Li, 2006), inoltre, va considerato che i valori di E qui riportati sono ottenuti da una misurazione specifica e puntuale, di valori che possono cambiare durante la giornata e che pertanto non possono essere totalmente rappresentativi dell'intera pianta, certo è però che il quadro generale ottenuto è da considerarsi veritiero anche alla luce della forte corrispondenza tra gli andamenti di E e della traspirazione, in quanto l'area della superficie fogliare totale e il tasso di traspirazione influenzano grandemente la velocità di assunzione di acqua, come riportato da Moya *et al.*, (2003). La differenza conferita dal portinnesto rafforzerebbe anche la ipotesi che ad un più rapido assorbimento corrisponde un apparato radicale più efficace, caratterizzato tendenzialmente da una maggiore densità, profondità e ramificazione radicale, caratteristiche del *Citrus volkameriana*. La grande eterogeneità osservata a livello di densità fogliare delle piante oggetto di sperimentazione risulta essere il maggiore determinante delle loro differenze, in accordo con quanto osservato da Romero *et al.* (2006). Per quanto osservato riguardo la massa fogliare e le curve di consumo idrico, i campioni di CTR risultano asportare maggiormente, grazie alla continua disponibilità idrica, seguite dalle piante F. le piante in regime di DIC 25 e 50, risultano avere valori più bassi, attingendo dagli strati di acqua disponibile, con moderate e continue asportazioni che permettono il controllo dell'aumento di potenziale. Tuttavia, non è stato possibile controllare totalmente il declino del potenziale idrico del fusto, che nell'intervallo DOY 230 – 250 subisce un moderato e costante aumento, senza però raggiungere le soglie estreme raggiunte invece dalle tesi forzate e permettendo di osservare una generale perdita di turgore delle foglie che non si traduce mai nel loro accartocciamento. Il potenziale (Ψ_{stem}) e la perdita di turgore generale vengono quindi così utilizzati come unico parametro per la ripresa delle irrigazioni. Il declino del potenziale potrebbe essere dovuto ad un accumulo di soluti che permettono di mantenere un turgore fogliare positivo per l'apertura stomatica e gli scambi gassosi che, in presenza di stress idrico lieve o moderato può coincidere con l'accumulo di soluti quali amminoacidi (prolina) e zuccheri (Syvertsen and Smith, 1983; Pérez-Pérez *et*

al., 2008). L'accumulo avviene passivamente per disidratazione fogliare e/o attivamente per loro sintesi (Bray, 1997). Fattispecie degli agrumi è però l'aumento di assorbimento di ioni inorganici che contribuiscono all'aggiustamento osmotico (García-Sánchez *et al.*, 2007).

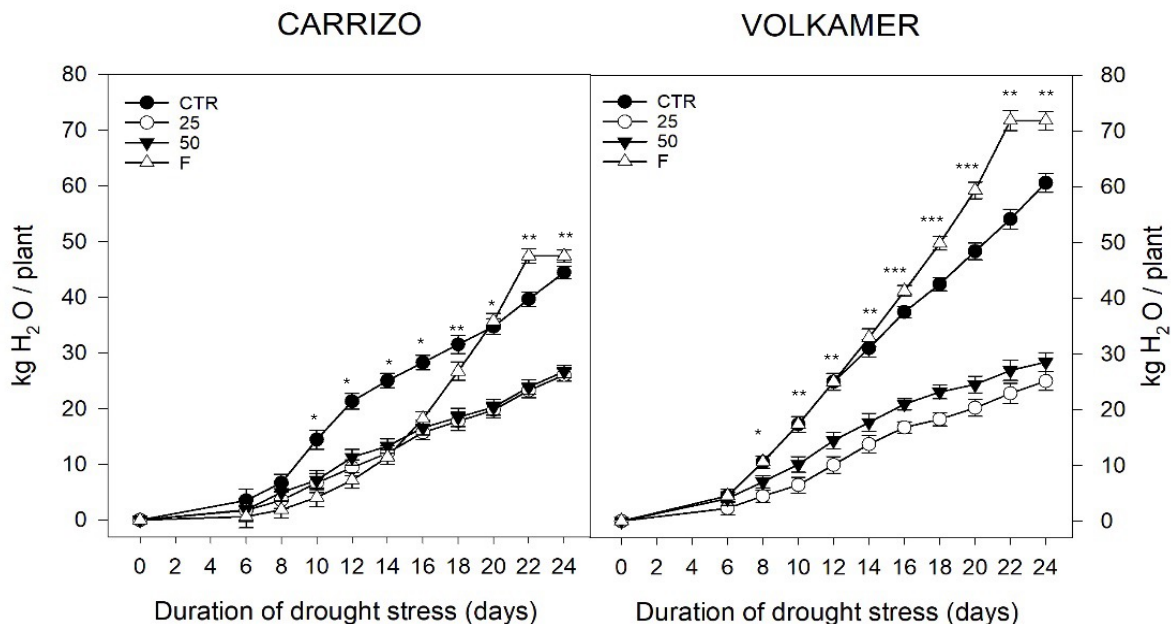


Fig. 21: Traspirazione cumulativa di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrange carrizo* e *Citrus volkameriana* durante il 2023. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.8. Efficienza d'uso dell'acqua (WUE)

Quanto su esposto trova corrispondenza anche all'analisi dell'efficienza uso dell'acqua (WUE), che raggiunge valori negativi nelle piante innestate su *Volkamer*, anche dopo la ripresa delle irrigazioni e che risulta avere, nella tesi DIC 25 delle piante innestate su *Carrizo* un valore di oltre l'80% inferiore rispetto ai campioni CTR.

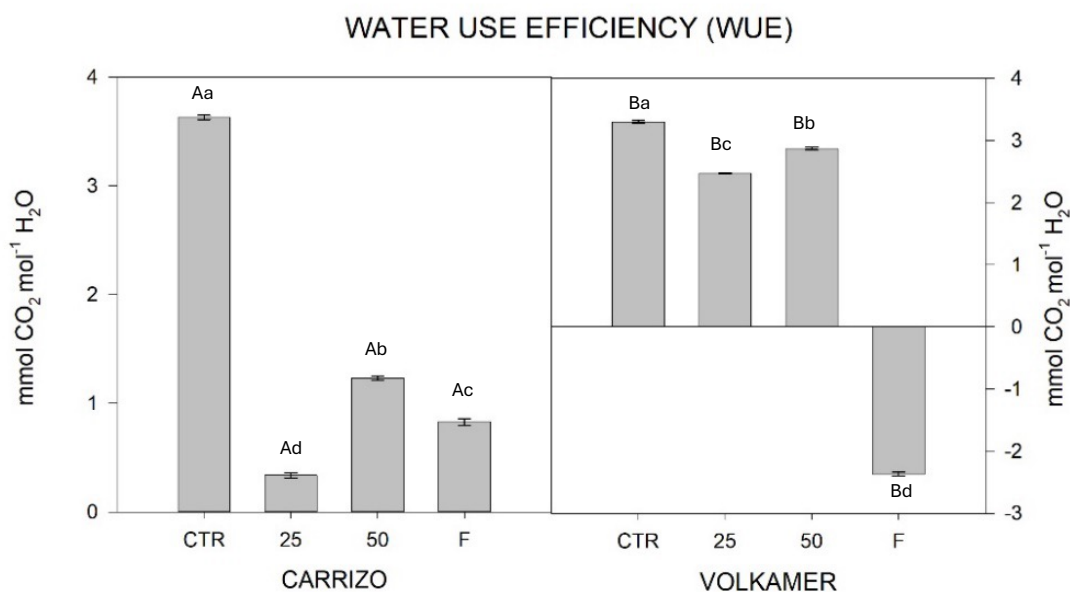


Fig. 22: Efficienza d'uso dell'acqua (WUE) registrata durante l'estate 2023 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrang carrizo* e *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere maiuscole diverse indicano differenze significative tra i portinnesti e tra i trattamenti, mentre lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti per ogni portinnesto.

Nel 2024 le analisi sono state ripetute secondo lo stesso schema, campionando, durante il periodo di stress idrico, i parametri legati agli scambi gassosi, per studiarne l'evoluzione.

Dal punto di vista del potenziale idrico del fusto, dai valori emersi, non risulta esserci stata una effettiva compromissione del sistema pianta, con simili trend riscontrati.

Considerando organicamente questi risultati è possibile dedurre come, nelle presenti condizioni sperimentali, le differenze biometriche giochino un ruolo fondamentale anche nella sopravvivenza allo stress idrico, e che la maggiore tolleranza indotta del *Carrizo*, al termine di questo periodo di stress sia correlata ad una maggiore efficienza nella regolazione osmotica con, sebbene valori più elevati di potenziale idrico, valori di E, A e gs migliori alla ripresa degli interventi irrigui, che, in conclusione lo identifica come il miglior candidato per l'utilizzo di strategie di DIC in sostituzione della *forzatura*.

WATER USE EFFICIENCY (WUE) VOLKAMER

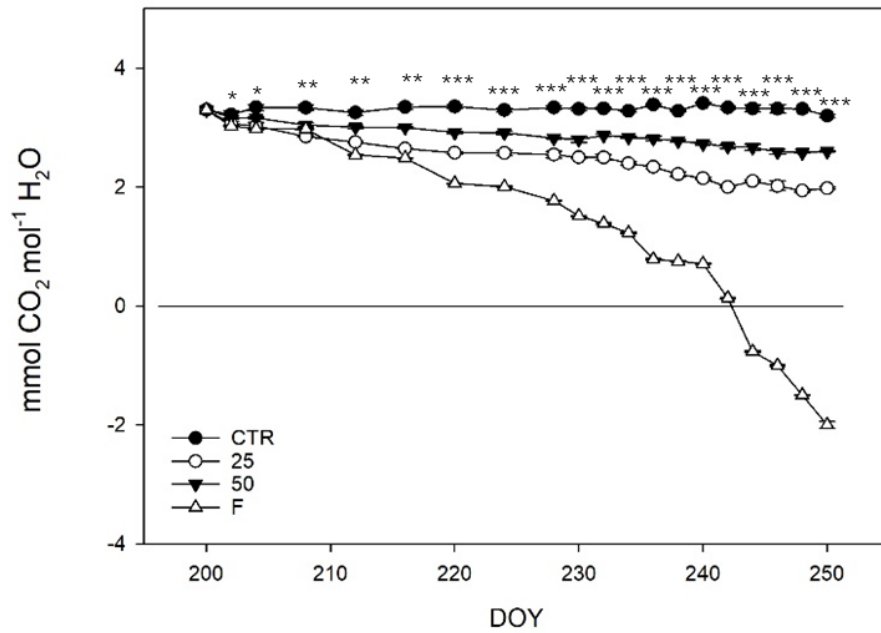


Fig. 23: Efficienza d'uso dell'acqua (WUE) registrata durante l'estate 2024 su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

WATER USE EFFICIENCY (WUE) CARRIZO

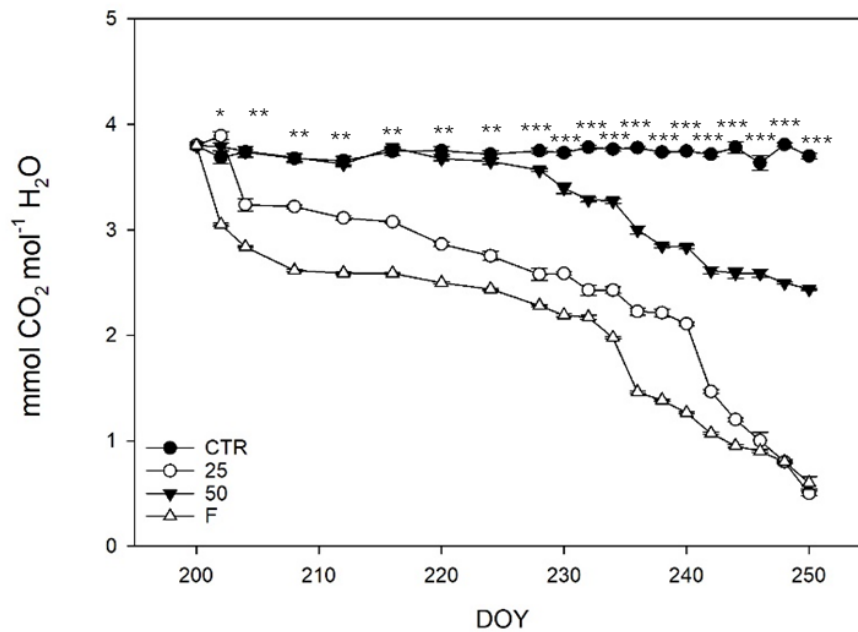


Fig. 24: Efficienza d'uso dell'acqua (WUE) registrata durante l'estate 2024 su piante di *Citrus limon* innestate su *Citrangue carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.9. Conclusioni

La forzatura, pur essendo una tecnica consolidata in agrumicoltura, richiede una gestione attenta e adattativa per evitare effetti negativi sullo stato fisiologico delle piante, soprattutto in condizioni di stress idrico. Le risposte osservate variano in base a portinnesto, cultivar e condizioni ambientali, evidenziando la necessità di strategie personalizzate e guidate da dati oggettivi. L'integrazione tra pratiche agronomiche e monitoraggio ambientale ha chiarito il ruolo delle dinamiche idrico-termiche del suolo nei processi fisiologici della pianta. La correlazione tra temperatura e contenuto idrico del suolo suggerisce l'utilizzo di questi parametri come indicatori dello stato del sistema suolo-pianta. Tuttavia, eventi climatici estremi possono comprometterne l'efficacia, richiedendo un costante adeguamento gestionale. I parametri fisiologici hanno mostrato una chiara sensibilità allo stress, con riduzioni significative di conduttanza stomatica, fotosintesi netta e traspirazione nei trattamenti con forzatura e deficit idrico controllato. Il trattamento DIC 50 ha mostrato una parziale capacità di recupero, ma la persistenza di effetti dopo la reidratazione indica possibili alterazioni ormonali. La riduzione della fotosintesi, soprattutto nei *Volkamer*, suggerisce anche limitazioni non stomatiche. Il tasso traspirativo ha riflesso le differenze biometriche tra portinnesti: il *Volkamer*, con maggiore area fogliare, ha mostrato un consumo idrico più rapido e minore osmoregolazione rispetto al *Carrizo*, che ha adottato una strategia più conservativa. Queste differenze, stabili tra le annate, indicano una componente genetica nella risposta allo stress. Nel complesso, la forzatura si conferma efficace solo se inserita in un sistema decisionale supportato da tecnologie di agricoltura di precisione. I risultati evidenziano l'importanza del portinnesto nella risposta fisiologica e aprono prospettive per la selezione di genotipi più efficienti nell'uso dell'acqua, in grado di sostenere la produttività anche in condizioni di deficit idrico.

CAPITOLO 4. DIAGNOSTICA FOGLIARE PER LA PREDIZIONE DEGLI STRESS ABIOTICI

Identificare una metodologia non distruttiva e portatile per la determinazione dello stress idrico delle piante in campo può essere rappresentata dall'impiego di strumenti che determinano il contenuto di polifenoli epidermici (EPhen) e clorofilla (Chl). Il contenuto in Chl è correlato al contenuto di N in quanto le proteine fotosintetiche rappresentano più della metà dell'N in una foglia (Evans, 1989). Il contenuto di Chl fogliare aumenta con l'apporto di N ed è basso quando N è limitante. La quantità di N influenza la sintesi di proteine e polifenoli grazie al precursore comune, l'amminoacido L-fenilalanina (PHE) (Jones and Hartley, 1999) con un meccanismo che prevede l'allocazione di PHE ai polifenoli quando la carenza di N aumenta poiché diminuisce la domanda di proteine per la crescita. Sebbene non esista un metodo ottico per valutare il contenuto di proteine fogliari e polifenoli *in situ* è stato dimostrato che i contenuti di Chl ed EPhen possono essere utilizzati per rappresentare queste classi di composti anche mediante tecniche ottiche (Cartelat *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2006). Il Dualex 4 (Force-A, Orsay, Francia) è un sensore portatile di fluorescenza fogliare ed è stato impiegato negli ultimi anni per monitorare la fisiologia delle piante ed effettuare la diagnosi di stato dell'N (Cerovic *et al.*, 2012). Oltre la misurazione del contenuto in Chl effettuata mediante la trasmittanza fogliare, il Dualex può effettuare il contenuto epidermico in flavonoidi (Flav) comparando la fluorescenza della Chl indotta dalla eccitazione ultra-violetta (UV) a 375 nm con la luce rossa indotta a 650 nm (Meyer *et al.*, 2006) fornendo un rapporto Chl/Flav denominato indice di bilancio dell'azoto (NBI). Gli EPhen sono principalmente flavonoidi glicosilati idrosolubili conservati in vacuoli e acidi idrossicinnamici legati alle pareti cellulari. Assorbono unicamente le radiazioni UV e la luce rossa funge da riferimento poiché attraversa l'epidermide senza essere assorbita per raggiungere Chl nel mesofillo. I valori stimati dal Dualex sono basati sull'area e incorporano due variabili: (Bilger *et al.*, 1997; Bilger, Johnsen and Schreiber, 2001)

1. Proporzione di massa secca delle foglie investita da Chl o EPhen corrispondente all'allocazione di PHNE per biosintesi di proteine e polifenoli
2. Accumulo di massa secca per unità di superficie in cui Chl ed EPhen sono diluite (Meyer *et al.*, 2006).

Secondo (Cartelat *et al.*, 2005), è stata dimostrata la forte relazione lineare tra fenoli (Phen) misurati dal Dualex e concentrazione dell'N fogliare e Phen e indice di nutrimento dell'N. tuttavia, i fattori di stress possono eventualmente modificare il contenuto di alcuni composti come i pigmenti fogliari modificando le proprietà di fluorescenza monitorate dalle

tecnologie di *proximal* e *remote sensing*. Numerosi studi in numerose colture hanno dimostrato l'efficienza dell'uso della *sensing technology* della fluorescenza per valutare la dotazione di N nelle colture. In uno studio sono stati calibrati, con Dualex, tre indici ottici (Chl, Flav e NBI) contro la LNC di vite (*Vitis vinifera* L.) verificando che l'NBI era ottimale per stimare l'LNC con un errore quadrato medio (RMSE) inferiore a 2 mg di peso secco di N g⁻¹ (Cerovic *et al.*, 2015). Correlazioni positive sono state riscontrate anche tra i parametri di fluorescenza e concentrazione fogliare di N (LNC) ed è stato inoltre dimostrata la correlazione lineare tra NBI e NBI1 e LNC basati sul sensore di fluorescenza (Agati *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2021).

Come è noto, le piante rispondono allo stress idrico attraverso una serie di cambiamenti fisiologici, cellulari e molecolari per la sopravvivenza. La regolamentazione del trasporto idrico e la fotosintesi svolgono ruoli cruciali nel migliorare la tolleranza alla siccità delle piante. L'azoto (N, ammonio e nitrato) è un macronutriente essenziale per le piante e può influenzare molti aspetti della crescita delle piante e delle vie metaboliche, comprese le relazioni idriche e la fotosintesi. (Guo *et al.*, 2007; Xu, Zhou and Shimizu, 2010; Wang *et al.*, 2014). Attraverso l'impiego di un Dualex 4 è stato quindi possibile quantificare lo stato di LNC.

I flavonoidi derivati dagli agrumi svolgono ruoli importanti nella regolazione delle condizioni fisiologiche delle piante di agrumi, inclusi i cambiamenti di colore di fiori e frutti, lo sviluppo del sapore e la fisiologia antistress. È noto infatti che le piante possiedono centinaia di metaboliti secondari o specializzati (PSMs) che giocano un ruolo cruciale dal punto di vista ecofisiologico vista la loro implicazione nell'interazione pianta-ambiente e nella difesa delle piante nei confronti degli stress ambientali (Yang *et al.*, 2018). I flavonoidi rappresentano la più grande classe di polifenoli largamente presenti nel regno delle piante come grande gruppo di PSMs prodotti costitutivamente o a seguito di induzione da parte di stress ambientali (Treutter, 2006). Il ruolo dei flavonoidi nella protezione dallo stress idrico e UV sono stati suggeriti da recenti studi che evidenziano la variazione mensile del contenuto in polifenoli con livelli più elevati in estate a mezzogiorno con siccità, temperature e radiazione UV ai massimi livelli (Gori *et al.*, 2020). I flavonoidi presentano un ampio spettro di attività biologiche nelle piante che è stata correlata alla loro diversità chimica e può essere collegata alla loro localizzazione all'interno dei tessuti fogliari, come affrontato più avanti in questa revisione. Partecipano a molte attività cellulari come la segnalazione, il trasporto di auxine e la pigmentazione (Peer and Murphy, 2007; Morita *et al.*, 2014; Gayomba, Watkins and Muday, 2017). Una delle funzioni più evidenziate dei flavonoidi è la protezione delle piante contro gli stress abiotici (ad esempio, siccità, salinità, radiazioni UV e calore) e

biotici (ad esempio, attacchi di insetti e agenti patogeni) (Lattanzio, Lattanzino and Cardinali, 2006; Sharma and Rao, 2015; Naikoo *et al.*, 2019). Anche le antocianine e le proantocianidine, dimostrano sostanziali proprietà antiossidanti e sono cruciali per proteggere le strutture subcellulari sia dagli stress abiotici che biotici (Ghafar *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2019). Le foglie di agrumi sintetizzano una varietà di metaboliti secondari che fungono da linea di difesa secondaria disintossicando i ROS derivanti da vari stress (Zandalinas *et al.*, 2017). È stato recentemente osservato che le specie di agrumi con alti livelli di flavonoidi o quelle che sintetizzano rapidamente i flavonoidi dopo lo stress da siccità sono più in grado di far fronte a tali condizioni rispetto a quelle con meno metaboliti o sintesi ritardata di flavonoidi (Rao *et al.*, 2021).

4.1. Materiali e metodi

Le analisi sono state eseguite dal 19 luglio 2023 (DOY 200) al 10 settembre 2023 (DOY 253) e dal 18 luglio 2024 (DOY 200) al 6 settembre 2024 (DOY 250). Il disegno sperimentale consisteva in 4 differenti regimi irrigui per entrambi i portinnesti. Tre foglie mature per ciascuna delle sei repliche delle quattro tesi in entrambi i portinnesti sono state utilizzate come singola replica e i dati letti in duplicato per ogni data di campionamento (n=864 per il 2023, n=1440 per il 2024). L'analisi della varianza è stata effettuata (Systat 13.0). La significatività del dato ($p \leq 0.05$) è stata valutata mediante test di Tukey.

4.2. Risultati e discussioni

Lo studio dei parametri fisiologici e biochimici in risposta ai quattro diversi trattamenti applicati (F, 25, 50, CTR) nei portinnesti *Carrizo citrange* e *Citrus volkameriana* rivela dinamiche interessanti nella regolazione del metabolismo fogliare, con implicazioni rilevanti per la gestione agronomica degli agrumi. Le variabili analizzate – flavonoidi (FLAV), antociani (ANTH), clorofilla (CHL) e indice di bilancio azotato (NBI) – sono riconosciute come marcatori sensibili delle condizioni nutrizionali, fisiologiche e ambientali delle piante arboree (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).

4.3. Flavonoidi

I flavonoidi rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari coinvolti nella protezione contro stress ossidativo, eccesso di radiazione solare e patogeni. Nei dati analizzati (figg. 1, 2), si osserva un incremento drastico del contenuto di flavonoidi nelle ultime fasi del monitoraggio (da DOY 228 a DOY 250), specialmente nel portinnesto

Carrizo, dove i valori superano i 30 $\mu\text{g cm}^{-2}$ nei trattamenti con deficit idrico più severo. Questo aumento può essere interpretato come una risposta adattativa della pianta a uno stimolo ambientale progressivo o come un evento connesso alla maturazione fisiologica dei tessuti. Questo incremento suggerisce un'intensificazione della sintesi fenolica, probabilmente in risposta a stress ambientali cumulativi (es. radiazione UV, scarsità idrica). È noto che l'accumulo di flavonoidi nelle foglie è fortemente influenzato dall'intensità luminosa, dalla disponibilità di azoto e dalla senescenza (Gould, McKelvie and Markham, 2002). *Carrizo*, in particolare, mostra una maggiore capacità di accumulo rispetto a *Volkamer*, suggerendo una maggiore sensibilità fotoprotettiva o una differente regolazione del metabolismo fenolico. Risultati simili sono stati osservati in agrumi sottoposti a condizioni di deficit idrico o ad alte radiazioni, dove il portinnesto influenzava la risposta fenolica della pianta (Castle *et al.*, 2011). L'aumento consistente dei valori di FLAV nelle fasi finali, fino a oltre 30 $\mu\text{g cm}^{-2}$ in *Carrizo*, è coerente con la ben nota funzione fotoprotettiva dei flavonoidi, rilevabili grazie all'attenuazione della fluorescenza UV da parte della cuticola fogliare (Cerovic *et al.*, 2012). Il fatto che *Carrizo* mostri valori maggiori durante tutto il periodo di sperimentazione suggerisce una risposta metabolica più attiva. In entrambi i portinnesti, i valori iniziali risultano contenuti intorno a 0.6–1.2 $\mu\text{g cm}^{-2}$, coerentemente con uno stato fogliare giovane e fisiologicamente stabile. A partire dalle fasi intermedie (intorno a DOY 228), si osserva un incremento marcato, che nel caso di *Carrizo* raggiunge valori superiori a 33 $\mu\text{g cm}^{-2}$.

VOLKAMER

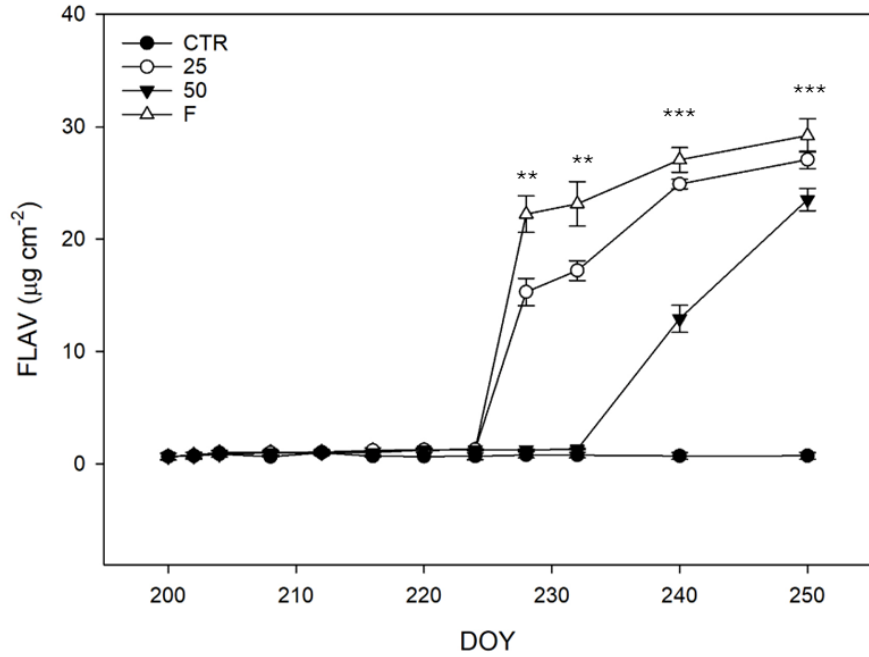


Fig. 1: Contenuto in flavonoidi (FLAV) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CARRIZO

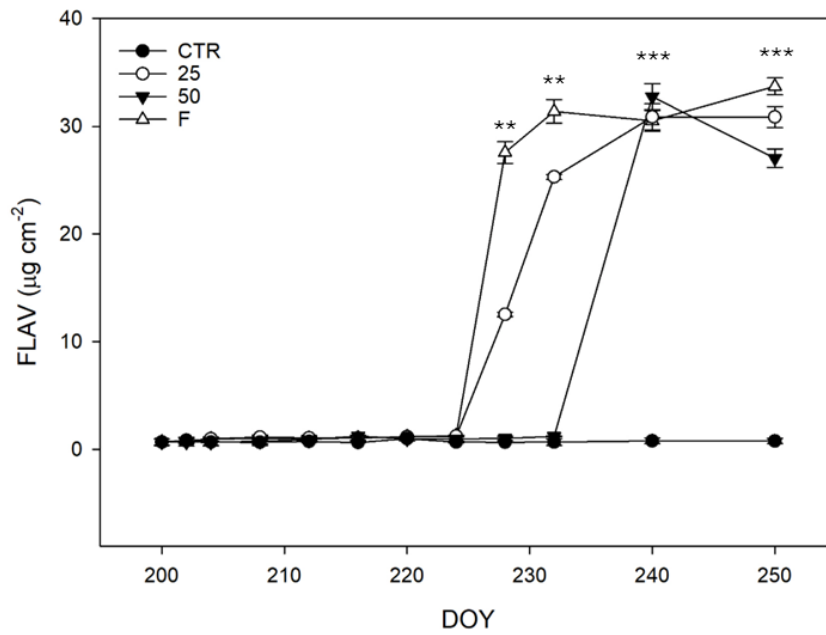


Fig. 2: Contenuto in flavonoidi (FLAV) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrangae carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Il sensore Dualex rileva i flavonoidi in base all'assorbimento della fluorescenza UV da parte dei composti fenolici accumulati nello strato epidermico fogliare (Cerovic et al., 2002). Pertanto, i valori osservati sono indicativi non solo della quantità assoluta di flavonoidi, ma anche della loro localizzazione strategica per la difesa fotoprotettiva, soprattutto in condizioni di radiazione intensa. Il fatto che *Carrizo* mostri un'accumulazione maggiore rispetto a *Volkamer* nelle fasi finali, indica un portinnesto potenzialmente più reattivo o dotato di una strategia antiossidante più pronunciata.

4.4. Clorofilla

Il contenuto in clorofilla è da tempo utilizzato come indicatore della vigoria fogliare e della capacità fotosintetica (Richardson et al., 2002). Nei dati forniti, *Carrizo* (fig.4) presenta costantemente valori di clorofilla superiori a quelli osservati in *Volkamer*, specialmente nelle fasi iniziali. I valori per *Carrizo* si attestano su livelli prossimi ai 36–38 $\mu\text{g cm}^{-2}$, mentre *Volkamer* si mantiene tra 28 e 30 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Questo suggerisce che *Carrizo* possieda un apparato fotosintetico più efficiente o più stabile nel tempo.

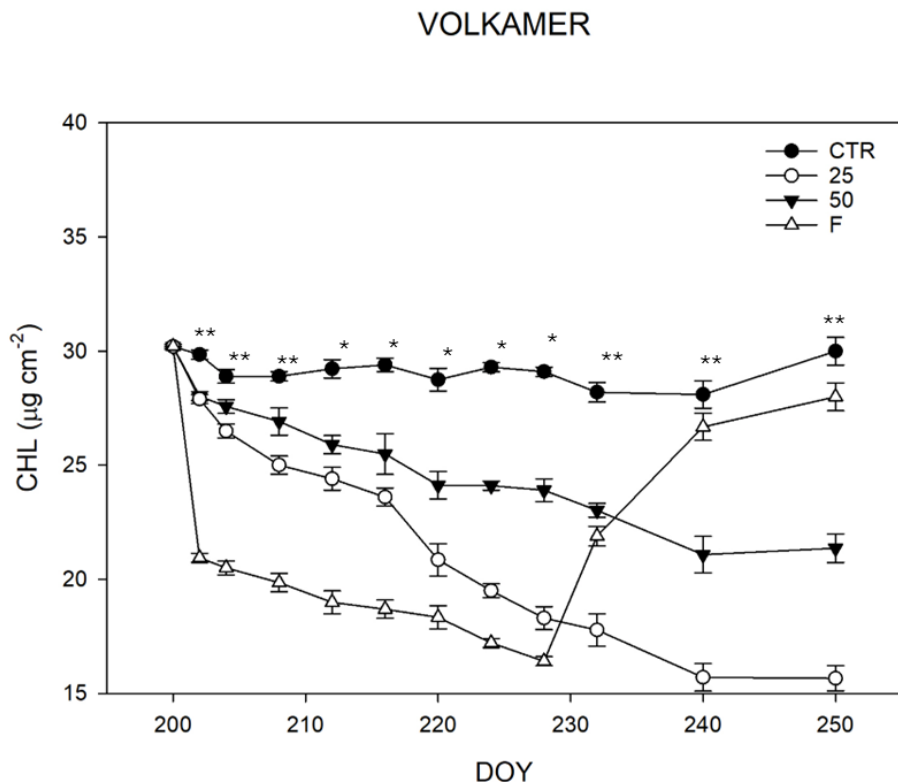


Fig. 3: Contenuto in clorofilla (CHL) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CARRIZO

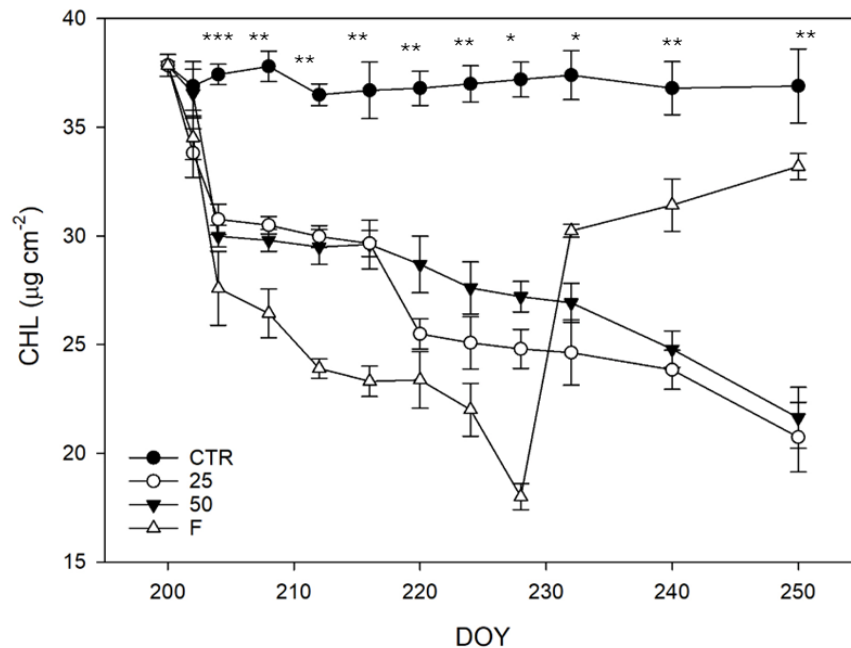


Fig. 4: Contenuto in clorofilla (CHL) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrange carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tale differenza può essere attribuita a una migliore capacità di assorbimento dell'azoto o a una struttura fogliare più efficiente, nello studio della nutrizione fogliare in diversi portinnesti di Citrus. I valori misurati di clorofilla evidenziano, specie nelle fasi iniziali, una maggiore densità clorofilliana in *Carrizo*, coerente con un apparato fotosintetico più sviluppato. I dati ottenuti mediante Dualex sono ben noti per avere una forte correlazione con le misure dirette di contenuto in clorofilla su base spettrofotometrica (Tremblay, Wang and Cerovic, 2012), validando così l'affidabilità delle letture. La clorofilla, rilevata dal Dualex mediante assorbimento della luce rossa e infrarossa, rappresenta un ottimo indicatore della vigoria fogliare e dello stato nutrizionale (Lichtenthaler and Buschmann, 2001). I dati mostrano che *Carrizo* mantiene livelli di clorofilla più elevati rispetto a *Volkamer* lungo tutte le fasi, con valori che oscillano tra 36 e 38 $\mu\text{g cm}^{-2}$ nelle fasi iniziali. Questa tendenza suggerisce un portinnesto con maggiore attività fotosintetica potenziale, coerente con una maggiore capacità di assorbimento di N e di una struttura fogliare più efficiente. I valori relativamente stabili nel tempo riflettono una condizione fogliare vigorosa e ben sviluppata, elemento particolarmente rilevante per la performance complessiva della pianta in condizioni di stress sub-cronico, come può avvenire con trattamenti idrici ridotti.

4.5. Antociani

Gli antociani, pigmenti fenolici appartenenti alla classe dei flavonoidi, sono noti per il loro ruolo protettivo nei confronti della radiazione UV e dello stress ossidativo, oltre che per la loro funzione nella segnalazione intra- e intercellulare (Chalker-Scott, 1999). Nei dati analizzati, i livelli di antociani aumentano gradualmente durante la progressione temporale, raggiungendo valori massimi di circa $1.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ a fine esperimento. Tale incremento, osservabile in entrambi i portinnesti, sembra rispondere a stimoli ambientali comuni. *Carrizo*, anche in questo caso, tende a presentare valori leggermente più elevati rispetto a *Volkamer*, suggerendo una maggiore attivazione della via biosintetica degli antociani. Tuttavia, le differenze tra trattamenti (F, 25, 50, CTR) risultano meno evidenti per questo parametro, a indicare che l'effetto del trattamento idrico, o della sua interazione con il portinnesto, non è il principale driver della risposta antocianica in questo contesto.

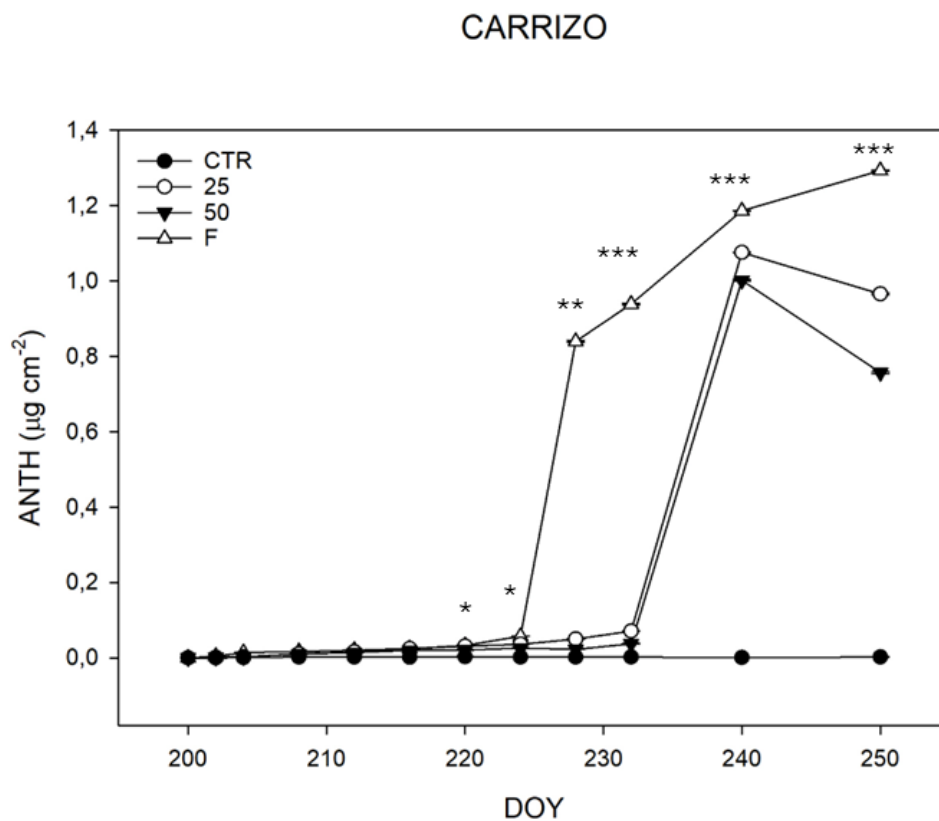


Fig. 5: Contenuto in antociani (ANTH) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrange carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

VOLKAMER

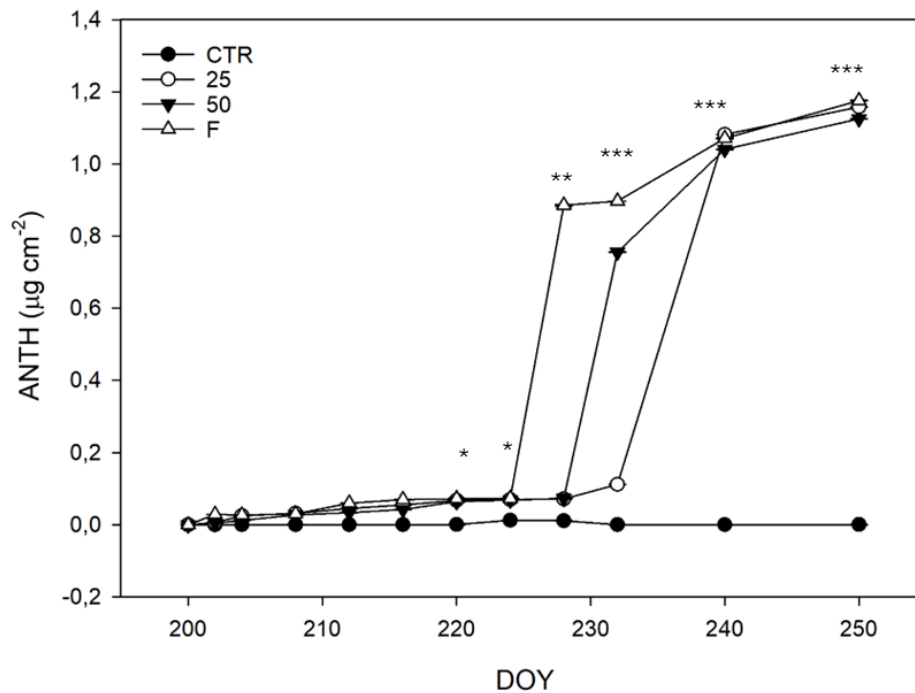


Fig. 6: Contenuto in antociani (ANTH) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

I valori di ANTH mostrano un andamento crescente, che trova corrispondenza con l'evidenza sperimentale che associa l'accumulo di antociani a condizioni di elevata radiazione, deficit idrico e senescenza (Hoch, Zeldin and McCown, 2001). La rilevazione Dualex, particolarmente sensibile ai pigmenti cuticolari, ha permesso di misurare questa variazione con precisione temporale. L'analisi dei risultati conferma la minore sensibilità allo stress in piante innestate su *Carrizo* che si rileva nella risposta all'irrigazione. Gli antociani, pigmenti fenolici rilevati dal Dualex tramite fluorescenza UV differenziale, mostrano un incremento graduale lungo la i campionamenti delle misure, partendo da valori prossimi allo zero fino a superare $1.2 \mu\text{g cm}^{-2}$ nelle fasi conclusive, in entrambi i portinnesti. Questo pattern è compatibile con la fisiologia nota degli agrumi, nei quali l'accumulo di antociani è spesso indotto da stress abiotici (freddo, radiazione, carenza idrica) oppure associato alla senescenza fogliare (Chalker-Scott, 1999). L'andamento registrato evidenzia come l'accumulo sia sincrono ma leggermente più marcato in *Carrizo*, a conferma di una maggiore reattività anche in termini di attivazione della via biosintetica degli antociani. Tuttavia, è importante sottolineare che i valori di ANTH risultano molto meno sensibili alla variazione

del trattamento (F, 25, 50, CTR) rispetto ad altre variabili, suggerendo che il fattore temporale o fenologico abbia un impatto maggiore della condizione ambientale specifica.

4.6. Nitrogen Balance Index (NBI)

L’NBI rappresenta un indice utile per valutare lo stato nutrizionale azotato della pianta e deriva dal rapporto tra l’assorbimento di clorofilla e l’accumulo di flavonoidi (Cerovic *et al.*, 2012). In generale, un NBI elevato indica una pianta in stato nutrizionale favorevole, con buon contenuto in clorofilla e limitata sintesi di metaboliti secondari legati allo stress. I dati mostrano valori costantemente più alti in *Carrizo* (30–34) rispetto a *Volkamer* (24–25), in linea con quanto atteso sulla base del maggiore contenuto di clorofilla e della minore produzione relativa di flavonoidi nelle fasi precoci. *Carrizo* mantiene livelli di NBI più elevati in condizioni di stress rispetto ad altri portinnesti, a indicare una minore alterazione del bilancio nutrizionale. Il *Nitrogen Balance Index*, calcolato dal sensore sulla base del rapporto tra CLH e FLAV, è considerato uno degli indici più robusti per la valutazione dello stato nutrizionale azotato. I dati mostrano che *Carrizo* mantiene valori di NBI superiori lungo tutta la progressione temporale, suggerendo una maggiore efficienza nell’assimilazione e nella distribuzione dell’azoto. Tali risultati sono coerenti con quanto riportato per portinnesti più vigorosi o con maggiore affinità radicale (Jifon and Syvertsen, 2003). Il *Nitrogen Balance Index* è forse il parametro più sintetico e fisiologicamente informativo tra quelli forniti dal Dualex. Calcolato come rapporto tra clorofilla (CHL) e flavonoidi (FLAV), riflette lo stato di equilibrio tra metabolismo primario (associato all’azoto) e secondario (associato alla difesa). I dati mostrano in modo chiaro che *Carrizo* mantiene un NBI più elevato lungo tutti i campionamenti, con valori attorno a 30–34 DU, mentre *Volkamer* rimane stabilmente tra 24 e 25 DU.

VOLKAMER

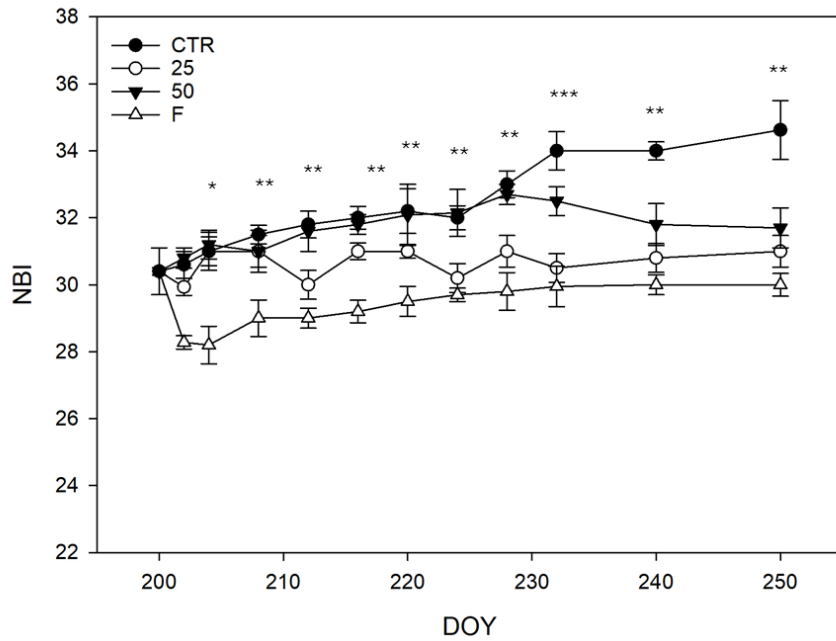


Fig. 7: Indice di bilancio dell'azoto (NBI) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CARRIZO

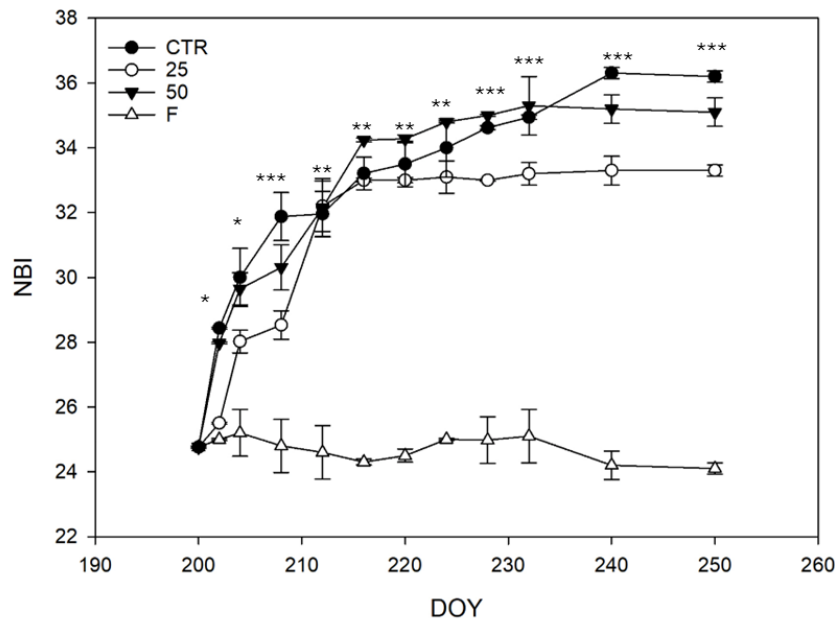


Fig. 8: Indice di bilancio dell'azoto (NBI) espresso in Dualex units (DU) registrato durante l'estate 2023 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrange carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Gli asterischi indicano il livello di significatività: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Questa differenza è interpretabile come una maggiore efficienza nutrizionale in *Carrizo*, sia in termini di assorbimento che di utilizzo dell'azoto. La capacità di mantenere alto il rapporto CHL/FLAV anche in presenza di stress suggerisce un metabolismo fogliare più orientato alla crescita e alla funzionalità fotosintetica, piuttosto che alla sola difesa. Tale osservazione è coerente con i risultati di studi precedenti che evidenziano una relazione diretta tra NBI e produttività vegetale in diverse specie arboree (Cerovic *et al.*, 2012; Tremblay, Wang and Cerovic, 2012) Il *Nitrogen Balance Index*, calcolato come rapporto tra clorofilla e flavonoidi, rappresenta un indicatore sintetico del bilancio nutrizionale della foglia. Sotto condizioni di stress idrico (in particolare 25% e F), si osserva una netta riduzione dell'NBI, soprattutto in *Volkamer*, il che riflette una deviazione del metabolismo fogliare dalla crescita verso la difesa. *Carrizo*, al contrario, ha mantenuto valori di NBI elevati anche sotto deficit idrico moderato, suggerendo una maggiore efficienza nutrizionale o una migliore gestione del metabolismo azotato e fenolico (Cerovic *et al.*, 2012). Questo risultato è di particolare rilevanza agronomica, poiché un NBI elevato in condizioni di limitazione idrica indica resilienza metabolica e maggiore probabilità di mantenere una produzione fotosintetica attiva.

Durante il 2024 sono state ripetute le analisi che non hanno mostrato variazioni significative rispetto al 2023 e che sono di seguito riportate in tabella 1 A e B.

1.A <i>Citrus limon</i> ((L.) Burm f.) x <i>Citrango carrizo</i>					
Parametro	Anno	CTR	25	50	F
CHL ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2023	32,21±0,83 a	31,34±1,02 ab	31,52±1,01 ab	30,39±1,01 b
	2024	31,85±0,90 a	31,02±0,94 ab	31,18±1,05 ab	30,10±0,98 b
FLAV ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2023	10,87±2,47 a	9,75±2,23 ab	9,50±2,21 ab	8,97±2,04 b
	2024	10,40±2,35 a	9,55±2,18 ab	9,22±2,32 ab	8,80±1,98 b
ANTH ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2023	0,18±0,068 b	0,20±0,069 ab	0,19±0,067 ab	0,27±0,085 a
	2024	0,17±0,070 b	0,22±0,075 ab	0,21±0,072 ab	0,26±0,081 a
NBI (DU)	2023	30,38±1,84 a	28,20±1,88 b	28,10±1,42 b	27,77±1,72 b
	2024	29,90±1,77 a	27,95±1,64 b	27,60±1,55 b	27,30±1,48 b

1.B <i>Citrus limon</i> ((L.) Burm. f.) x <i>Citrus volkameriana</i>					
Parametro	Anno	CTR	25	50	F
CHL ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2023	28,95±0,81 a	25,88±1,00 b	27,30±1,00 ab	23,88±1,07 c
	2024	28,65±0,90 a	25,60±1,08 b	27,00±0,95 ab	24,20±1,12 c
FLAV ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2023	7,57±1,67 b	8,56±1,90 ab	8,65±1,93 ab	9,04±2,01 a
	2024	7,25±1,72 b	8,40±1,85 ab	8,45±2,00 ab	8,85±2,05 a
ANTH ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	2023	0,19±0,062 b	0,31±0,077 a	0,29±0,074 ab	0,31±0,080 a
	2024	0,21±0,068 b	0,29±0,079 a	0,28±0,078 ab	0,30±0,085 a
NBI (DU)	2023	23,75±0,92 a	21,45±1,10 b	22,15±1,36 ab	19,17±1,03 c
	2024	23,40±0,89 a	21,60±1,05 b	21,95±1,45 ab	19,30±1,11 c

Tab.1: Tabella riassuntiva dei valori medi di clorofilla (CHL), flavonoidi (FLAV), antociani (ANTH) ($\mu\text{g cm}^{-2}$) e nitrogen balance index (NBI) relativi alle estati 2023 – 2024 su foglie di piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. (1.A) e *Citrus volkameriana* (1.B). Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Differenti lettere indicano differenze significative tra i trattamenti.

4.7. Conclusioni

I risultati evidenziano una risposta fisiologica più favorevole in *Carrizo* rispetto a *Volkameriana*, con valori superiori di clorofilla e NBI lungo tutto il periodo, anche sotto condizioni di deficit idrico. Le tesi più severe (F e 25) hanno indotto un marcato accumulo di flavonoidi, soprattutto in *Carrizo*, indicando un'attivazione più efficace delle difese antiossidanti. Gli antociani, pur meno sensibili al trattamento, hanno mostrato un incremento legato alla maturazione e allo stress cumulativo. Nel complesso, *Carrizo* ha mantenuto un miglior bilancio tra crescita e difesa, suggerendo una maggiore resilienza alle limitazioni idriche. Le risposte sono risultate coerenti tra 2023 e 2024, confermando la stabilità dei risultati.

CAPITOLO 5. MONITORAGGIO DELLA BIOMETRIA ED EFFETTO DEL DEFICIT IDRICO CONSIDERATI DUE DIVERSI PORTINNESTI

Una riduzione, anche lieve, dell'acqua destinata all'irrigazione può incrementare significativamente la disponibilità idrica per altri impieghi. Considerando l'aumento continuo dei costi associati all'irrigazione, diventa imprescindibile rivedere le pratiche irrigue per garantire rese sostenibili, anche in condizioni di disponibilità idrica inferiore al fabbisogno ottimale delle piante. In quest'ottica, risulta fondamentale comprendere gli effetti del deficit idrico non solo sulla resa e sulla qualità dei frutti, ma anche sull'accrescimento vegetativo. Tra le strategie volte a ottimizzare l'uso dell'acqua vi è l'irrigazione a deficit controllato (RDI), che mira a migliorare l'efficienza irrigua senza compromettere la produttività. Un parametro chiave nella valutazione della risposta delle colture a tali strategie è l'altezza della chioma, largamente impiegata nella fenotipizzazione (Moles *et al.*, 2009). Essa rappresenta un indicatore rilevante della biomassa vegetale e del contenuto di carbonio, oltre a fornire informazioni sulla risposta delle piante agli input ambientali e gestionali. L'altezza delle piante è influenzata da fattori genetici, ambientali e agronomici. In ecologia vegetale, essa è associata alla capacità competitiva per la luce e alla regolazione dei processi fisiologici, quali la fotosintesi e l'evapotraspirazione. È stato proposto un legame generale tra altezza e biomassa attraverso differenti ecosistemi, utile per stimare le riserve di carbonio nei sistemi naturali (Proulx, 2021). In ambito agronomico, tale parametro è spesso utilizzato come indicatore dello stato di sviluppo e della produttività (Yin *et al.*, 2011), nonché per selezionare genotipi ad alta resa o resistenti a stress ambientali. La variabilità dell'altezza nelle fasi precoci di sviluppo può inoltre offrire indicazioni sulle potenzialità adattative delle colture. L'acqua è un elemento essenziale per lo sviluppo delle piante, ma la sua disponibilità limitata rappresenta una delle principali restrizioni alla distribuzione della vegetazione e alla produttività agricola. Nonostante i numerosi studi condotti per migliorare la resistenza delle piante agli stress idrici e ottimizzarne l'uso, i meccanismi fisiologici sottostanti restano solo parzialmente compresi. In fisiologia vegetale, il concetto di stress si riferisce a un insieme di risposte a condizioni ambientali avverse. Sebbene le piante presentino una certa flessibilità metabolica per adattarsi ai cambiamenti stagionali, eventi di stress improvvisi e intensi possono provocare danni strutturali e funzionali (Chaves *et al.*, 2002). Lo stress idrico, in particolare, altera l'equilibrio idrico della pianta, compromettendo il turgore cellulare e influenzando il potenziale idrico. Le risposte indotte includono modificazioni dell'espressione genica, del metabolismo e dello sviluppo, fino a influenzare la crescita e la produttività. Le piante hanno evoluto diversi meccanismi per mitigare tali effetti, soprattutto

in risposta a siccità, salinità e temperature elevate. Tra questi, la siccità rappresenta una delle sfide più rilevanti per l'agricoltura. Comprendere le risposte biochimiche e molecolari alla carenza d'acqua è essenziale per migliorare la tolleranza delle colture a tali condizioni. La resistenza alla siccità è associata a modificazioni biochimiche, quali l'accumulo di soluti compatibili e proteine specifiche, sintetizzate rapidamente in risposta allo stress osmotico. Le risposte fisiologiche al deficit idrico dipendono dall'intensità e dalla durata dello stress, influenzando processi fondamentali come la fotosintesi, la respirazione, il metabolismo dei nutrienti e la produzione ormonale (Reddy, Chaitanya and Vivekanandan, 2004). Tra gli effetti più comuni vi sono la chiusura stomatica, la riduzione dell'espansione cellulare e, nei casi estremi, l'inibizione della fotosintesi e la morte della pianta. Lo stress idrico agisce a diversi livelli di organizzazione, dalla cellula alla comunità vegetale. In particolare, limita l'espansione cellulare in misura maggiore rispetto alla divisione cellulare, compromettendo lo sviluppo della pianta. L'efficienza d'uso dell'acqua (WUE), definita come il rapporto tra biomassa prodotta e acqua consumata, costituisce un indicatore fondamentale della capacità adattativa delle piante. Un suo incremento può migliorare la produttività in ambienti con risorse idriche limitate. La scarsità idrica può derivare sia da un eccesso che da una carenza d'acqua, ma è quest'ultima, nota come stress da siccità, a rappresentare la condizione più comune e problematica, con implicazioni profonde sugli ecosistemi naturali e agricoli. Le risposte delle piante allo stress idrico variano in funzione dell'intensità e della durata dello stress, nonché della specie vegetale e della sua fase di sviluppo. Comprendere tali risposte è fondamentale per migliorare la tolleranza delle colture agli stress ambientali e garantire rese produttive sostenibili. La crescita è uno dei processi fisiologici più sensibili alla siccità, poiché la pressione di turgore deve superare una certa soglia affinché le cellule possano espandersi. La riduzione del turgore limita l'espansione cellulare e, di conseguenza, la crescita della pianta. La siccità è riconosciuta come uno dei principali fattori limitanti della produttività vegetale in molte regioni del mondo. Studi recenti hanno evidenziato che il tasso di crescita di numerose specie vegetali è direttamente proporzionale alla disponibilità di acqua nel suolo (Kameli and Lösel, 1995). Il deficit idrico influisce anche su diversi processi biochimici e fisiologici, tra cui la fotosintesi, la sintesi proteica e l'accumulo di soluti. La capacità di mantenere l'attività fotosintetica durante periodi di stress idrico e la rapidità di recupero della fotosintesi dopo la reidratazione sono fattori chiave nell'adattamento delle piante agli ambienti aridi. Per preservare la fotosintesi in condizioni di siccità, le piante hanno sviluppato meccanismi fisiologici che consentono di mantenere, almeno in parte, il turgore cellulare e l'apertura stomatica (Nunes, Catarino and Pinto, 1989). La riduzione del potenziale osmotico ($\Psi\pi$) in risposta allo stress idrico è un meccanismo ben documentato

attraverso cui molte specie vegetali si adattano alla scarsa disponibilità di acqua nel suolo (Morgan, 1984). Inoltre, un aumento dell'elasticità della parete cellulare può contribuire al mantenimento del turgore in condizioni di siccità (Patakas and Noitsakis, 1997). Studi più recenti hanno inoltre dimostrato che modificazioni anatomiche delle foglie possono influenzare i componenti della diffusione della CO₂ dalle cavità sottostomatiche ai siti di carbossilazione, contribuendo così al mantenimento del tasso fotosintetico nonostante una ridotta conduttanza stomatica (Evans, 1989). Le piante si adattano alla siccità principalmente attraverso meccanismi di regolazione osmotica, che consentono di mantenere il turgore cellulare e garantire la sopravvivenza in condizioni di stress severo. La riduzione dell'area fogliare dovuta alla scarsità d'acqua è una delle principali cause della diminuzione della resa, poiché limita la capacità fotosintetica della pianta (Chartzoulakis *et al.*, 2002). Il calo dell'altezza e della superficie fogliare in condizioni di deficit idrico è attribuito alla ridotta espansione cellulare e all'aumento della senescenza fogliare. Un uso efficiente dell'acqua può favorire una migliore regolazione metabolica della pianta, contribuendo alla crescita e alla produttività in specie arboree agroforestali. Oltre ai fattori genetici, diversi elementi interni ed esterni influenzano la crescita delle piante, rendendola un indicatore chiave della produttività agricola. La siccità può influenzare profondamente tutti gli aspetti della crescita, sia della parte epigea che di quella ipogea della pianta. La regolazione osmotica, ad esempio, permette di mantenere il turgore cellulare e favorire la crescita anche in condizioni di forte stress idrico. La riduzione dell'area fogliare dovuta allo stress idrico è un fattore determinante nella perdita di resa, poiché limita la fotosintesi. La diminuzione dell'altezza e dell'area fogliare è spesso correlata alla riduzione dell'espansione cellulare e all'aumento della senescenza fogliare, compromettendo ulteriormente la produttività della pianta. Il LiDAR (*Light Detection and Ranging*) è ampiamente utilizzato per analizzare le proprietà strutturali delle foreste, sia su scala locale che regionale, offrendo nuove opportunità per il monitoraggio e la gestione forestale (Lim *et al.*, 2003). Un parametro chiave nella valutazione della struttura della vegetazione è la densità dell'area fogliare (*Leaf Area Density*, LAD), definita come la somma dell'area fogliare su un solo lato per unità di volume [m²/m³]. Questo parametro influisce direttamente sull'efficienza di utilizzo della luce, sulla capacità fotosintetica e sugli scambi di gas all'interno della chioma (Oshio *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017). Inoltre, il LAD è essenziale per caratterizzare la struttura tridimensionale della copertura forestale in studi riguardanti il bilancio della radiazione (Leppä *et al.*, 2020), il microclima urbano (Tamaskani Esfehankalateh, Ngarambe and Yun, 2021) e il telerilevamento (Arnqvist, Freier and Dellwik, 2020). L'attenzione verso la stima dei parametri strutturali a livello di singolo albero è aumentata con il progresso delle tecniche di

telerilevamento ad alta risoluzione (Zheng and Moskal, 2012; Wei *et al.*, 2020). Tuttavia, ottenere stime precise e dettagliate della densità dell'area fogliare è una sfida, poiché questa variabile presenta un'elevata eterogeneità tra specie diverse e in condizioni ambientali differenti (Schuler and Smith, 1988). A differenza dell'indice di area fogliare (*Leaf Area Index*, LAI), definito su un piano bidimensionale, il LAD richiede informazioni tridimensionali aggiuntive, come il volume dell'albero o la lunghezza del percorso di penetrazione della radiazione. La densità dell'area fogliare [m^2/m^3] è comunemente utilizzata per quantificare la quantità di fogliame all'interno di un determinato volume. In teoria, questo parametro può essere determinato a diverse scale spaziali, dal livello di singola chioma fino alla scala di un'intera area boschiva. Il LAD può essere misurato direttamente in situ utilizzando approcci classificati come diretti, semi-diretti o indiretti. I metodi diretti implicano il conteggio e la misurazione delle foglie, ma risultano particolarmente dispendiosi in termini di tempo (Norman and Campbell, 1989). I metodi semi-diretti, come il metodo del quadrato inclinato di (Wilson, 1960), contano il numero di contatti delle foglie con delle sonde inserite nella chioma vegetale. I metodi indiretti, invece, si basano su tecniche ottiche passive, tra cui la fotografia emisferica (Jonckheere *et al.*, 2004). Queste metodologie sfruttano la legge di Beer-Lambert relativa alla trasmissione della luce attraverso un mezzo torbido, adattata per le coperture vegetali (Monsi, Saeki and Schortemeyer, 2005). Tuttavia, tali approcci presentano limiti legati alla precisione spaziale delle stime e alla necessità di correggere l'effetto di aggregazione della vegetazione (Nilson, 1971; Chen and Black, 1991) e di escludere il contributo di materiale non fotosintetico, come il legno (Kucharik, Norman and Gower, 1998). Negli ultimi anni, i sensori LiDAR si sono affermati come strumenti innovativi per la descrizione della struttura vegetale a vari livelli di dettaglio. Questi strumenti emettono un elevato numero di impulsi laser, generalmente nel campo del visibile o del vicino infrarosso, e registrano l'energia riflessa quando gli impulsi colpiscono un oggetto. Il tempo di volo o lo spostamento di fase dell'onda luminosa permette di calcolare la distanza dell'oggetto dal sensore. Conoscendo la direzione dell'impulso emesso, è possibile determinare la posizione di ogni punto nello spazio tridimensionale, creando così una nuvola di punti. Alla luce di quanto su esposto è risultato quindi necessario andare ad investigare quali fossero, a livello biometrico, gli effetti che i diversi trattamenti di DIC risultassero avere sull'accrescimento vegetativo. Parametri come il diametro del tronco all'altezza petto (DBH), l'altezza delle piante e la densità, l'area e il volume della chioma e la densità dell'area fogliare (LAD) sono stati determinati durante le due annate di sperimentazione mediante impiego del LiDAR. Il LiDAR, tecnologia basata sulla misurazione del tempo di volo di un impulso laser, è uno strumento efficace per la

determinazione di questo parametro (Omasa, Hosoi and Konishi, 2007). L'impiego di una tecnologia ampiamente diffusa in ambito agroforestale ha così permesso di quantificare, con un coefficiente di correlazione $R^2 = 0,95\%$ rispetto alle analisi effettuate manualmente, gli effetti dell'applicazione della *forzatura* su piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo* e *Citrus volkameriana*.

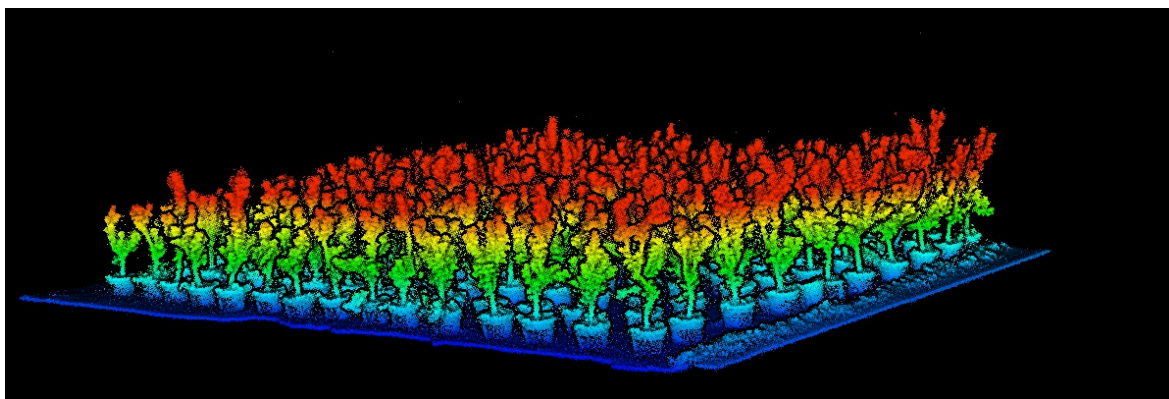


Fig.1: ricostruzione 3D del campo sperimentale mediante impiego di tecnologia LiDAR

5.1. Materiali e metodi

I rilievi sono stati effettuati a novembre 2023 e novembre 2024. Tutte le 160 piante facenti parte del campo sperimentale sono state oggetto del rilievo. I rilievi sono stati effettuati mediante personal laser scanner (PLS) GeoSLAM ZEB, con una fotocamera a 360 gradi (*NCTech iSTAR Pulsar*), permettendo di mappare le informazioni cromatiche della fotocamera su una nuvola di punti 3D. L'elaborazione della nuvola di punti è stata eseguita in modo completamente automatico, senza alcun intervento umano. Il software GeoSLAM Hub è stato impiegato per l'elaborazione della nuvola di punti del PLS, mentre il software ZEB Discovery Image Processor è stato utilizzato per unire le immagini acquisite dalla fotocamera a 360°. Le nuvole di punti colorate generate dai due sistemi sono state esportate in formato *las** e poi ritagliate manualmente per delimitare l'area di studio utilizzando il software *CloudCompare* (Girardeau-Montaut, 2015). I dati ritagliati sono stati salvati nuovamente in formato *las** per ulteriori analisi. Il rilevamento e la segmentazione degli alberi sono stati eseguiti automaticamente utilizzando algoritmi esistenti basati su clustering a densità variabile per il rilevamento e crescita regionale per la segmentazione (*seeded region growing*) (Gollob et al., 2020a; Ritter et al., 2017; Tockner et al., 2022). L'analisi della varianza è stata effettuata con il programma *Systat 13.0* per Windows). La significatività del dato ($p \leq 0.05$) è stata valutata mediante test di Tukey.

5.2. Diametro del fusto (DBH)

Il diametro del fusto a livello del petto (DBH) rappresenta un parametro morfologico chiave per la valutazione della crescita secondaria e della vigoria complessiva della pianta. Esso è direttamente associato all'attività del cambio vascolare e al bilancio tra produzione fotosintetica e destinazione degli assimilati verso i tessuti strutturali. In entrambe le annate sperimentali, il DBH è stato monitorato per valutare l'effetto congiunto del portinnesto e del regime irriguo. Come mostrato in figura 2 e 3, il maggiore incremento percentuale del DBH tra il 2023 e il 2024 è stato osservato nella tesi di controllo (CTR), sia per le piante innestate su *Carrizo* che su *Volkamer*, senza differenze significative tra i due portinnesti. In questa condizione, caratterizzata dall'assenza di forzature idriche, le piante hanno potuto esprimere pienamente il loro potenziale di crescita, con un incremento percentuale pari al +44,74% per *Carrizo* e +36,04% per *Volkamer*. Al contrario, la tesi F ha determinato i valori di accrescimento più contenuti: entrambi i portinnesti hanno riportato un DBH medio di 55 mm, con un incremento percentuale limitato al +32,79% per *Carrizo* e +29,97% per *Volkamer*.

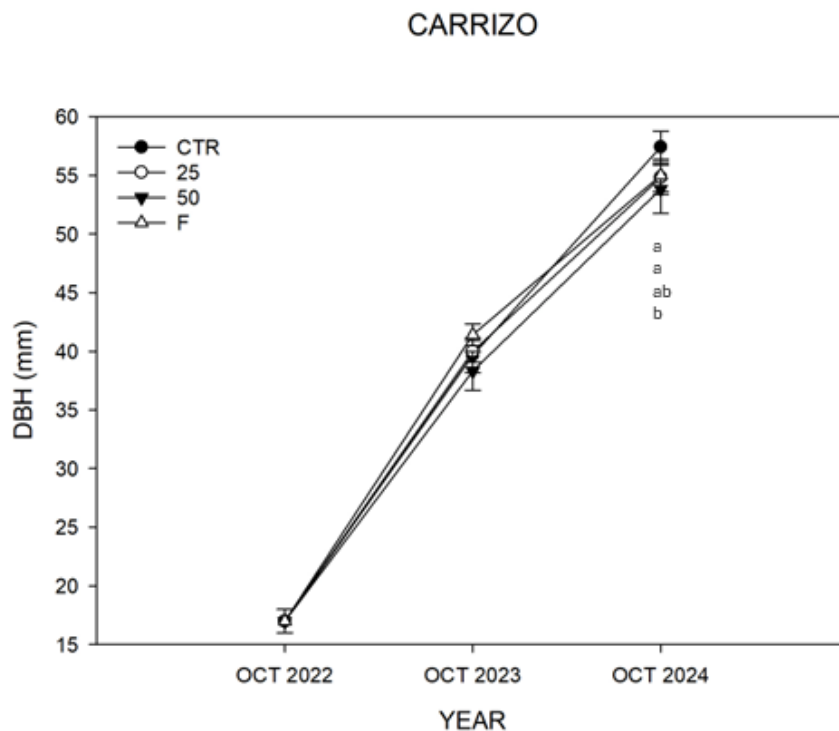


Fig. 2: Diametro del fusto ad altezza petto d'uomo (DBH) (mm) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

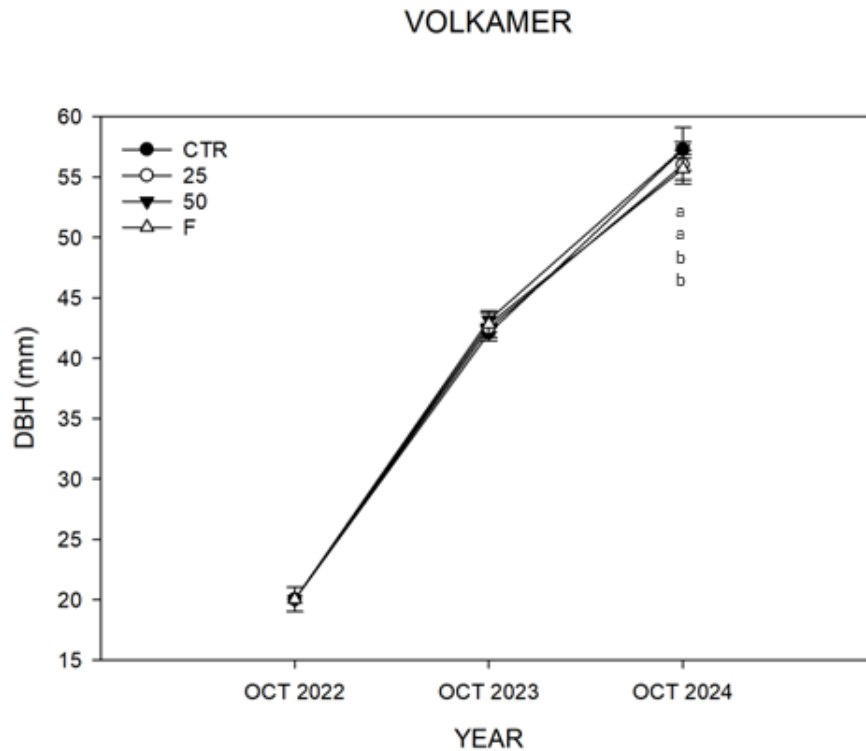


Fig. 3: Diametro del fusto ad altezza petto d'uomo (DBH) (mm) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

Tali dati confermano l'effetto inibitorio di uno stress idrico severo sull'attività cambiale e sull'accrescimento radiale, coerentemente con quanto riportato in studi condotti su agrumi e altre specie arboree da frutto (Barry, Castle and Davies, 2004). Nelle tesi a deficit idrico controllato (DIC), ovvero 25% e 50% della capacità di campo, si è osservata una differenza significativa tra i due portinnesti. Sebbene i tassi di accrescimento percentuale risultino superiori per *Carrizo*, i valori assoluti di DBH sono significativamente più elevati nelle piante innestate su *Volkamer*. In particolare, i valori medi registrati in *Volkamer* sono pari a 56 mm nella tesi 25 e 58 mm nella tesi 50, mentre *Carrizo* ha riportato valori medi rispettivamente di 53 mm e 54 mm. Gli incrementi percentuali di DBH in queste condizioni sono risultati più marcati in *Carrizo*, ma ciò non ha compensato la minore vigoria assoluta conferita da questo portinnesto. Questi risultati evidenziano il ruolo determinante del portinnesto sulla morfologia della pianta, in particolare sull'accrescimento secondario, e mostrano come le strategie di deficit idrico controllato (DIC), pur comportando una moderata riduzione dell'accrescimento rispetto al controllo, siano in grado di contenere gli effetti negativi tipici di una forzatura severa, garantendo comunque uno sviluppo strutturale equilibrato. In tale contesto, *Volkamer* conferma la sua capacità di sostenere l'accrescimento del fusto anche in condizioni idriche limitanti, comportamento già descritto in letteratura per

altri parametri biometrici e fisiologici in diverse cultivar di agrumi (Assar, Shekafandeh and Taghipour, 2021).

5.3. Altezza delle piante (H)

L'altezza della pianta rappresenta un parametro morfologico di rilievo, in quanto riflette non solo l'espansione longitudinale dell'asse principale, ma anche il bilancio complessivo tra assimilazione, traslocazione e allocazione degli zuccheri verso i tessuti di accrescimento. La crescita in altezza è particolarmente sensibile al portinnesto, in quanto quest'ultimo influenza sia la disponibilità idrica e nutrizionale che l'attività ormonale della pianta, modulando direttamente l'elongazione cellulare e la divisione nei tessuti meristemati apicali (Castle, 1995). L'analisi dell'altezza (H) conferma quanto osservato per il diametro del fusto (DBH): anche in questo caso, le differenze più marcate sono da attribuire al fattore portinnesto, con *Volkamer* che si distingue per un maggiore vigore vegetativo rispetto a *Carrizo*. Nel 2023, i valori massimi di altezza sono stati registrati nelle piante di controllo (CTR), con 2,07 m in *Carrizo* e 2,81 m in *Volkamer*. Tali differenze si sono mantenute anche nel 2024, con un accrescimento pari a +26,5% per *Carrizo* e +6,5% per *Volkamer*, che ha raggiunto un valore finale di 3,00 m, mentre *Carrizo* ha toccato i 2,60 m. Nelle piante sottoposte a forzatura (F), si osservano valori significativamente inferiori: 2,38 m per *Carrizo* e 2,29 m per *Volkamer* nel 2024. Tuttavia, sebbene i valori assoluti siano più bassi, l'accrescimento percentuale tra le due annate è stato relativamente elevato, con +32,16% per *Carrizo* e +9,74% per *Volkamer*. Ciò potrebbe riflettere una certa capacità di adattamento morfologico, in particolare nel primo portinnesto, che sembra più reattivo nel compensare lo stress idrico tramite una crescita verticale, anche a scapito della vigoria complessiva (García-Sánchez *et al.*, 2007). Particolarmente interessante è l'evoluzione osservata nelle tesi sottoposte a deficit idrico controllato (DIC). Nel caso di *Volkamer*, nel 2023 si erano osservate differenze significative tra le tesi, ma nel 2024 tali differenze tendono a scomparire, a conferma del fatto che le piante soggette a irrigazione limitata sono state in grado di colmare il divario iniziale. In particolare, si sono registrati incrementi pari a +15,38% nella tesi DIC 25 e +16,17% nella tesi DIC 50, con valori finali rispettivamente di 2,95 m e 3,02 m. Questo dato suggerisce che strategie irrigue conservative, se correttamente bilanciate, non compromettono l'accrescimento verticale nelle piante innestate su *Volkamer*, coerentemente con la letteratura che evidenzia una buona tolleranza idrica di questo portinnesto (Barry, Castle and Davies, 2004; García-Sánchez *et al.*, 2007). Al contrario, nelle piante innestate su *Carrizo*, il comportamento è stato più conservativo. Nel

2024, la tesi F e la tesi DIC 25 hanno evidenziato valori molto simili (2,38 m e 2,40 m), senza differenze statisticamente significative, suggerendo che *Carrizo* reagisce più lentamente o con maggiore contenimento alla limitazione idrica. Solo la tesi DIC 50 ha mostrato un valore di altezza più elevato (2,52 m), avvicinandosi a quello della tesi di controllo (2,60 m), pur senza uguagliarlo. Questo comportamento conferma che *Carrizo* è un portinnesto meno espansivo rispetto a *Volkamer*, e che le sue risposte morfologiche sono più sensibili ai livelli di irrigazione, con accrescimenti progressivi ma più contenuti, come già riportato per altri parametri biometrici.

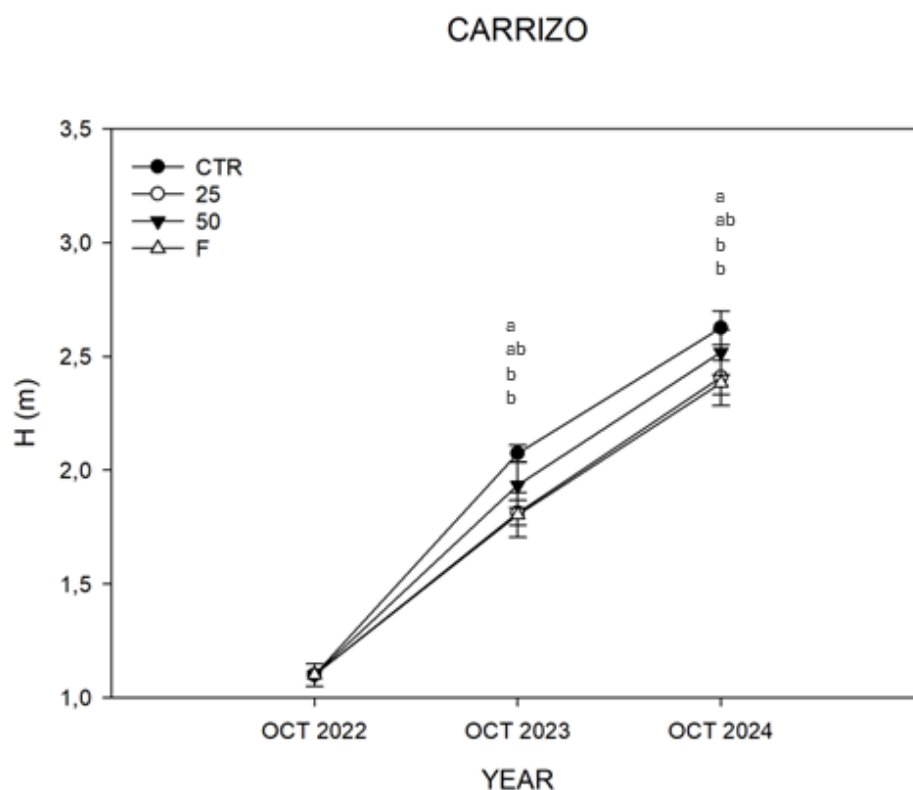


Fig. 4: Altezza delle piante (H) (m) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

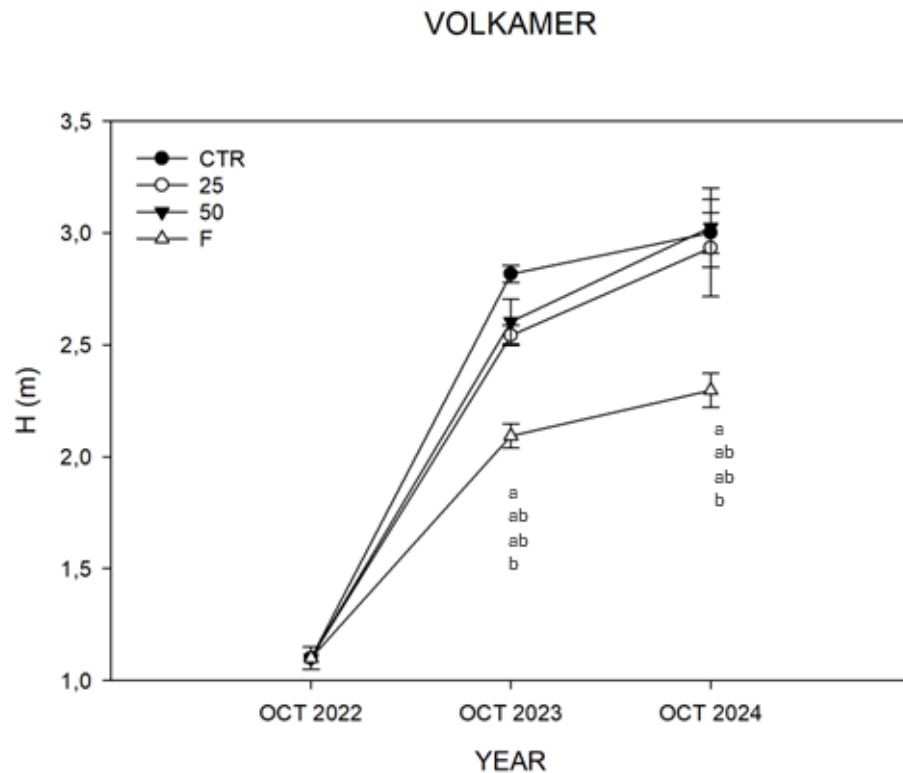


Fig. 5: Altezza delle piante (H) (m) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

Questi risultati confermano che il portinnesto rappresenta un determinante primario nella definizione della struttura vegetativa della pianta, influenzando in modo significativo anche l'altezza. *Volkamer* mostra una maggiore capacità di sostenere la crescita in altezza anche sotto DIC, mentre *Carrizo* manifesta risposte più conservative, con differenze più nette tra i trattamenti. Le strategie irrigue a deficit controllato si confermano efficaci nel mantenere buoni livelli di accrescimento verticale, soprattutto se associate a portinnesti vigorosi e fisiologicamente più tolleranti.

5.4. Diametro, area e volume della chioma

Durante i due anni di sperimentazione sono stati rilevati il diametro (D), l'area proiettata (A) e il volume (V) della chioma, tre parametri morfologici fondamentali per la valutazione della vigoria e dell'espansione vegetativa. Questi indici non solo forniscono una stima dello sviluppo strutturale delle piante, ma consentono di inferire aspetti funzionali legati all'intercettazione luminosa, alla produzione di biomassa e all'efficienza d'uso delle risorse. Il diametro della chioma rappresenta l'ampiezza laterale della copertura vegetativa e

costituisce un indicatore chiave dell'intercettazione della luce e della competizione spaziale tra le piante (Iglesias *et al.*, 2002). Inoltre, è strettamente legato all'efficienza di assimilazione dei fotosintetati, poiché piante con chiome più ampie tendono a disporre di una superficie fotosinteticamente attiva maggiore. L'area della chioma riflette la superficie esposta alla radiazione e condiziona direttamente i flussi di fotosintesi netta e lo scambio gassoso (Flexas *et al.*, 2012). Un aumento dell'area è generalmente associato a una maggiore capacità di fissazione del carbonio e, quindi, a un potenziale produttivo superiore (Medrano *et al.*, 2002). Infine, il volume della chioma quantifica lo spazio tridimensionale occupato dalla vegetazione, parametro utile per stimare indirettamente la biomassa, la vigoria complessiva e per orientare interventi agronomici quali la potatura e l'irrigazione (Syvertsen and Smith, 1983). I risultati ottenuti confermano l'effetto portinnesto su tutti e tre i parametri, con una maggiore vigoria delle piante innestate su *Volkamer*, rispetto a quelle innestate su *Carrizo*, in ciascuna delle quattro tesi considerate. Per quanto riguarda il diametro della chioma nel 2024, le piante della tesi di controllo (CTR) hanno raggiunto 1,11 m in *Carrizo* e 1,47 m in *Volkamer*, con incrementi percentuali rispetto al 2023 pari a +46,3% e +57,2%, rispettivamente. Tali dati testimoniano una crescita più sostenuta in *Volkamer* anche in assenza di trattamenti. All'interno del confronto tra tesi, su *Carrizo* sono state riscontrate differenze significative tra la tesi F (0,95 m) e la CTR (1,11 m), mentre le tesi 25 e 50 non hanno mostrato differenze statisticamente rilevanti rispetto alla tesi F, suggerendo che i livelli moderati di irrigazione non abbiano significativamente modificato l'espansione orizzontale della chioma. Diversa la tendenza osservata su *Volkamer*: il diametro nella tesi F (1,15 m) è risultato significativamente inferiore rispetto al controllo (1,47 m), ma non si sono osservate differenze significative tra le tesi DIC 25 (1,40 m) e DIC 50 (1,41 m) rispetto alla CTR, indicando che, per questo portinnesto, i trattamenti di deficit idrico controllato non hanno compromesso significativamente lo sviluppo laterale della chioma.

CARRIZO

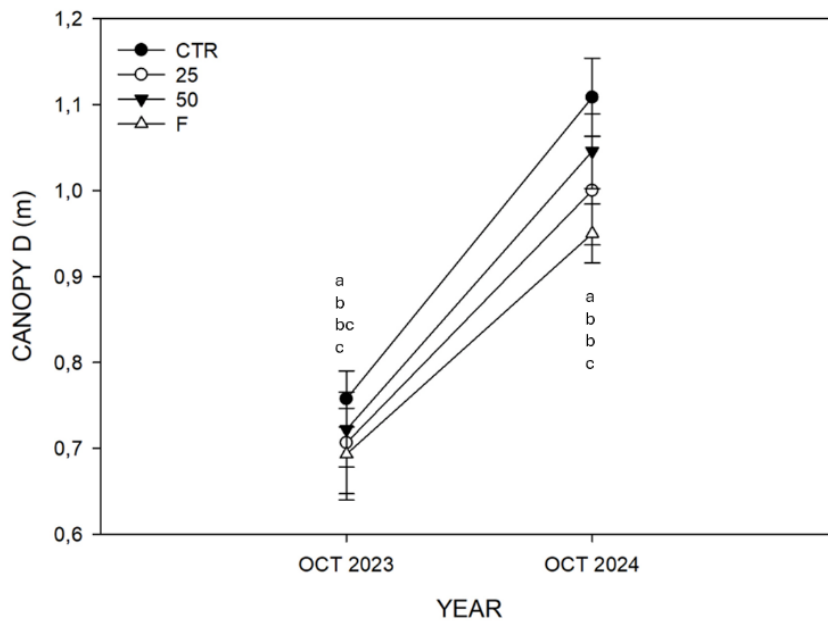


Fig. 6: Diametro della chioma (m) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrange carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

VOLKAMER

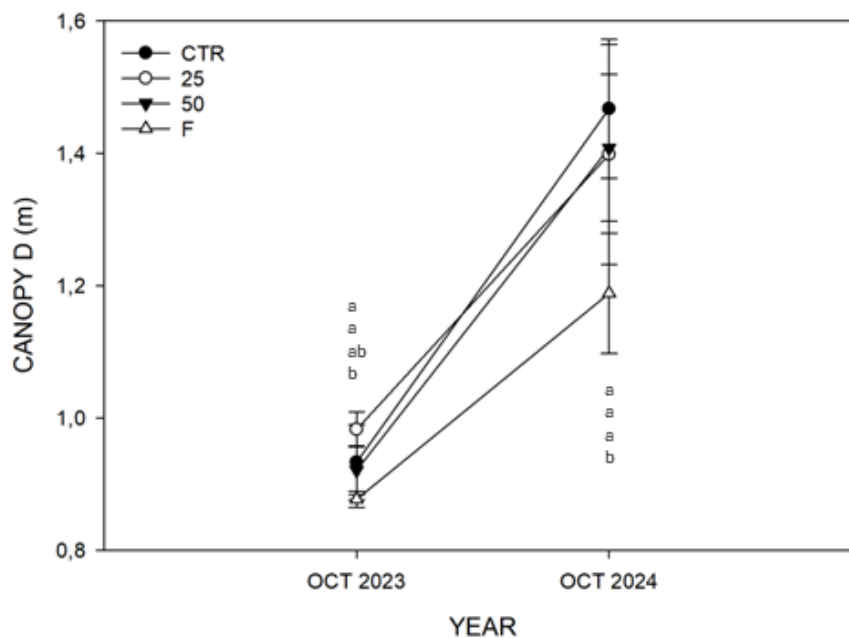


Fig. 7: Diametro della chioma (m) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

L'area proiettata della chioma, derivata dal diametro, ha confermato tali tendenze con tassi di accrescimento proporzionali. In *Carrizo*, si è osservato un incremento del +152%, da 0,45 m² nel 2023 a 1,16 m² nel 2024 nella tesi CTR. Nella tesi F, il valore è cresciuto da 0,40 a 0,88 m² (+117,75%), senza tuttavia differenze statisticamente significative tra le due annate. La tesi DIC 50 ha mostrato un valore intermedio nel 2024 pari a 0,95 m². In *Volkamer*, come atteso, sono stati registrati valori medi superiori rispetto a *Carrizo*. Il valore massimo si è riscontrato nella tesi di controllo (1,57 m² nel 2024), mentre nella tesi F è stato osservato un valore inferiore (1,16 m²). Le tesi DIC 25 e 50 hanno mostrato valori rispettivamente di 1,30 m² e 1,40 m², entrambi significativamente superiori rispetto alla tesi F, indicando che una fornitura idrica parziale, se ben gestita, può sostenere l'espansione fogliare in *Volkamer* in misura simile alla condizione di piena disponibilità.

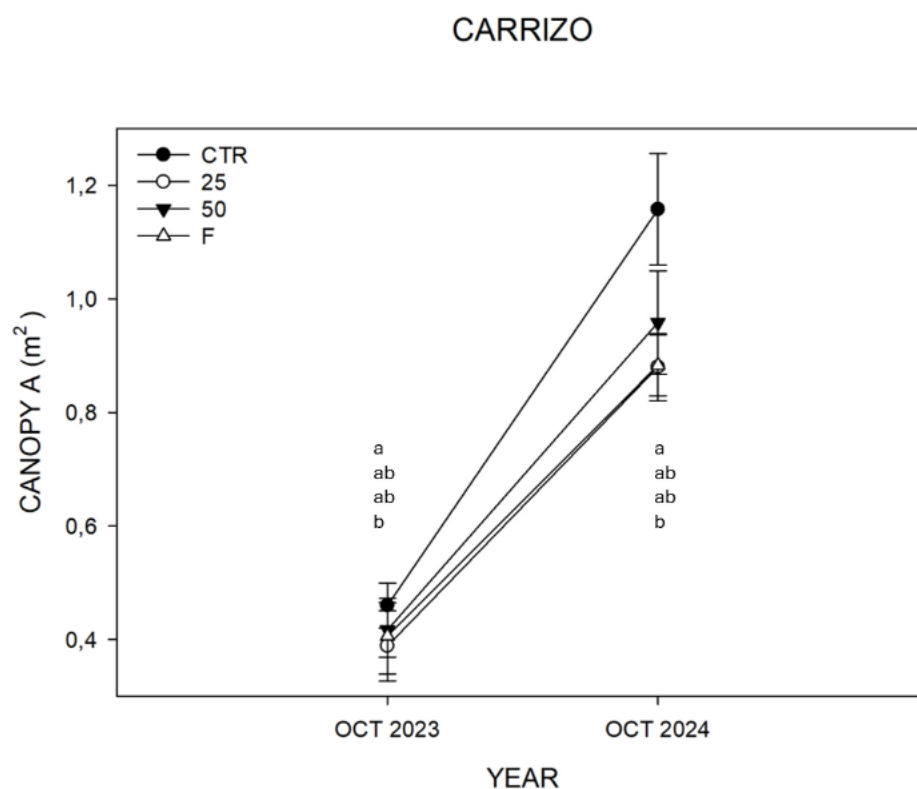


Fig. 8: Area della chioma (m²) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

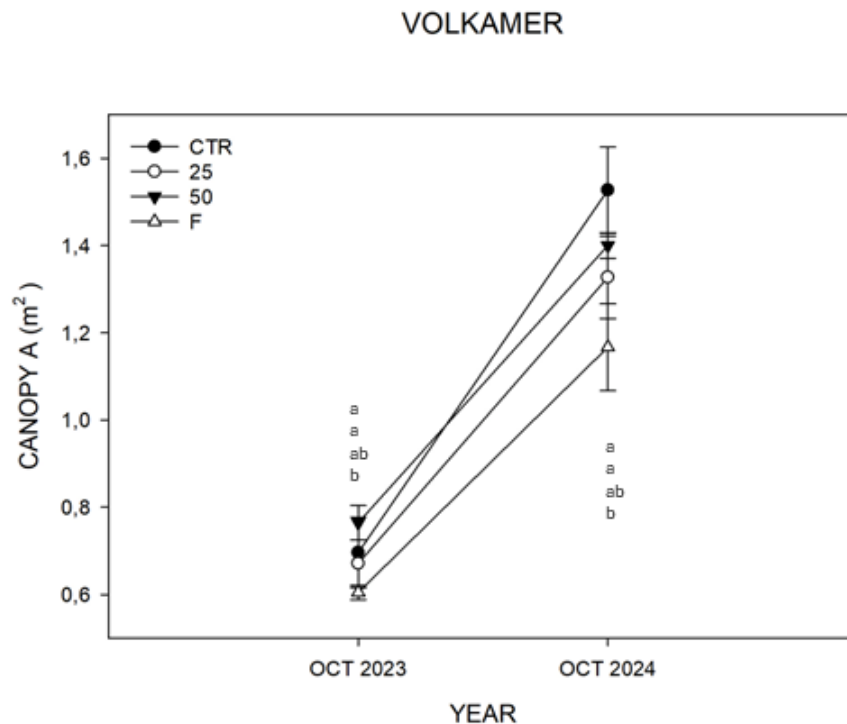


Fig. 9: Area della chioma (m²) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

Anche il volume della chioma, inteso come derivazione geometrica del diametro e dell'altezza vegetativa, ha rispecchiato gli andamenti osservati. I tassi di incremento più marcati sono stati rilevati nella tesi CTR, con un aumento del +140,97% in *Carrizo* e del +98,70% in *Volkamer*. In valori assoluti, il volume della chioma si è attestato su 2,40 m³ in *Volkamer* contro 1,50 m³ in *Carrizo* nella tesi CTR, ma anche nelle tesi DIC si è mantenuto quasi doppio in *Volkamer* rispetto a *Carrizo*. Tali differenze confermano che la risposta allo stress idrico controllato dipende fortemente dal portinnesto: mentre *Carrizo* mostra una moderata sensibilità allo stress, con una riduzione marcata ma coerente dei parametri morfologici, *Volkamer* riesce a mantenere elevati valori di area e volume anche in condizioni di irrigazione ridotta, evidenziando un comportamento fisiologicamente più resiliente, probabilmente legato a un'efficienza superiore nel controllo stomatico, nella conduttanza idraulica e nella capacità di recupero post-stress (Carr, 2012; Assar, Shekafandeh and Taghipour, 2021).

CARRIZO

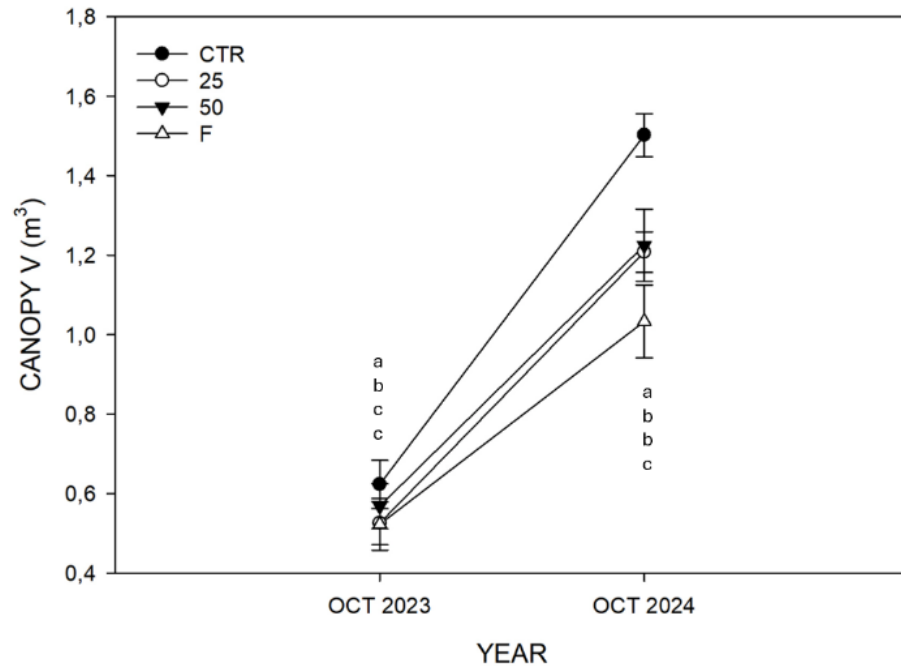


Fig. 10: Volume della chioma (m³) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

VOLKAMER

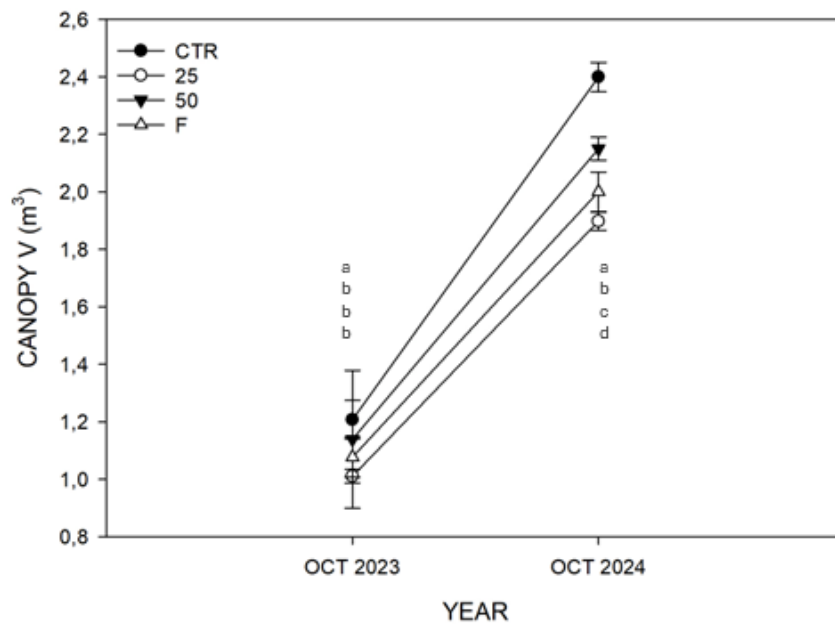


Fig. 11: Volume della chioma (m³) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrango carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

5.5. Leaf Area Density (LAD)

L'evoluzione del *Leaf Area Density* (LAD) tra il 2023 e il 2024 ha evidenziato un incremento generalizzato della densità fogliare in entrambe le annate e in tutti i trattamenti applicati, confermando un'espansione della superficie fogliare compatibile con l'accrescimento vegetativo naturale e con l'effetto modulante del regime idrico. Tale dinamica risulta tuttavia modulata in funzione sia dell'intensità dello stress applicato, sia del portinnesto considerato. In condizioni di assenza di trattamenti (CTR), *Carrizo* ha mostrato un incremento del LAD da 1,237 m²/m³ nel 2023 a 1,537 m²/m³ nel 2024, pari a un aumento del +24,3%. *Volkamer*, nello stesso contesto, è passato da 1,277 a 1,787 m²/m³, con una variazione del +39,9%. Questi risultati riflettono l'accrescimento strutturale atteso in condizioni non limitanti, con *Volkamer* che mostra un'espansione fogliare più pronunciata, coerente con il suo noto profilo vigoroso. Sotto l'effetto della forzatura mediante sospensione totale dell'irrigazione (F), è emerso un incremento del LAD ancora più marcato. *Carrizo* è passato da 1,579 a 2,027 m²/m³ (+28,4%), mentre *Volkamer* ha registrato un aumento da 1,395 a 2,018 m²/m³ (+44,7%). Questo comportamento, apparentemente controintuitivo, può essere interpretato alla luce dell'attivazione di risposte adattative da parte delle piante esposte a stress acuto, come la promozione dell'espansione della superficie fogliare residua, finalizzata a massimizzare l'intercettazione luminosa in un contesto di limitata disponibilità idrica (CHAVES *et al.*, 2002; Flexas *et al.*, 2012). Anche in condizioni di irrigazione ridotta al 25% della capacità di campo si è osservata una risposta vegetativa positiva. *Carrizo* ha mostrato un incremento del LAD da 1,960 a 2,368 m²/m³ (+20,8%), mentre *Volkamer* è passato da 1,463 a 2,043 m²/m³ (+39,6%). In questo scenario, la disponibilità idrica, pur ridotta, potrebbe aver attivato meccanismi di regolazione ormonale e bilanciamento osmotico tali da sostenere un'espansione fogliare efficace, specialmente in *Volkamer*, che conferma anche in questa tesi una notevole reattività vegetativa in presenza di stress (Tardieu, Simonneau and Muller, 2018). Diversa è la risposta osservata con un'irrigazione pari al 50% della capacità di campo, in cui *Carrizo* ha raggiunto il valore più elevato in assoluto: da 2,135 a 2,615 m²/m³ (+22,5%). *Volkamer*, al contrario, è passato da 2,073 a 2,357 m²/m³, con un incremento più contenuto (+13,7%), il più basso registrato tra tutte le tesi per questo portinnesto. Questo dato indica che *Carrizo* tragga vantaggio da un apporto idrico moderato, che consente di sostenere la superficie fogliare senza attivare meccanismi difensivi, mentre per il *Volkamer* potrebbe verificarsi una saturazione della risposta o un'efficienza minore nella gestione dell'acqua disponibile.

VOLKAMER

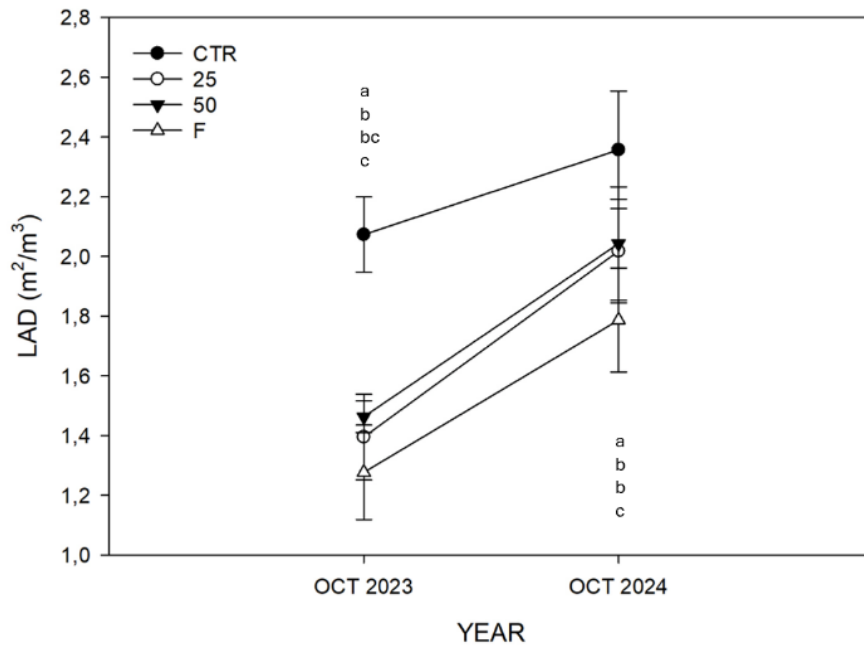


Fig. 12: Densità dell'area fogliare (LAD) (m^2/m^3) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrus volkameriana*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, mentre lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

CARRIZO

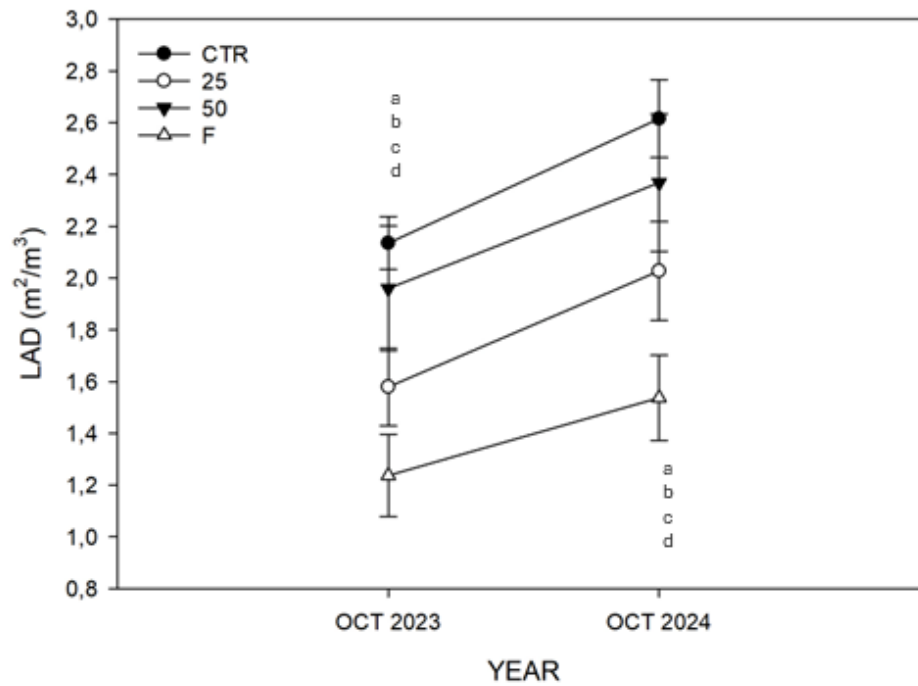


Fig. 13: Densità dell'area fogliare (LAD) (m^2/m^3) in piante di *Citrus limon* (L.) Burm. f. innestate su *Citrange carrizo*. Il test di Tukey è stato eseguito con $p \leq 0.05$. Ad ogni data di campionamento, lettere minuscole diverse indicano differenze significative tra i trattamenti.

Nel complesso, i dati ottenuti indicano una maggiore stabilità e resilienza di *Carrizo*, che risponde in maniera coerente a diversi livelli di disponibilità idrica, con valori assoluti elevati soprattutto in condizioni di irrigazione moderata. *Volkamer* mostra invece una maggiore reattività a condizioni di stress marcato, ottenendo gli incrementi più consistenti nelle tesi F e 25, ma una risposta più attenuata in condizioni meno stressanti. Queste osservazioni confermano la presenza di strategie fisiologiche differenti tra i due portinnesti: *Carrizo* adotta un comportamento conservativo ma efficace in termini vegetativi, mentre *Volkamer* risponde in modo più dinamico, adattando la propria crescita fogliare in funzione dell'intensità dello stress. Tali strategie risultano coerenti con quanto riportato in letteratura relativamente al comportamento idraulico e all'efficienza fotosintetica dei due genotipi (Schultz, 2000; Medrano *et al.*, 2002).

5.6. Conclusioni

L'analisi congiunta dei parametri biometrici rilevati – diametro del fusto (DBH), altezza della pianta (H), diametro, area e volume della chioma, e *Leaf Area Density* (LAD) – ha permesso di delineare in modo chiaro e articolato l'effetto esercitato dal portinnesto e dal regime irriguo sulla crescita vegetativa degli agrumi in due annate consecutive. I risultati ottenuti hanno confermato il ruolo determinante del portinnesto nel modulare la vigoria della pianta. In tutte le condizioni sperimentali, *Volkamer* ha conferito un maggiore sviluppo vegetativo rispetto a *Carrizo*, con valori superiori per tutti i parametri misurati, in particolare per l'altezza e il volume della chioma, ma anche per il DBH e il LAD. Tale effetto è risultato evidente soprattutto nella tesi di controllo (CTR), in assenza di limitazioni idriche, ma si è mantenuto, con minore intensità, anche in presenza di stress. Il *Leaf Area Density*, parametro che esprime la quantità di superficie fogliare per unità di volume di chioma, ha evidenziato un comportamento particolarmente interessante in risposta sia al portinnesto che al regime irriguo. In generale, *Volkamer* ha mostrato valori di LAD più elevati, riflettendo una maggiore efficienza nell'occupare tridimensionalmente lo spazio con superficie fotosintetica attiva. Tuttavia, i risultati hanno anche indicato che *Carrizo*, pur avendo valori assoluti inferiori, ha espresso una maggiore plasticità fisiologica, con incrementi percentuali di LAD talvolta superiori, soprattutto in condizioni di forzatura o di irrigazione limitata. Questo suggerisce che la densità della chioma sia non solo funzione della vigoria complessiva, ma anche del bilanciamento tra espansione strutturale e investimento fogliare, influenzato dal portinnesto e dalle condizioni ambientali. Il regime irriguo ha avuto un impatto significativo

su tutti i parametri analizzati. Le condizioni di forzatura (F) hanno determinato una riduzione generalizzata dell'accrescimento, evidenziando un'inibizione sia dell'attività cambiale che dell'espansione fogliare. In particolare, sono stati osservati valori più bassi per DBH, altezza, volume e LAD, indicando una compromissione dell'equilibrio vegetativo a seguito della prolungata assenza di apporto idrico. Al contrario, le strategie a deficit idrico controllato (DIC 25 e 50) si sono dimostrate efficaci nel contenere la riduzione della crescita, con valori spesso non significativamente diversi dalla tesi di controllo, in particolare per *Volkamer*. *Carrizo* ha mostrato risposte più contenute, ma coerenti, con valori intermedi e una certa stabilità nelle condizioni di stress moderato. Nel complesso, i dati suggeriscono che il deficit idrico controllato, se correttamente applicato, costituisce una valida strategia agronomica per modulare la vigoria vegetativa senza compromettere eccessivamente lo sviluppo strutturale della pianta. I portinnesti svolgono un ruolo cruciale in questa risposta: *Volkamer* si è confermato più vigoroso e resiliente, capace di sostenere una crescita equilibrata anche sotto limitazione idrica, mentre *Carrizo* ha mostrato una vigoria minore ma un comportamento più contenuto e prevedibile, utile in contesti in cui la gestione della vigoria è un obiettivo agronomico. L'integrazione tra parametri morfologici classici (DBH, altezza) e indici funzionali come LAD consente una valutazione più completa della risposta vegetativa della pianta, ponendo le basi per una gestione razionale dell'irrigazione e della scelta del portinnesto, con l'obiettivo di ottimizzare la crescita e l'efficienza d'uso delle risorse nel contesto degli agrumi.

Quanto emerso dall'analisi morfologica trova un riscontro coerente anche nei dati relativi all'efficienza d'uso dell'acqua (WUE) (Capitolo 3), confermando la stretta relazione tra crescita vegetativa, risposta fisiologica allo stress e capacità di adattamento mediata dal portinnesto. In particolare, le differenze biometriche osservate tra *Carrizo* e *Volkamer* si riflettono direttamente nei valori di WUE, evidenziando come le piante che mantengono uno sviluppo più contenuto, ma funzionalmente equilibrato, siano in grado di gestire più efficacemente la limitata disponibilità idrica.

Nel 2023, la tesi DIC 25 delle piante innestate su *Carrizo* ha registrato un valore di WUE oltre l'80% inferiore rispetto al controllo (CTR), pur mantenendo valori intermedi per altezza, area e volume della chioma. Questo dato indica che, nonostante una crescita strutturale paragonabile, l'efficienza fisiologica dell'apparato vegetativo è stata penalizzata, probabilmente per effetto di uno stress osmotico transitorio non completamente compensato. Ancora più marcata è stata la risposta delle piante innestate su *Volkamer*, le quali hanno mostrato valori negativi di WUE, anche successivamente alla ripresa dell'irrigazione,

suggerendo una maggiore difficoltà nel ristabilire l'equilibrio tra traspirazione e fotosintesi. Nel 2024, le analisi sono state ripetute, con il monitoraggio dei principali parametri fisiologici (traspirazione, tasso fotosintetico netto e conduttanza stomatica) e del potenziale idrico del fusto. Nonostante la mancanza di evidenti segnali di compromissione strutturale a livello del potenziale idrico, i risultati evidenziano diversi livelli di efficienza funzionale tra i due portinnesti. In particolare, *Carrizo* ha mostrato valori più elevati di A, E, e gs alla ripresa degli interventi irrigui, segno di una migliore capacità di regolazione osmotica e di un recupero fisiologico più rapido, coerente con i dati biometrici che mostrano accrescimenti stabili ma moderati. Considerando organicamente questi risultati, è possibile affermare che la risposta morfologica e quella fisiologica siano fortemente interconnesse: le piante che, come quelle innestate su *Carrizo*, hanno contenuto l'espansione vegetativa durante il periodo di stress hanno mostrato una maggiore efficienza nell'uso dell'acqua e una migliore ripresa fisiologica, a fronte di uno sviluppo strutturale più contenuto ma funzionalmente sostenibile. Al contrario, la maggiore vigoria iniziale conferita da *Volkamer*, sebbene vantaggiosa in condizioni ottimali, sembra diventare un fattore penalizzante in condizioni di stress, dove una superficie fogliare più ampia comporta maggiori perdite per traspirazione non sempre bilanciate da un'adeguata assimilazione. Tali evidenze supportano l'ipotesi che *Carrizo* rappresenti il portinnesto più idoneo per l'adozione di strategie di deficit idrico controllato in sostituzione della forzatura, grazie alla sua capacità di mantenere un bilancio idrico-fisiologico più stabile e una crescita strutturale coerente con la disponibilità delle risorse. In questo contesto, il compromesso tra sviluppo morfologico, efficienza fisiologica e risposta allo stress si traduce in una maggiore sostenibilità agronomica, elemento chiave nella gestione irrigua di sistemi produttivi a risorse limitate

CAPITOLO 6. COINVOLGIMENTO DELLA PRODUZIONE DI ETILENE E DELLE POLIAMMINE NEL ‘*RIND PITTING*’ DEL LIMONE ‘FINO’

Il presente articolo è frutto del mio periodo di ricerca all'estero presso il CIAGRO (Centro per la Ricerca Agroalimentare e Agroambientale) della Escuela Politécnica Superior de Orihuela (EPSO) dell'Universitat Miguel Hernández de Elche, in Spagna. L'obiettivo era confrontare due approcci agronomici opposti: uno orientato alla gestione razionale e conservativa delle risorse idriche, e l'altro basato su una fertirrigazione intensiva mirata a stimolare precocemente la crescita del frutto e ad aumentare la pezzatura, in risposta alle esigenze del mercato del fresco. In particolare, ho voluto indagare le implicazioni fisiologiche di questa tecnica intensiva sulla qualità post-raccolta dei limoni, con particolare attenzione a un disordine fisiologico noto come *rind pitting*. L'esperienza spagnola ha rappresentato un'occasione di confronto tra due modelli di gestione agronomica: da un lato, pratiche attente alla sostenibilità e al bilanciamento idrico; dall'altro, un modello spinto verso l'intensificazione produttiva, con l'obiettivo di ottenere frutti più grandi, precoci e visivamente attraenti. Tuttavia, tali obiettivi non sono esenti da criticità, soprattutto per quanto riguarda la risposta fisiologica del frutto in post-raccolta. Nel caso del limone 'Fino', cultivar precoce destinata alla raccolta commerciale in fase di maturazione verde, l'intensificazione della fertirrigazione ha comportato un incremento significativo dei processi metabolici già nella fase *post-degreening*. I frutti provenienti dal sistema intensivo hanno mostrato un tasso respiratorio maggiore (+48%) e una produzione triplicata di etilene rispetto ai frutti gestiti con fertirrigazione standard. Inoltre, è stato osservato un incremento sostanziale del contenuto di ACC libero e totale, evidenziando un'attivazione marcata della via biosintetica dell'etilene. Considerando che il limone è un frutto non climaterico, tale attivazione è da ricondurre a una risposta da stress, probabilmente innescata sia dalle condizioni del *degreening* (elevata temperatura e umidità) sia dallo squilibrio fisiologico indotto dal regime intensivo. Accanto all'etilene, un altro gruppo di molecole ha attirato l'attenzione per il loro ruolo protettivo: le poliammine. L'analisi del tessuto esocarpico ha mostrato che nei frutti sottoposti a fertirrigazione standard vi era una maggiore concentrazione di spermidina e spermine (circa +30%), con un ruolo ipotizzato nella protezione della membrana cellulare e nella stabilizzazione delle pareti cellulari. Queste sostanze sembrano modulare positivamente la tolleranza agli stress ossidativi e da freddo, agendo come veri e propri marcatori di resistenza. È interessante notare che nei frutti che non hanno sviluppato sintomi di *rind pitting*, i livelli di spermine risultavano sensibilmente

più elevati rispetto ai frutti danneggiati, indipendentemente dal sistema di fertirrigazione adottato. Ciò rafforza l'ipotesi che le poliammine, e in particolare le spermine, possano esercitare un effetto protettivo nei confronti dei disordini fisiologici. Infine, l'analisi multivariata (PCA) ha evidenziato come i principali fattori discriminanti tra i gruppi di frutti fossero legati al metabolismo respiratorio (CO₂), alla biosintesi dell'etilene (ACC), alla capacità antiossidante e ai livelli di poliammine. I frutti con migliori caratteristiche qualitative e maggiore resistenza allo stress da freddo si sono distinti per un profilo fisiologico più bilanciato, con minori livelli di etilene e maggiori concentrazioni di poliammine e antiossidanti. Questa esperienza ha permesso di approfondire la comprensione dei meccanismi biochimici e molecolari che regolano la risposta del limone a strategie agronomiche intensive. I risultati suggeriscono che la fertirrigazione intensiva, sebbene efficace nel promuovere l'accrescimento del frutto, può indurre squilibri fisiologici che aumentano la suscettibilità al *rind pitting* e riducono la qualità post-raccolta. Viceversa, la gestione standard, meno spinta sul piano produttivo, sembra favorire una risposta più stabile agli stress post-raccolta, grazie a una maggiore efficienza del sistema antiossidante e a una più elevata presenza di composti protettivi come le poliammine. Questi risultati evidenziano l'importanza di un approccio equilibrato e integrato nella gestione irrigua, capace di coniugare produttività e qualità commerciale del frutto.

Involvement of ethylene production and polyamines in rind pitting of ‘Fino’ lemon fruit

Eugenia Guccione ^b, Vicente Serna-Escolano ^a, Alessio Allegra ^b, Giuseppe Sortino ^b, Ana M. Solivella-Poveda ^a, María Serrano ^a, Daniel Valero, Pedro J. Zapata ^a, María J. Giménez ^a

^a*Institute for Agro-food and Agro-environmental Research and Innovation (CIAGRO), EPSO, Miguel Hernandez University (UMH), Ctra. Beniel km. 3.2, 03312, Orihuela, Spain*

^b*Department of Agricultural, Food and Forest Sciences, Università degli Studi di Palermo, Viale delle Scienze ed. 4, ingresso H, Palermo 90128, Italy*

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109851>

Received 30 January 2025; Received in revised form 24 March 2025; Accepted 27 March 2025

Available online 27 March 2025

0981-9428/© 2025 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license.

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Rind disorders in early cultivars of lemon fruits cause serious economic losses at market since these lemons are very sensitive to develop rind pitting during postharvest. Therefore, the aim of this study was to determine the involvement of ethylene and polyamines (PAs) in rind pitting of ‘Fino’ lemons grown with an intensive fertigation (IF) and standard fertigation (SF). Results after degreening treatment showed that lemons harvested from the IF system had ca. 48 %, 3.5-fold, 2.5-fold and 28 % more respiration rate, ethylene production, free and total 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), respectively, than SF lemons. Furthermore, the concentrations of spermidine and spermine were ca. 30 % lower in IF lemons compared to SF ones, without differences in putrescine levels. After 7 days of storage at 8 °C, the highest values of rind pitting incidence and severity of damage were found in IF lemons. It was observed that lemons with rind pitting harvested from the IF system had the highest concentration of free-ACC and total-ACC, whereas the spermine content was ca. 3-fold higher in fruits without rind pitting independently of the fertigation system. Thus, the results showed that ethylene can be considered as a marker for the lemon fruit susceptibility to suffer rind pitting, while PAs have a protective role.

6.1. Introduction

Lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) is one of the most appreciated fruits worldwide due to its flavour, taste and antioxidant capacity. Lemons must reach a specific size in order

to be commercialized in the fresh market. Therefore, growers apply intensive fertigation (IF) strategies to accelerate fruit growth. In addition, lemons harvested from these early cultivars are harvested at green mature stage and undergo a degreening process to achieve the desirable yellow colour. Both strategies can be quite aggressive and may have a negative impact on the external quality of the fruit (Serna-Escolano et al., 2023). An intact blemish-free rind fruit is an important factor for the fresh markets. However, the external peel quality of lemon fruits is seriously affected by physiological disorders that appear during postharvest storage, such as rind pitting. It is characterized by the appearance of deep depressions and darkening in the epidermis, resulting from the collapse of the albedo and the release of oil from the flavedo that damages adjacent tissues (Zacarias et al., 2020). The causal mechanisms and factors influencing fruit susceptibility to this physiological disorder are unknown. However, previous results in oranges (Alferez et al., 2005) and grapefruits (Alferez et al., 2010) have associated its susceptibility to low relative humidity. Additionally, controlling fruit respiration using cooling systems or wax coatings with an adequate oxygen diffusion has been effective in reducing its incidence (Alquezar et al., 2010). Cronje et al. (2017) proposed that albedo thickness and its ability to control water relations is probably an important factor involved in the development of this disorder. Furthermore, Alferez and Zacarías (2014) showed that maturity stage directly affected the control of water potential, which increased rind disorders in more mature citrus fruits. Ethylene is a plant hormone synthesized from S-adenosylmethionine (SAM) through 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), which plays an important role in regulating stress response (Tosetti et al., 2020). Lemon fruits are non-climacteric and produce very low levels of ethylene during ripening. This hormone does not promote relevant internal changes in citrus fruits, but it is widely used to improve the skin colour changes from green to yellow (degreening) in early lemon season cultivars (Rodrigo and Zacarias, 2007). Therefore, ethylene can have an effect on the expression of multiple genes in tissues peel. In this sense, the application of exogenous ethylene has been used to prevent non-chilling (Estables-Ortiz et al., 2016) and chilling induced peel pitting (Lafuente et al., 2004). This molecule induces numerous and diverse stress-related mechanisms in citrus fruit. A study on the network analysis of postharvest senescence in orange peel revealed that abiotic stress induced endogenous production of ethylene, and the expression of transcription factors associated with fruit senescence, which also impacted the overall energy-related metabolism (Ding et al., 2015). Polyamines (PAs) are linear or aliphatic molecules occasionally branched with polycationic nitrogen compounds. Putrescine

(Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) are the most common PAs in plants, while thermospermine and cadaverine are only found in some higher plant species (Jangra et al., 2023). Arginine is the precursor of ornithine and agmatine, which can be transformed into Put. Putrescine is the first point to obtain Spd through the transfer of decarboxylated S-adenosyl methionine (dcSAM) to Put, and Spm is formed by the addition to Spd of another aminopropyl group (Blázquez, 2024). Ethylene and PAs have an interconnected pathway due to their common precursor SAM. Therefore, if this substrate is limited, it could determine the preference for the production of ethylene or Spd and Spm (Puentes-Moreno et al., 2025). Although previous results in mutants of tomatoes proved that the presence of SAM could not be a limiting factor, and both pathways could function at the same time (Mehta et al., 2002). In this sense, a parallel biosynthesis of ethylene and PAs has been widely studied by Lokesh et al. (2019) in bananas, concluding that ethylene and PAs do not compete for SAM, since PAs were synthesized through arginine-mediated pathway. It has been proposed that PA accumulation has an adaptive response to protect plants against abiotic stresses (Alcàzar et al., 2020). In comparison to the many reports that describe the roles of PAs in climacteric fruits, in non-climacteric fruits the information that highlight how PAs participate in fruit ripening, senescence and quality is limited. In lemons, it has been previously reported the accumulation of Put in flavedo when fruits were stored at chilling injury temperatures (McDonald, 1989; Martínez-Romero et al., 1999). In grapes, endogenous Put and Spd levels usually decline during fruit ripening and senescence, while Spm remains constant (Agudelo-Romero et al., 2013). Results in strawberries showed that Spm levels increased after the fruit turning red, being predominant in ripe fruits (Guo et al., 2018). Furthermore, in strawberries it has been recently described the importance of polyamine oxidase 5 (PAO5) regulating fruit ripening, allowing the accumulation of Spd and Spm (Mo et al., 2020). Exogenous application of Put to 'Verna' lemons at postharvest increased endogenous levels of Put, leading to increased fruit firmness maintenance and reduced weight loss during storage as compared to control fruits (Valero et al., 1998). Also in lemons, the exogenous application of individual Put and Spd and their combination reduced electrolyte leakage, indicating maintenance of the cell membrane structure that protects the fruit from chilling injury (Kawaleguet et al., 2022). Accordingly, in climacteric fruits such as peach fruits, the exogenous application of PA lead to the inhibition of ethylene emission, delaying fruit softening and increasing fungal resistance during postharvest storage (Torrighiani et al., 2012). Therefore, the increase in PA levels could be considered an important adaptive mechanism to delay fruit ripening and senescence (Shi et al., 2010).

The molecular basis that explains the differences in the susceptibility of lemon fruits to rind pitting is still unclear. Therefore, the aim of this research was to study the impact of intensive fertigation on ethylene production and PAs accumulation compared to standard fertigation in order to identify their possible roles in the rind pitting incidence and severity of ‘Fino’ lemons.

6.2. Material and methods

6.2.1. Experimental design and quality assessment

The experiment was designed to follow the normal agronomical practices used in the field and postharvest handling for lemon fruits under organic production system (Fig. 1). Thus, the experiment was carried out in a commercial field located in Orihuela (Alicante, Spain), under an average temperature of 18 °C and 280 mm/year of rainfall during 2023–2024 season. Two plots with 75 ‘Fino’ lemon trees grafted on *Citrus macrophylla* rootstock of 10 years old with two independent drip fertigation systems (intensive fertigation (IF) and standard fertigation (SF)) were selected for this experiment, according to previous conditions described by Serna-Escolano et al. (2023) summarised in Table 1.

Table 1: Total irrigation (m³ ha⁻¹) and nitrogen/potassium fertilization (Kg ha⁻¹) applied in intensive fertigation (IF) and standard fertigation (SF) plots during the flowering (March–June), fruit growth (July–August) and fruit ripening (September–December)

Stages	IF			SF		
	Irrigation	Nitrogen	Potassium	Irrigation	Nitrogen	Potassium
Flowering	150	10	20	150	10	20
Fruit growth	600	60	120	300	30	40
Fruit ripening	200	0	10	200	0	10
Total	950	70	150	550	40	70

The fertilisers used for this experiment were organic liquid nitrogen and potassium oxide (K₂O). Both fertigation systems are used by the lemon fruit growers at the beginning of the season with different purposes; IF is normally applied to promote lemon fruit growth, whereas SF is used to reduce fruit maturation process on tree. Two thousand lemon fruits with green colour and commercial diameter (higher than 55 mm) were harvested on the 18th of September 2023 from both SF and IF systems. These fruits were transferred to the laboratory in 2 h and were subjected to a degreening treatment (Fig. 1), consisting of 8 days storage in closed chamber at 25 °C and a relative humidity (RH) of 90–95 % in order to acquire the yellow skin colour necessary for its marketing. This degreening

treatment is the only allowed for organic lemon fruit production by the European legislation (Regulation (EU) 2018/848). After degreening, the first sample of 30 lemons from the SF and IF systems without visual physical damages and homogeneous in size were selected for the individual measures of respiration rate and ethylene production as shown Fig. 1. In addition, six lots of five fruits were made at random and after peeling, peel samples from each lot were mixed and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for ACC and PA determinations. Furthermore, 1000 lemons from each fertigation treatment were selected after degreening and stored at $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 85 % RH for 7 days. These storage conditions are used by the lemon fruit industry prior to marketing (Fig. 1). After that storage period, lemons were visually assessed according to the severity of rind pitting symptoms as follows: 0: absence of rind pitting, 1: low level (less 25 % of the flavedo affected), 2: medium level (25–50 % of the flavedo affected), 3: high level (more than 50 % of the flavedo affected) (Fig. 2). Then, the second sample (Fig. 1) of 30 lemons from SF and IF systems without rind pitting (WRP) and with rind pitting (RP), 0 and 3 scores, respectively, were selected for the individual measures of respiration rate and ethylene production and the peel of six lots of five fruits were mixed and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ to measure ACC and PAs as indicated above.

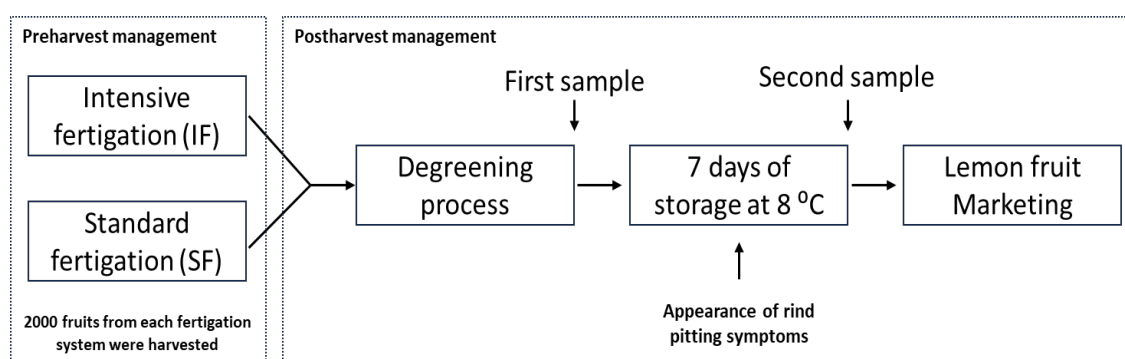


Fig. 1. Flowchart of the experimental design to determine the involvement of ethylene production and polyamine accumulation in lemon fruit rind pitting promoted by the most stressful steps of the lemon fruit production in the industry. The first sample was taken after degreening and the second samples after 7 days of cold storage.



Fig. 2. Classification of ‘Fino’ lemons according to the flavedo rind pitting damage from scores 0 to 3.

6.2.2. Physiological analysis

The individual respiration rate of 30 lemons was determined at room temperature by placing each fruit individually in a 0.5 L glass jar for 60 min. Then, a volume of 1 mL of the headspace was injected into a gas chromatograph (GC- 14B, Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled to a thermal conductivity detector to measure CO₂ concentration and the data was expressed as mg of CO₂ Kg⁻¹ h⁻¹ (Martínez-Esplà et al., 2018). For the individual ethylene production another sample of 1 mL from the jar was injected into GC (TMGC-2010, Shimadzu, Kyoto, Japan) fitted with a flame ionization detector and results were expressed in nL Kg⁻¹ h⁻¹ (Martínez-Esplà et al., 2018).

6.2.3. ACC extraction assay

Total ACC (free and conjugated) was extracted as previously described Zapata et al. (2004) with some modifications by homogenising 2 g of peel from each sample with 0.2 M trichloroacetic acid (1: 3 w/v) and the extracts were centrifuged at 10000 g for 10 min. The supernatants were used to determine its free-ACC through the chemical conversion of ACC to ethylene in a reaction medium that contained 100 µL of 10 mM ClHg₂, 100 µL of saturated NaOH, 0.5 mL of 5 % NaOCl and 0.5 mL of extracts. In order to determine total-ACC, 5 mL of the extracts were hydrolysed with 1 mL of 2 N HCl, at 100 °C for 60 min. Then, total-ACC was measured as described above doing the chemical conversion of ACC to ethylene. A calibration curve of ACC from Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, England) was used as standard. The results (mean ±SE) of three measurements from each of the six replicates for each peel sample were expressed as nmol per gram of fresh weight (nmol g⁻¹ FW).

6.2.4. Polyamine analysis

Free PAs were extracted by homogenising 2 g of peel samples in 10 mL of 5 % perchloric acid and those extracts were centrifuged 15 min at 10000 g. Benzoylated free PAs were determined as previously reported Zapata et al. (2003) by an HPLC (Hewlett-Packard Company, Wilmington, DE) equipped with a phase reverse column (LiChroCart 250–4.5 µm). The elution system MeOH/H₂O (64: 36) running isocratically with a flow rate of 0.8 mL min⁻¹. Calibration was made with hexanediamine (100 nmol g⁻¹ FW of tissue) as an internal standard, and standard curves of Put, Spd, and Spm from Sigma-Aldrich (Poole, Dorset, England) were used to determine the Pas content in samples. The results (mean ±SE) of three measurements

from each of the six replicates for each peel sample were expressed as nmol per gram of fresh weight (nmol g⁻¹ FW).

6.2.5. Total antioxidant activity

The extraction was carried out by homogenising 2 g of flavedo in 10 mL of potassium phosphate buffer 50 mM pH 7 and ethyl acetate (2:1 v/ v). The extracts obtained were centrifuged at 10,000×g for 12 min at 4 °C. The antioxidant activity was measured in the hydrophobic and hydrophilic phases using the ABTS-peroxidase system as described by Serna-Escolano et al. (2023). The total antioxidant activity (TAA) was the sum of both phases in six replicates for each peel sample, and the results were expressed as mg of Trolox equivalent per 100 g FW.

6.2.6. Statistical analysis

Data for each peel sample were the mean ±SE and were statistically analysed by Student's unpaired t-test and ANOVA with a multiple-range test (Tukey's test) to determine significant differences between samples ($p < 0.05$). Those statistical analyses were performed using SPSS, version 22 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). In addition, the PCA model was constructed with normalized data using Unscrambler 11 software (CAMO AS, Oslo, Norway).

6.3. Results and discussion

Respiration rate is one of the most important parameters that indicates the metabolic processes of the fruit after harvest. Thus, higher values of respiration rate lead to faster consumption of carbohydrates and organic acids accelerating fruit senescence (Li et al., 2016). Results indicated differences in fruit metabolism reflected in the respiration rate, as it was 37.5 % higher in lemons cultivated with the IF compared to those in the SF system after the degreening process (Fig. 3A). Additionally, results in Fig. 3B showed that ethylene production was 3-fold higher in the IF lemons compared to the SF ones, 7.15 ± 0.32 and 1.99 ± 0.11 ng kg⁻¹ h⁻¹, respectively. Furthermore, free-ACC and total-ACC content in the peel of lemons harvested from the IF system showed an increase of ca. 80 % and 37.5 %, respectively, compared to the SF lemons (Fig. 3C and D). Generally, the degreening process in lemons has been associated with fruit quality losses due to exposure to high temperatures and relative humidity over a long period (Serna-Escolano et al., 2022). Temperature plays an important role in modulating ethylene

production. Therefore, ethylene could be acting as a stress signal during degreening. Thus, in watermelon the increase of storage temperature from 20 °C to 30 °C enhanced ethylene production through the expression of genes encoding ACC synthase and ACC oxidase (Zhou et al., 2016). Also, in longan fruits stored at 25 °C an increase in ethylene production occurred, which was associated with the transcription of the ethylene-responsive factor-like gene DIERF1, which promotes postharvest decay and fruit senescence (Kuang et al., 2012). Lemon fruit is a non-climacteric fruit that shows no respiration or ethylene production peaks associated with ripening. However, previous results in other non-climacteric fruits, such as strawberry and orange have reported that ethylene was involved in the senescence process of the fruit interacting with abscisic acid through the induction of the NCED1 gene (Tosetti et al., 2020; Feng et al., 2021). Therefore, high ethylene production could act as a signal of stress and trigger lemon fruit senescence. In this sense, the higher ethylene production and free and total-ACC content in peel tissue of lemons from IF system than in those from SF system would indicate a response to stress due to IF. Regarding the antioxidant status of the fruit, lemons harvested from the SF system showed ca. 14 % higher TAA than those harvested from the IF system (Fig. 3E).

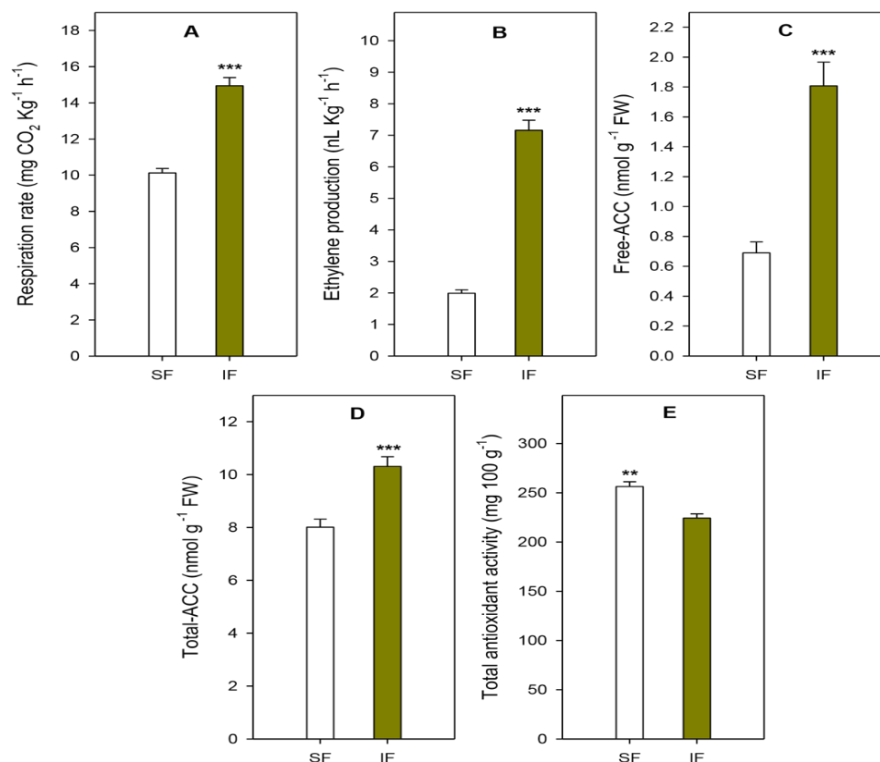


Fig. 3. Effect of standard fertigation (SF) and intensive fertigation (IF) on A) respiration rate, B) ethylene production, C) free 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (Free-ACC), D) total 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (Total-ACC) and E) total antioxidant activity in lemon peel after degreening. Asterisks show significant differences at * $p < 0.5$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.001$ according to Student's unpaired t-test.**

These results were similar to those published in lemons and oranges where fruits harvested from the IF system showed the lowest levels of TAA, which was associated with an accelerated ripening process during postharvest (Hou et al., 2021; Serna-Escolano et al., 2023). Regarding the content of PAs in lemon peel after degreening, lemons harvested from the SF system had ca. 20 % more free PAs (Put + Spd + Spm) than IF ones (248.45 ± 5.39 and 195.07 ± 7.44 nmol g⁻¹, respectively), with Spm being the major PA (Fig. 4). Besides, the content of Spd and Spm was lower in the IF lemons compared to the SF ones, with a decrease of ca. 30 % in both PAs (Fig. 4B and C), while no significant ($p < 0.05$) differences were found for Put between both fertigation systems (Fig. 4A). Those results could indicate the importance of SAM as a pivotal factor in the biosynthetic pathways of ethylene and PAs in lemons. In fact, lower PA content and higher ACC biosynthesis and ethylene production was found in the IF samples than in SF samples. In *Arabidopsis*, it has been reported that levels of free PAs increase under stress conditions through transcriptional regulation of the genes encoding PA metabolism (Zarza et al., 2017). However, the present results show higher levels of Spd and Spm in SF than in IF samples showing that lemon fruit from SF would be more tolerant to the stressor degreening process, due to their higher PA content. In agreement with the present results, Spm has been evidenced to provide abiotic stress tolerance in plants through the activation of its regulatory enzymes and regulating redox signalling (Kusano et al., 2008; Anwar et al., 2015).

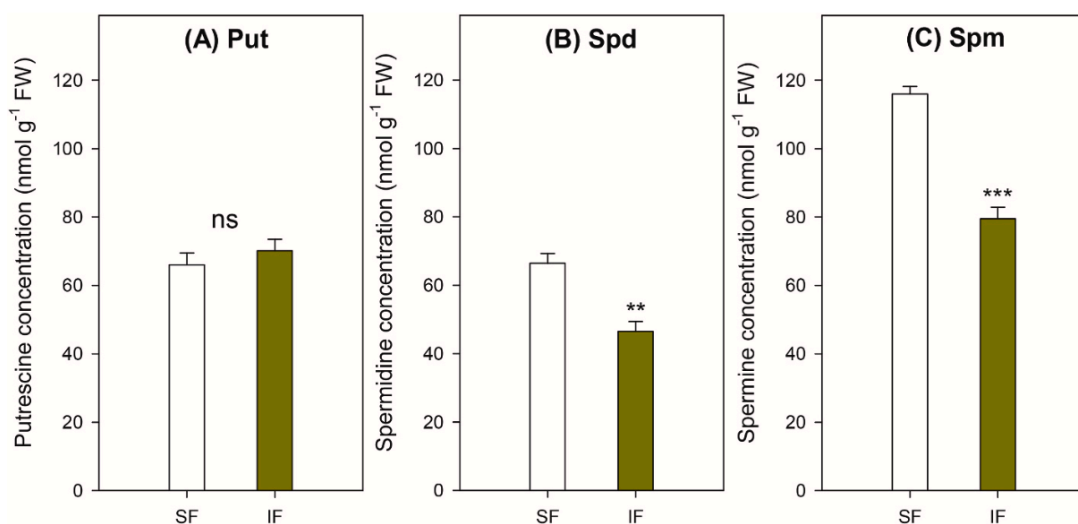


Fig. 4. Effect of standard fertigation (SF) and intensive fertigation (IF) on A) putrescine (Put), B) spermidine (Spd) and C) spermine (Spm) concentration of lemon peel after degreening. Asterisks show significant differences at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and ns: not significant according to Student's unpaired t-test.

After 7 days of storage at 8 °C, the rind pitting damage was evaluated according to 0–3 scores (Fig. 2). Results showed that the incidence of rind pitting in lemons harvested from the IF system was approximately 2-fold higher than in SF lemons (Fig. 5A). Besides, the severity of damage in lemons with rind pitting harvested from SF system was mainly scored as 1, while in lemons from the IF system, the severity was accounted for score 3 (Fig. 5B). Fertigation practices could impact growth and maturation process of fruit on the tree. Furthermore, previous results in ‘Fino’ lemons showed that the best physicochemical quality and antioxidant properties were obtained in those samples harvested from the SF system (Serna-Escolano et al., 2023). Therefore, lemons from SF and IF systems could have different responses to postharvest stress. Rind pitting in lemon fruits is associated with the stability loss of the cell wall structure. The effect of high endogenous ethylene could be related to the increased activity of cell wall hydrolytic enzymes, particularly polygalacturonases, pectin methylesterases and cellulases, which hydrolyse the cell wall components of the peel (Wormit and Usadel, 2018). In Navelate oranges, ethylene-mediated mechanisms modified the epicuticular waxes through the modulation of terpenoids and fatty acids, which could negatively affect the peel structure (Romero and Lafuente, 2022). On the other hand, polyamines are present in living organism as free and conjugated forms. Specifically, non-covalent conjugated PAs are associated with the stability of the membrane structure (Agudelo-Romero et al., 2013). Thus, increased levels of endogenous PAs in Washington Navel and Lane Late sweet orange fruit were associated with peel resistance to chilling temperatures (Hussain and Singh, 2015). Thus, the higher ethylene production after degreening in IF lemons with respect to SF ones could be responsible for their increased rind pitting incidence and severity, while the higher Spd and Spm content in SF fruits show a protective role against this physiological disorder.

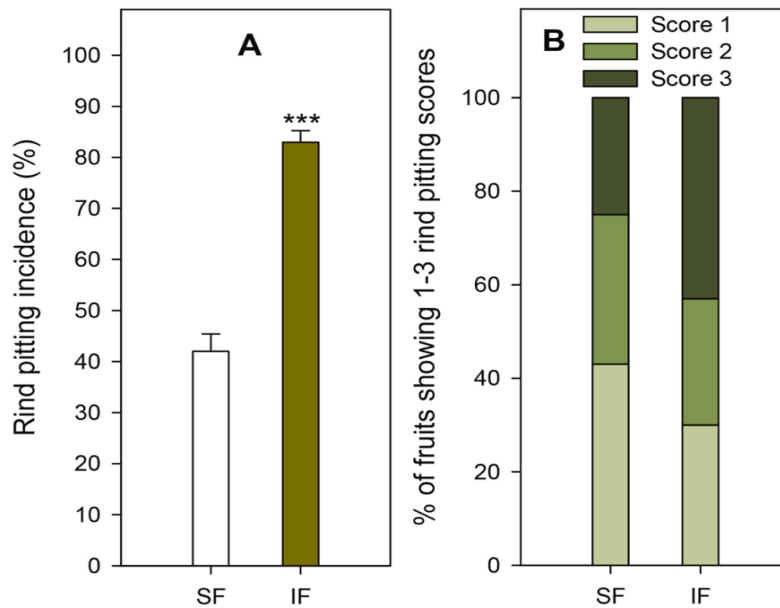


Fig. 5. Effect of standard fertigation (SF) and intensive fertigation (IF) on rind pitting incidence (A) and severity (scored from 1 to 3) (B) in lemons stored for 7 days at 8 °C. Asterisks show significant differences at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and * $p < 0.001$ according to Student's unpaired t-test.**

Lemons from the SF and IF systems without rind pitting (score 0) and with severe rind pitting (score 3) after 7 days of cold storage were used to measure respiration rate, ethylene production and ACC and PA levels. Results showed that the lowest was found in SF lemons without rind pitting, which was in agreement with results previously observed after the degreening process, and in lemons from IF system showing rind pitting (Fig. 6A). Thus, the lower respiration of lemons from the SF system without rind pitting could be due to a better control of the metabolism associated with maintaining energetic balance during cold storage (Sati et al., 2024), while the results observed in IF lemons with rind pitting could be related to programmed cell death produced during peel collapse (Ding et al., 2015). Regarding ethylene production, this parameter decreased during cold storage in all lemon samples, since values were lower after cold storage (Fig. 6B) than after the degreening process (Fig. 3B). However, the highest values were observed in the SF lemons with rind pitting, without significant ($p < 0.05$) differences between the other samples (Fig. 6B). In addition, lemons from the IF system with rind pitting had approximately 2-fold more free-ACC concentration than other samples, without significant ($p < 0.05$) differences found between them (Fig. 6C). Total-ACC was higher in the IF lemons independently of the presence of rind pitting, followed by lemons from the SF system with rind pitting and the lowest concentrations were found in the SF lemons without rind pitting (Fig. 6D). Therefore, total-ACC has been synthesized to a greater extent in lemons cultivated in the IF system either with or without rind pitting damages. Furthermore, the lack of increased ethylene production in

IFRP lemons could be due to a low activity of ACC oxidase enzyme (ACO), which is supported by higher free-ACC found in those samples. In this sense, the modulation of the ACO activity during cold storage has been described in transgenic oranges, showing that the increase on ACC content coincided with absence of ACO activity which was directly related to the development of chilling injury symptoms (Wong et al., 2001). These results could be related to others previously published in 'Fortune' mandarins, 'Navelina' and 'Valencia' oranges where endogenous ethylene production was stress-induced (Lafuente et al., 2003). Furthermore, a wound assay induced a rapid increase in ethylene production and ACC content in orange tissues, indicating the importance of ethylene as a damage signalling molecule in citrus (Zacarias and Alferez, 2007). In other non-climacteric fruit, such as zucchini, it has been published that ethylene production occurs not only during fruit rewarming but also under cold storage, which could be partly responsible for peel chilling injury (Megías et al., 2016). In addition, it is worth nothing that the increase of total-ACC observed in lemons from IF system before storage (Fig. 3D) was also evident after a week of cold storage, although it was independent of the rind pitting incidence (Fig. 6D). Thus, the IF system would increase ACC-synthase activity leading to high total-ACC content which was evident after degreening and even after cold storage. The results showed that the TAA was significantly ($p < 0.05$) higher in fruits without rind pitting than in fruits with rind pitting symptoms (Fig. 6E), showing a decrease of ca. 3.5-fold on average. This effect could be related to the scavenging activity of free radicals produced during cell collapse, which consume the antioxidant compounds (Costanzo et al., 2022). Furthermore, an effect of the fertigation system was observed, since the highest TAA levels were found in fruits harvested from the SF system, independently of the rind damage (Fig. 6E), maintaining the differences previously observed in Fig. 3E.

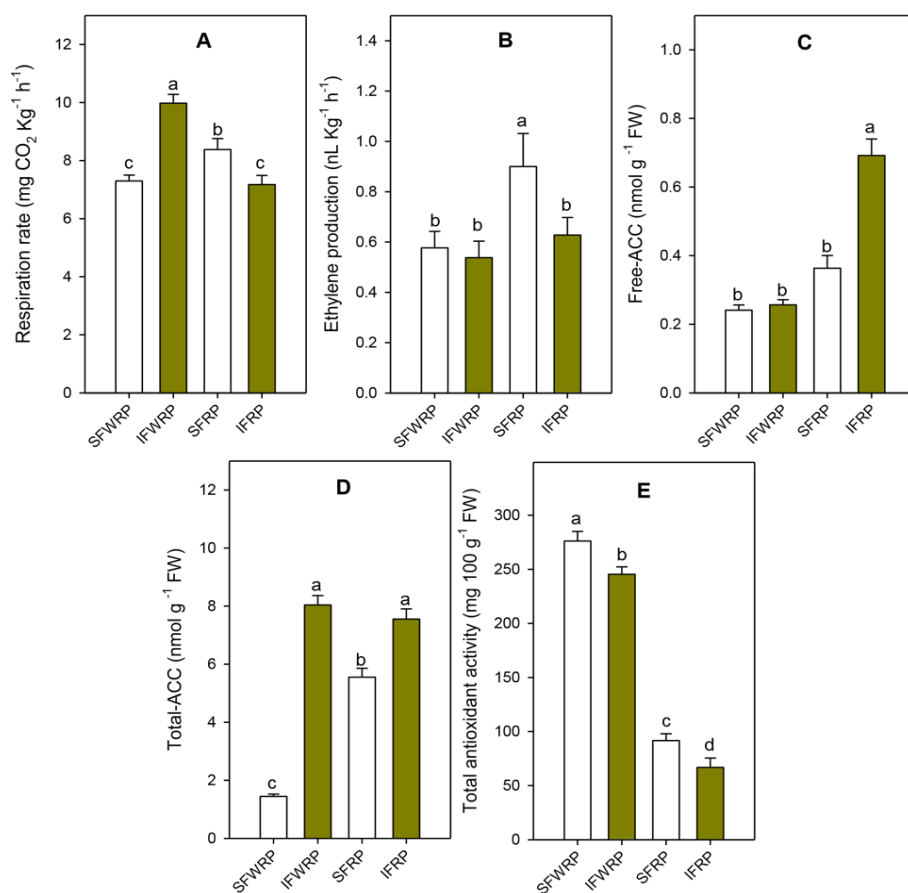


Fig. 6. Effect of standard fertiligation (SF) and intensive fertiligation (IF) on **A)** respiration rate and **B)** ethylene production of lemons stored for 7 days at 8 °C without rind pitting (WRP) and with rind pitting (RP). Furthermore, **C)** free 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (Free-ACC), **D)** total 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (Total-ACC) and **E)** total antioxidant activity were determined in lemon peel. Different letters show significant differences at $p < 0.05$ according to Tukey's range test.

Results in Fig. 7 showed that free PAs decreased during cold storage in all lemon samples as compared with results after degreening (Fig. 4). After cold storage, Put and Spm showed the highest levels in lemons without rind pitting compared to those with rind pitting (Fig. 7A and C). Regarding Spd, lemons from SF system with rind pitting showed the highest levels, while no significant ($p < 0.05$) differences were found between other samples (Fig. 7B). In addition, total PAs content (Put + Spd + Spm) was higher in lemon without rind pitting than in those showing high rind pitting scores, either for SF as for IF systems, with values of 159.63 ± 4.39 and 166.38 ± 5.42 nmol g⁻¹ for SFWRP and IFWRP, respectively and 120.11 ± 3.87 and 95.01 ± 4.21 nmol g⁻¹ for SFRP and IFRP, respectively. In addition, the results showed that SFWRP and IFWRP lemons had similar Spm values (Fig. 7C), which could be related to the fact that these lemons did not develop rind pitting during the cold storage. Therefore, this experiment shows that in both fertiligation systems there are lemons with good quality characteristics to prevent rind disorders during storage. These results highlight the importance of the

PA accumulation to protect lemon fruit against rind pitting incidence. Previous studies have providing evidences regarding the role of Spm inducing stress tolerance (Alcàzar et al., 2020). This effect could be explained by several mechanisms; the first would be the capacity of PAs to inhibit the oxidation of metals, decreasing the production of oxidative species; the second would be indirectly through the regulation of genes encoding the antioxidant machinery or by increasing the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase; and the third would be through the induction of H₂O₂ by PA oxidases acting as a signaling to induce antioxidant enzymes (Shi et al., 2010; Tanou et al., 2014; Moschou et al., 2008). In these results Spm was the PA that showed the highest differences between fruit with and without rind pitting symptoms (Fig. 7C), which has been previously reported by Hasan et al. (2021) in plants under stress conditions. The elevated concentration of Spm could be induced as a part of the antioxidant systems under stress conditions (Capell et al., 2004). Moreover, the involvement of Spd in stress resistance has been also supported by experiments that studied the effects of the mutation of PAO5 gene or by overexpression of genes encoding SAM decarboxylase or Spm synthase which caused higher tolerance to different types of abiotic stresses (Sánchez-Rodríguez et al., 2016). In this sense, the higher level of Spm found in SFWRP and IFWRP lemons (Fig. 7A) could be explained by the Spm synthase activity, since in these samples the lower levels of free-ACC and ethylene production (Fig. 6B and C).

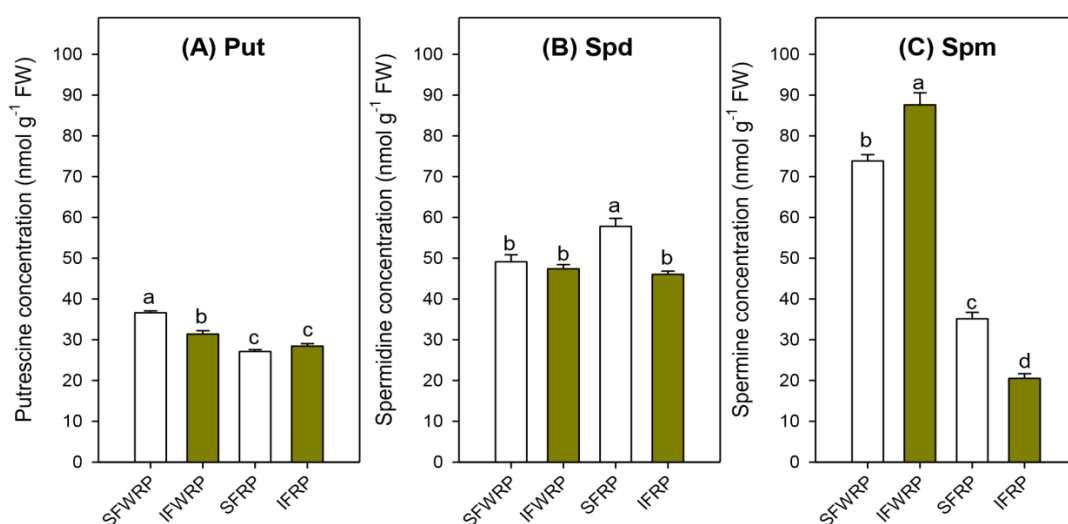


Fig. 7. Effect of standard fertigation (SF) and intensive fertigation (IF) on A) putrescine (Put), B) spermidine (Spd) and C) spermine (Spm) concentration of lemon peel taken from fruit without rind pitting (WRP) and with rind pitting (RP) stored for 7 days at 8 °C. Different letters showed significant differences at $p < 0.05$ according to Tukey's range test.

A principal component analysis (PCA) was applied to the whole results showing that PC-1 and PC-2 accounted for 63 % and 21 % of the total variance of the X and Y variables, respectively (Fig. 8). The cumulative variance contribution of PC-1 and PC-2 was 84 %. PC-1 was clearly identified with respiration rate (0.42), ethylene production (0.44), free-ACC (0.39), Put (0.39) and Spd (0.33), while PC-2 was related to TAA (0.70), total-ACC (- 0.71), and Spm (0.62). All parameters were found on the positive side of the PC-1. The most important parameters on the positive side of the PC-2 were respiration rate, TAA, Spm, and Put, while ethylene production, Spd, free-ACC and total-ACC were on the negative side. The results showed that PC-1 allowed the differentiation of three groups: two groups consisting of lemons from the SF and IF systems after degreening, and another group consisting of lemons after 7 days of cold storage, regardless of the fertigation system, without rind pitting symptoms, which also included the SF and IF lemons with rind pitting. Regarding PC-2, the results showed four groups: the first group consisted of lemons from the SF system without rind pitting after 7 days of cold storage, the second group consisted of lemons from the IF system without rind pitting after 7 days of cold storage and those harvested from the SF system after degreening, the third group contained lemons from the IF system after degreening and those from the SF system with rind pitting symptoms, and the fourth group consisted of IF lemons with rind pitting. Therefore, the fertigation system in lemons after degreening, and, the cold storage time were closely related to the respiration rate, ethylene production, Spd, Put and free-ACC while the rind pitting symptoms were more dependent on Spm, TAA and total-ACC.

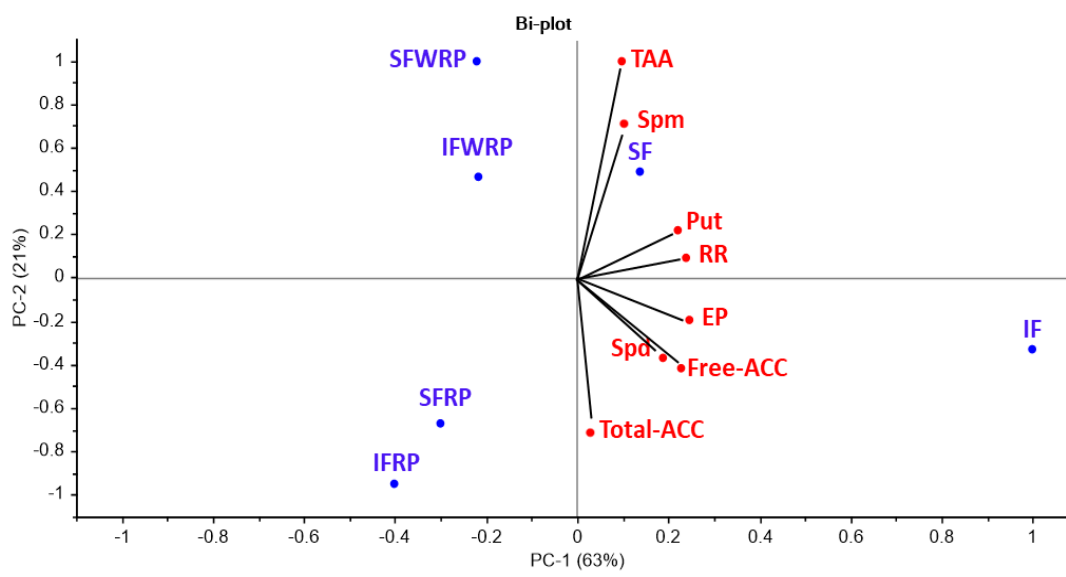


Fig. 8. Principal component analysis (PCA) biplot showing the relationships among different samples and the measured parameters. Samples are shown in blue (•) and the parameter vectors are shown in red (•). Lemon samples were abbreviated as follows; standard fertigation (SF), intensive fertigation (IF), standard fertigation without rind pitting (SFWRP), intensive fertigation without rind pitting (IFWRP), standard fertigation with rind pitting (SFRP) and intensive fertigation with rind pitting (IFRP). The parameters included in the analysis were respiration rate (RR), ethylene production (EP), free 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (Free-ACC), total 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (Total-ACC), total antioxidant activity (TAA), putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

6.4. Conclusion

The present study revealed that ethylene production through the biosynthesis of its precursor (ACC) was drastically increased in lemons grown under the IF system after degreening, which significantly reduced the accumulation of free PAs in these peel samples compared to lemons from the SF system. In addition, when rind pitting appeared on the production was detected, although total-ACC was high in fruits from the IF system and/or rind pitting. Furthermore, it was observed that free PAs were lower in samples with a high incidence and severity of rind pitting, regardless of the fertigation system. The results also showed the importance of Spm in controlling the severity of the rind pitting. Therefore, the overall data showed that ACC synthesis is induced under stress conditions, while increased PAs levels have a role as an adaptative response to protect against IF, degreening process and cold storage conditions, although further research is needed to understand the molecular mechanism involved in these responses.

References

- Agudelo-Romero, P., Bortolotti, C., Pais, M.S., Tiburcio, A.F., Fortes, A.M., 2013. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiol. Biochem.* 67, 105–119. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.024>.
- Alcàzar, R., Bueno, M., Tiburcio, A.F., 2020. Polyamines: small amines with large effects on plant abiotic stress tolerance. *Cells* 9, 2373. <https://doi.org/10.3390/cells9112373>.
- Alferez, F., Zacarias, L., Burns, J.K., 2005. Low relative humidity at harvest and before storage at high humidity influence the severity of postharvest peel pitting in citrus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130, 225–231. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.225>.
- Alferez, F., Alquézar, B., Burns, J.K., Zacarias, L., 2010. Variation in water, osmotic and turgor potential in peel of ‘Marsh’ grapefruit during development of postharvest peel pitting. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.12.007>.
- Alferez, F., Zacarías, L., 2014. Influence of fruit maturity in the susceptibility of Navelina oranges to develop postharvest non-chilling peel pitting. *Food Sci. Technol. Int.* 20, 183–191. <https://doi.org/10.1177/1082013213476077>.
- Alquézar, B., Mesejo, C., Alferez, F., Agustí, M., Zacarias, L., 2010. Morphological and ultrastructural changes in the peel of ‘Navelate’ oranges in relation to variations in relative humidity during postharvest storage and development of peel pitting. *Postharvest Biol. Technol.* 56, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.12.005>.
- Anwar, R., Mattoo, A.K., Handa, A.K., 2015. Polyamine interactions with plant hormones: crosstalk at several levels. In: Kusano, T., Suzuki, H. (Eds.), *Polyamines*. Springer, Tokyo, pp. 267–302. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55212-3_22.
- Blázquez, M.A., 2024. Polyamines: their role in plant development and stress. *Annu. Rev. Plant Biol.* 75, 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070623-110056>.
- Capell, T., Bassie, L., Christou, P., 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9909–9914. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306974101>.
- Costanzo, G., Vitale, E., Iesce, M.R., Naviglio, D., Amoresano, A., Fontanarosa, C., Spinelli, M., Ciaravolo, M., Arena, C., 2022. Antioxidant properties of pulp, peel and seeds of Phlegrean Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) at different stages of fruit ripening. *Antioxidants* 11, 187. <https://doi.org/10.3390/antiox11020187>.
- Cronje, P.J.R., Zacarias, L., Alferez, F., 2017. Differential susceptibility to peel pitting in fruit from citrus cultivars with different albedo thickness. *Postharvest Biol. Technol.* 123, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.012>.
- Ding, Y., Chang, Y., Ma, Q., Chen, L., Liu, S., Jin, S., Han, J., Xu, R., Zhu, A., Guo, J., Luo, Y., Xu, J., Xu, Q., Zeng, Y.L., Deng, X., Cheng, Y., 2015. Network analysis of postharvest senescence process in citrus fruits revealed by transcriptomic and metabolomic profiling. *Plant Physiol.* 168, 357–376. <https://doi.org/10.1104/pp.114.255711>.
- European Union. Regulation (EU) 2018/848 of the European Parliament and of the Council of 30 May 2018 on Organic Production and Labelling of Organic Products and Repealing Council Regulation (EC) No 834/2007. EUR-Lex 02018R0848- 20241201.
- Establés-Ortiz, B., Romero, P., Ballester, A.R., Gonz’alez-Candelas, L., Lafuente, M.T., 2016. Inhibiting ethylene perception with 1-methylcyclopropene triggers molecular responses aimed to cope with cell toxicity and increased respiration in citrus fruits. *Plant Physiol. Biochem.* 103, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.036>.

- Feng, G., Wu, J., Xu, Y., Lu, L., Yi, H., 2021. High-spatiotemporal-resolution transcriptomes provide insights into fruit development and ripening in *Citrus sinensis*. *Plant Biotechnol. J.* 19, 1337–1353. <https://doi.org/10.1111/pbi.13549>.
- Guo, J., Wang, S., Yu, X., Dong, R., Li, Y., Mei, X., Shen, Y., 2018. Polyamines regulate strawberry fruit ripening by abscisic acid, auxin, and ethylene. *Plant Physiol.* 177, 339–351. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00245>.
- Hasan, M., Skalicky, M., Jahan, M.S., Hossain, M., Anwar, Z., Nie, Z.F., Alabdallah, N.M., Brestic, M., Hejnak, V., Fang, X.-W., 2021. Spermine: its emerging role in regulating drought stress responses in plants. *Cells* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/cells10020261>.
- Hou, J., Liang, L., Su, M., Yang, T., Mao, X., Wang, Y., 2021. Variations in phenolic acids and antioxidant activity of navel orange at different growth stages. *Food Chem.* 360, 129980. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129980>.
- Hussain, Z., Singh, Z., 2015. Involvement of polyamines in creasing of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] fruit. *Sci. Hortic.* 190, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.04.013>.
- Jangra, A., Chaturvedi, S., Kumar, N., Sing, H., Sharma, V., Thakur, M., Tiwari, S., Chhokar, V., 2023. Polyamines: the gleam of next-generation plant growth regulators for growth, development, stress mitigation, and hormonal crosstalk in plants—a systematic review. *J. Plant Growth Regul.* 42, 5167–5191. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10846-4>.
- Kawaleguet, M.G., Chen, F.Y., Shi, W.L., Wu, Z.B., Wang, L.Y., Ban, Z.J., Liu, L.L., Wang, L.J., Wu, Y.F., 2022. Exogenous polyamines alleviate chilling injury of *Citrus limon* (L.) Burm. f. fruit. *Int. Food Res. J.* 29, 698–706. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.3.21>.
- Kuang, J.F., Chen, J.Y., Luo, M., Wu, K.Q., Sun, W., Jiang, Y.M., Lu, W.J., 2012. Histone deacetylase HD2 interacts with ERF1 and is involved in longan fruit senescence. *J. Exp. Bot.* 63, 441–454. <https://doi.org/10.1093/jxb/err290>.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y., 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 228, 367–381. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0772-7>.
- Lafuente, M.T., Sala, J.M., Zacarias, L., 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3606–3611. <https://doi.org/10.1021/jf035185i>.
- Lafuente, M.T., Zacarias, L., Martínez-T' ellez, M.A., S' anchez-Ballesta, M.T., Granell, A., 2003. Phenylalanine ammonia-lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. *Postharvest Biol. Technol.* 29, 309–318. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00047-4](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00047-4).
- Li, L., Lv, F.Y., Guo, Y.Y., Wang, Z.Q., 2016. Respiratory pathway metabolism and energy metabolism associated with senescence in postharvest Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) florets in response to O₂/CO₂ controlled atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.* 111, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.032>.
- Lokesh, V., Manjunatha, G., Hegde, N.S., Bulle, M., Puthusseri, B., Gupta, K.J., Neelwarne, B., 2019. Polyamine induction in postharvest banana fruits in response to NO donor SNP occurs via l-arginine mediated pathway and not via competitive diversion of S-adenosyl-l-methionine. *Antioxidants* 8, 358. <https://doi.org/10.3390/antiox8090358>.
- Martínez-Esplà, A., Zapata, P.J., Valero, D., Martínez-Romero, D., Díaz-Mula, H.M., Serrano, M., 2018. Preharvest treatments with salicylates enhance nutrient and antioxidant compounds in plum at harvest and after storage. *J. Sci. Food Agric.* 98, 2742–2750. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8770>.
- Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M., Martínez-S' anchez, F., Riquelme, F., 1999. Effects of post-harvest putrescine and calcium treatments on reducing mechanical damage and polyamines and abscisic acid levels during lemon storage. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1589–1595. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199909\)79:12<1589:AID-JSFA403>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1589:AID-JSFA403>3.0.CO;2-J).

- McDonald, R.E., 1989. Temperature-conditioning affects polyamines of lemon fruits stored at chilling temperatures. *Hortscience* 24, 475–477. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.24.3.475>.
- Megías, Z., Martínez, C., Manzano, S., García, A., Reboloso-Fuentes, M.M., Valenzuela, J.L., Garrido, D., Jamilena, M., 2016. Ethylene biosynthesis and signaling elements involved in chilling injury and other postharvest quality traits in the non-climacteric fruit of zucchini (*Cucurbita pepo*). *Postharvest Biol. Technol.* 113, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.11.001>.
- Mehta, R.A., Cassol, T., Li, N., Ali, N., Handa, A.K., Mattoo, A.K., 2002. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nat. Biotechnol.* 20, 613–618. <https://doi.org/10.1038/nbt0602-613>.
- Mo, A., Xu, T., Bai, Q., Shen, Y., Gao, F., Guo, J., 2020. FaPAO5 regulates Spm/Spd levels as a signaling during strawberry fruit ripening. *Plant Direct* 4, e00217. <https://doi.org/10.1002/pld3.217>.
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Delis, I.D., Andriopoulou, A.H., Lagiotis, G.D., Yakoumakis, D.I., Roubelakis-Angelakis, K., 2008. Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20, 1708–1724. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059733>.
- Puente-Moreno, J., Garrido-Aunon, F., García-Pastor, M.E., Valero, D., Serrano, M., 2025. The renaissance of polyamines: new roles in crop yield and quality properties in freshly fruit. *Agronomy* 15, 201. <https://doi.org/10.3390/agronomy15010201>.
- Rodrigo, M.J., Zacarias, L., 2007. Effect of postharvest ethylene treatment on carotenoid accumulation and the expression of carotenoid biosynthetic genes in the flavedo of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 43, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.008>, 2007.
- Romero, P., Lafuente, M.T., 2022. Ethylene-driven changes in epicuticular wax metabolism in citrus fruit. *Food Chem.* 372, 131320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131320>.
- Sánchez-Rodríguez, E., Romero, L., Ruiz, J.M., 2016. Accumulation of free polyamines enhances the antioxidant response in fruits of grafted tomato plants under water stress. *J. Plant Physiol.* 190, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.010>.
- Sati, H., Oberoi, H.S., Pareek, S., 2024. Is ATP a signaling regulator for postharvest chilling tolerance in fruits? *Hortic. Res.* 11, uhae204. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae204>.
- Serna-Escolano, V., Dobòn-Suárez, A., Giménez, M.J., Zapata, P.J., Gutiérrez-Pozo, M., 2023. Effect of fertigation on the physicochemical quality and antioxidant system of ‘Fino’ lemons during postharvest Storage. *Agriculture* 13, 766. <https://doi.org/10.3390/agriculture13040766>.
- Serna-Escolano, V., Giménez, M.J., García-Pastor, M.E., Dobòn-Suárez, A., Pardo-Pina, S., Zapata, P.J., 2022. Effects of degreening treatment on quality and shelf-life of organic lemons. *Agronomy* 12, 270. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020270>.
- Shi, J., Fu, X.Z., Peng, T., Huang, X.S., Fan, Q.J., Liu, J.H., 2010. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiol.* 30, 914–922. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq030>.
- Tanou, G., Ziogas, V., Belghazi, M., Christou, A., Filippou, P., Job, D., Fotopoulos, V., Malassiotis, A., 2014. Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant Cell Environ.* 37, 864–885. <https://doi.org/10.1111/pce.12204>.
- Torrigiani, P., Bressanin, D., Ruiz, K.B., Tadiello, A., Trainotti, L., Bonghi, C., Ziosi, V., Costa, G., 2012. Spermidine application to young developing peach fruits lead to a slowing down of ripening by impairing ripening-related ethylene and auxin metabolism and signaling. *Physiol. Plantarum* 146, 86–98. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01612.x>.
- Tosetti, R., Elmi, F., Pradas, I., Cools, K., Terry, L.A., 2020. Continuous exposure to ethylene differentially affects senescence in receptacle and achene tissues in strawberry fruit. *Front. Plant Sci.* 11, 174. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00174>.

- Valero, D., Martínez-Romero, D., Serrano, M., Riquelme, F., 1998. Influence of postharvest treatment with putrescine and calcium on endogenous polyamines, firmness, and abscisic acid in lemon (*Citrus limon* L. Burm Cv. Verna). *J. Agric. Food Chem.* 46, 2102–2109. <https://doi.org/10.1021/jf970866x>.
- Wong, W.S., Li, G.G., Ning, W., Xu, Z.F., Hsiao, W.L.W., Zhang, L.Y., Li, N., 2001. Repression of chilling-induced ACC accumulation in transgenic citrus by over-production of antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase RNA. *Plant Sci.* 161, 969–977. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00505-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00505-2).
- Wormit, A., Usadel, B., 2018. The multifaceted role of pectin methylesterase inhibitors (PMEIs). *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2878. <https://doi.org/10.3390/ijms19102878>.
- Zacarias, L., Alferez, F., 2007. Regulation by carbon dioxide of wound-induced ethylene biosynthesis in the peel of citrus fruit. *Food Sci. Technol. Int.* 13, 497–504. <https://doi.org/10.1177/1082013207087812>.
- Zacarias, L., Cronjé, P., Palou, L., 2020. *Postharvest Technology of Citrus Fruits*. Elsevier eBooks, pp. 421–446. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00021-8>.
- Zapata, P.J., Serrano, M., Pretel, M.T., Amorós, A., Botella, M.A., 2003. Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. *Plant Sci.* 164, 557–563.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00005-0).
- Zapata, P.J., Serrano, M., Pretel, M.T., Amorós, A., Botella, M.A., 2004. Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Sci.* 167, 781–788. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.05.014>.
- Zarza, X., Atanasov, K.E., Marco, F., Arbona, V., Carrasco, P., Kopka, J., Fotopoulos, V.,
- Munnik, T., Gómez-Cadenas, A., Tiburcio, A.F., Alcázar, R., 2017. Polyamine oxidase 5 loss-of-function mutations in *Arabidopsis thaliana* trigger metabolic and transcriptional reprogramming and promote salt stress tolerance. *Plant Cell Environ.* 40, 527–542. <https://doi.org/10.1111/pce.12714>.
- Zhou, M., Guo, S., Zhang, J., Zhang, H., Li, C., Tang, X., Ren, Y., Gong, G., Xu, Y., 2016. Comparative dynamics of ethylene production and expression of the ACS and ACO genes in normal-ripening and non-ripening watermelon fruits. *Acta Physiol. Plant.* 38, 228. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2248-x>.

7. CONCLUSIONI

Considerata l'assenza, nell'ultimo cinquantennio, di ricerche sistematiche sulla forzatura del limone, i risultati di questo studio rappresentano un contributo originale alla comprensione degli effetti di tale tecnica, offrendo nuove prospettive per lo sviluppo di strategie irrigue più sostenibili nei sistemi agrumicoli mediterranei, sia in termini di efficienza d'uso dell'acqua sia di ottimizzazione della produttività. Il presente lavoro ha fornito un quadro dettagliato sull'efficacia dell'irrigazione a deficit controllato (DIC) come alternativa sostenibile alla forzatura nel limone (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), innestato su due differenti portinnesti: *Carrizo citrange* e *Citrus volkameriana*. L'approccio integrato adottato, comprendente monitoraggio fisiologico, diagnostica fogliare non distruttiva, analisi dell'efficienza d'uso dell'acqua (WUE) e valutazione morfometrica mediante tecnologia LiDAR, ha consentito di delineare con precisione le risposte delle piante a differenti regimi irrigui, in due annate consecutive caratterizzate da condizioni climatiche divergenti. I risultati hanno mostrato che la risposta al deficit idrico è fortemente influenzata dal portinnesto. *Volkamer* si è confermato ad elevata vigoria, con accrescimenti importanti anche in condizioni di irrigazione limitata, ma più vulnerabile sul piano fisiologico, soprattutto in caso di stress prolungato. *Carrizo*, al contrario, ha evidenziato una minore espansione vegetativa, ma una superiore efficienza fisiologica, con maggiore stabilità degli scambi gassosi e miglior capacità di recupero post-stress.

Le differenze biometriche sono risultate significative: nel 2023, le piante innestate su *Volkamer* in tesi CTR hanno raggiunto un'altezza media di 3,18 m e un volume di chioma superiore a 2,40 m³, mentre *Carrizo* si è attestato rispettivamente a 2,60 m e circa 1,50 m³. Le tesi DIC 25 e 50 si sono dimostrate particolarmente promettenti, consentendo una riduzione significativa degli apporti irrigui senza compromissioni strutturali o funzionali rilevanti, specialmente nelle piante innestate su *Carrizo*. In particolare, le piante in DIC 25 su *Carrizo* hanno mostrato una riduzione della WUE superiore all'80% rispetto al controllo, senza perdita evidente di vigore strutturale, suggerendo un'efficienza metabolica compensativa. In *Volkamer*, al contrario, si sono osservati valori di WUE negativi e una minore capacità di ristabilire l'equilibrio tra traspirazione e fotosintesi dopo il ripristino dell'irrigazione.

Dal punto di vista fisiologico, *Carrizo* ha mantenuto valori più elevati di clorofilla e NBI (fino a 30,38 DU nel 2023 e 29,90 nel 2024 in CTR), rispetto a *Volkamer* (massimo 23,75 DU nel 2023). Anche il contenuto in flavonoidi è risultato superiore in *Carrizo*, con picchi oltre i 30 DU in condizioni di stress, indicando un'attivazione più efficace delle difese

antiossidanti. Sebbene *Volkamer* presenti valori assoluti maggiori per la densità fogliare (LAD), *Carrizo* ha mostrato una plasticità adattativa superiore. Nel 2024, ad esempio, nella tesi F, il LAD di *Carrizo* è aumentato da 1,58 a oltre 2,02 m²/m³, segnalando una riorganizzazione fogliare funzionale alle nuove condizioni ambientali.

L'analisi del potenziale idrico del fusto (Ψ_{stem}), correlato ai valori di contenuto idrico volumetrico (VWC) e alla temperatura del suolo, ha confermato la validità dell'approccio integrato per la gestione dell'irrigazione, dimostrando che il monitoraggio continuo permette di identificare tempestivamente gli stati di stress e migliorare la tempistica degli interventi irrigui. L'impiego di sensori portatili, come il Dualex, ha evidenziato il potenziale delle tecnologie di *proximal sensing* nella valutazione dello stato fisiologico e nutrizionale delle piante. In particolare, l'NBI si è dimostrato un marcatore efficace della resilienza metabolica, indicando che *Carrizo*, grazie alla sua capacità di mantenere valori elevati anche in condizioni limitanti, è più adatto all'adozione di strategie irrigue conservative.

Infine, l'analisi morfometrica con LiDAR ha evidenziato differenze significative nello sviluppo tridimensionale della chioma tra i due portinnesti. Sebbene *Volkamer* abbia espresso valori biometrici più elevati, *Carrizo* ha mostrato una maggiore capacità adattativa, particolarmente nelle tesi a DIC, rendendolo un candidato preferibile nei sistemi agrumicoli orientati all'ottimizzazione delle risorse. A complemento, un'esperienza di laboratorio condotta in Spagna ha rivelato il ruolo centrale di poliammine ed etilene nella risposta post-raccolta dei frutti di limone 'Fino' prodotti in fertirrigazione intensiva: un aumento del 300% dell'etilene e una riduzione delle poliammine protettive sono stati associati a maggiore incidenza di *rind pitting*, sottolineando i rischi di pratiche irrigue eccessivamente spinte.

In conclusione, l'irrigazione a deficit controllato si conferma un'alternativa agronomicamente valida alla forzatura, capace di coniugare sostenibilità produttiva con buone performance qualitative e fisiologiche, soprattutto se applicata in associazione a portinnesti resilienti come *Carrizo*. Le ricadute pratiche dello studio sono molteplici e costituiscono una base solida per l'adozione di pratiche irrigue più efficienti e tecnologie di monitoraggio avanzate. In prospettiva, sarà necessario estendere il monitoraggio a un orizzonte temporale più ampio, integrando dati climatici e pedologici per validare la stabilità degli effetti osservati. Lo sviluppo di studi trascrittomici e metabolomici, attualmente ostacolato dalla perdita di campioni biologici, potrà contribuire all'identificazione di marcatori molecolari utili per la selezione di genotipi resilienti. L'integrazione di dati fisiologici e biometrici con modelli predittivi, anche basati su *machine learning*, consentirà una gestione dinamica e sito-specifica dell'irrigazione.

In quest'ottica, la sinergia tra sensori prossimali, dati ambientali e sistemi di supporto alle decisioni (DSS) rappresenta una delle frontiere più promettenti dell'agricoltura di precisione. Sarà altresì opportuno validare l'efficacia delle strategie DIC su altri portinnesti e in ambienti pedoclimatici differenti, al fine di definirne la trasferibilità e l'adattabilità ai diversi contesti produttivi. Una prospettiva di sviluppo futura del presente filone di ricerca prevede l'adozione di strumenti di analisi genomica e trascrittomica, al fine di individuare geni chiave coinvolti nei meccanismi di adattamento e regolazione della fioritura. Il rapido avanzamento delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha reso possibile la gestione di grandi volumi di dati molecolari (*big data*), facilitando l'accesso a informazioni dettagliate sui genomi degli agrumi. Tali risorse consentono oggi di esplorare le relazioni genetiche tra genotipi e di identificare marcatori utili per la selezione assistita e lo sviluppo di varietà più resilienti. Studi condotti su piante modello hanno già chiarito il ruolo di geni regolatori coinvolti nei complessi network molecolari che controllano il tempo di fioritura, l'adattamento ambientale e le risposte ormonali, suggerendo che un'integrazione dei dati fisiologici e genomici potrebbe aprire la strada a una gestione più razionale, predittiva e mirata della tecnica della *forzatura* in limone. L'approccio multifattoriale proposto potrà essere esteso ad altre specie arboree, contribuendo allo sviluppo di sistemi culturali resilienti, efficienti nell'uso delle risorse e meglio preparati ad affrontare le sfide imposte dal cambiamento climatico. In un'epoca in cui la ricerca è chiamata a rispondere alle esigenze sempre più pressanti del Pianeta, la missione scientifica è quella di fornire soluzioni integrate, innovative e coerenti con una visione agronomica evoluta, senza dimenticare gli insegnamenti del passato.

8. BIBLIOGRAFIA

- Agati, G. *et al.* (2013) 'Fluorescence-based versus reflectance proximal sensing of nitrogen content in *Zoysia matrella* and *Paspalum vaginatum* turfgrasses', *European Journal of Agronomy*, 45, pp. 39–51. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2012.10.011>.
- Al-Jaleel, A., Zekri, M. and Hammam, Y. (2005) 'Yield, fruit quality, and tree health of "Allen Eureka" lemon on seven rootstocks in Saudi Arabia', *Scientia Horticulturae*, 105(4), pp. 457–465. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.02.008>.
- Andreu-Coll, L. *et al.* (2024) 'Regulated Deficit Irrigation Perspectives for Water Efficiency in Apricot Cultivation: A Review', *Agronomy*, 14(6), p. 1219. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy14061219>.
- Arnqvist, J., Freier, J. and Dellwik, E. (2020) 'Robust processing of airborne laser scans to plant area density profiles', *Biogeosciences*, 17(23), pp. 5939–5952. Available at: <https://doi.org/10.5194/bg-17-5939-2020>.
- Assar, P., Shekafandeh, A. and Taghipour, L. (2021) 'Physiological and Biochemical Responses of Citrus Seedling Rootstocks to Drought Stress and After Rewatering', *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 22(3), pp. 349–370.
- Augusti M. 2000. Citricultura, Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Baker, N.R. and Rosenqvist, E. (2004) 'Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities', *Journal of experimental botany*, 55(403), pp. 1607–1621.
- Ballester, C. *et al.* (2013) 'Thermographic measurement of canopy temperature is a useful tool for predicting water deficit effects on fruit weight in citrus trees', *Agricultural Water Management*, 122, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.02.005>.
- Barbera, G., Carimi, F. and Leone, F. (1988) 'Effects of different levels of water stress on yield and quality of lemon trees', in *Proceedings of the Sixth International Citrus Congress, Tel Aviv, Israel*, pp. 712–722.
- Barbera, G. and Carimi, F. 1988. Effects of different level of water stress on yield and quality of lemon trees. Proc. Inter. Citrus. Cong. 6:717-722.
- Barbera, G., Fatta Del Bosco, G. and Lo Cascio, B. 1985. Effects of water stress on lemon summer bloom: the 'forzatura' technique in the Sicilian citrus industry. Acta Hort. 171:391-397.
- Barry, G., Castle, W. and Davies, F. (2004) 'Rootstocks and Plant Water Relations Affect Sugar Accumulation of Citrus Fruit Via Osmotic Adjustment', *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 129, pp. 881–889. Available at: <https://doi.org/10.21273/JASHS.129.6.0881>.
- Bates, L.M. and Hall, A.E. (1981) 'Stomatal closure with soil water depletion not associated with changes in Bulk leaf water status', *Oecologia*, 50(1), pp. 62–65. Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00378794>.
- Benavente-García, O., Castillo, J., 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J. Agric. Food Chem. 56, 6185–6205. <https://doi.org/10.1021/jf8006568>.
- Bilger, W. *et al.* (1997) 'Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence', *Physiologia Plantarum*, 101(4), pp. 754–763. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01060.x>.
- Bilger, W., Johnsen, T. and Schreiber, U. (2001) 'UV-excited chlorophyll fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants', *Journal of Experimental Botany*, 52(363), pp. 2007–2014. Available at: <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.363.2007>.
- Boyer, J.S. (1989) 'Water potential and plant metabolism: comments on Dr P. J. Kramer's article "Changing concepts regarding plant water relations", Volume 11, Number 7, pp. 565–568, and Dr J. B. Passioura's Response, pp. 569–571', *Plant, Cell & Environment*, 12(2), pp. 213–216. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1989.tb01935.x>.

- Bray, E.A. (1997) 'Plant responses to water deficit', *Trends in Plant Science*, 2(2), pp. 48–54. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)82562-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82562-9).
- Brotons, J.M. *et al.* (2013) 'A fuzzy approach to the loss of green colour in lemon (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) rind during ripening', *Computers and Electronics in Agriculture*, 98, pp. 222–232. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.08.011>.
- Cano, F.J., López, R. and Warren, C.R. (2014) 'Implications of the mesophyll conductance to for photosynthesis and water-use efficiency during long-term water stress and recovery in two contrasting ucalyptus species', *Plant, Cell & Environment*, 37(11), pp. 2470–2490. Available at: <https://doi.org/10.1111/pce.12325>.
- Capra, A., Consoli, S. and Scicolone, B. (2008) 'Deficit irrigation: Theory and practice', in *Agricultural Irrigation Research Progress*, pp. 53–83.
- Carr, M.K.V. (2012) 'The water relations and Irrigation Requirements of Citrus (Citrus Spp.): A Review', *Experimental Agriculture*, 48(3), pp. 347–377. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0014479712000038>.
- Cartelat, A. *et al.* (2005) 'Optically assessed contents of leaf polyphenolics and chlorophyll as indicators of nitrogen deficiency in wheat (*Triticum aestivum* L.)', *Field Crops Research*, 91(1), pp. 35–49. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.05.002>.
- Castle, W.S. (1995) 'Rootstock as a fruit quality factor in citrus and deciduous tree crops', *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23(4), pp. 383–394. Available at: <https://doi.org/10.1080/01140671.1995.9513914>.
- Castle, W.S. *et al.* (2011) 'Rootstocks affect tree growth, yield, and juice quality of 'Marsh' grapefruit', *HortScience*, 46(6), pp. 841–848.
- Cerovic, Z.G. *et al.* (2012) 'A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids', *Physiologia Plantarum*, 146(3), pp. 251–260. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>.
- Cerovic, Z.G. *et al.* (2015) 'Nondestructive Diagnostic Test for Nitrogen Nutrition of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Based on Dualex Leaf-Clip Measurements in the Field', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), pp. 3669–3680. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00304>.
- Chalker-Scott, L. (1999) 'Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses', *Photochemistry and Photobiology*, 70(1), pp. 1–9. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1999.tb01944.x>.
- Chalmers, D.J., Mitchell, P.D. and Heck, L. van (1981) 'Control of Peach Tree Growth and Productivity by Regulated Water Supply, Tree Density, and Summer Pruning¹', *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106(3), pp. 307–312. Available at: <https://doi.org/10.21273/JASHS.106.3.307>.
- Chalmers, D. J., Burge, G., Jerie, P. H., & Mitchell, P. D. (1986). The mechanism of regulation of 'Bartlett' pear fruit and vegetative growth by irrigation withholding and regulated deficit irrigation.
- Chartzoulakis, K. *et al.* (2002) 'Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars', *Scientia Horticulturae*, 95(1), pp. 39–50. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00016-X).
- Chaves, M.M. *et al.* (2002) 'How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth', *Annals of Botany*, 89(7), pp. 907–916. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf105>.
- Chen, J.M. and Black, T.A. (1991) 'Measuring leaf area index of plant canopies with branch architecture', *Agricultural and Forest Meteorology*, 57(1), pp. 1–12. Available at: [https://doi.org/10.1016/0168-1923\(91\)90074-Z](https://doi.org/10.1016/0168-1923(91)90074-Z).
- Chen, Y. *et al.* (2021) 'Evaluation of phenolic composition and antioxidant properties of different varieties of Chinese citrus', *Food Chemistry*, 364, p. 130413. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130413>.

- Chenafi, A. *et al.* (2016) 'Influence of irrigation strategies on productivity, fruit quality and soil-plant water status of subsurface drip-irrigated apple trees', *Fruits*, 71(2), pp. 69–78. Available at: <https://doi.org/10.1051/fruits/2015048>.
- Chica, E. J. and Albrigo, L. G. 2013. Expression of flower promoting genes in sweet orange during floral inductive water deficits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138(2), 88-94.
- Crescimanno, F.G. *et al.* (1956) 'Ricerche sulla forzatura del limone', *Rivista di ortoflorofrutticoltura italiana*, pp. 66–81.
- Dal Santo, S. *et al.* (2016) 'Distinct transcriptome responses to water limitation in isohydric and anisohydric grapevine cultivars', *BMC Genomics*, 17(1), p. 815. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3136-x>.
- Davies, W.J. and Zhang, J. (1991) 'Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil', *Annual Review of Plant Biology*, 42(Volume 42, 1991), pp. 55–76. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.000415>.
- Del Río J.A., M.D. Fuster, P. Gómez, I. Porras, A. García-Lidón, A. Ortuño. 2004. *Citrus limon (L.) Burm. f.*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chem.*, 84, pp. 457-461, 10.1016/S0308-8146(03)00272-3.
- Di Vaio C., G. Graziani, A. Gaspari, G. Scaglione, S. Nocerino and A. Ritieni. 2010. Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, 126, pp. 50-55, 10.1016/j.scienta.2010.06.010.
- Doorenbos, J., and Kassam, A. H. (1979). "Yield response to water." *FAO Irrig. and Drain. Paper*, 33, Food and Agric. Org., United Nations, Rome, Italy.
- English, M. (1990) 'Deficit Irrigation. I: Analytical Framework', *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, 116(3), pp. 399–412. Available at: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9437\(1990\)116:3\(399\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9437(1990)116:3(399)).
- Evans, J.R. (1989) 'Partitioning of Nitrogen Between and Within Leaves Grown Under Different Irradiances', *Functional Plant Biology*, 16(6), pp. 533–548. Available at: <https://doi.org/10.1071/pp9890533>.
- Fereres, E. and Soriano, M.A. (2007) 'Deficit irrigation for reducing agricultural water use', *Journal of Experimental Botany*, 58(2), pp. 147–159. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl165>.
- Ferrari, G.B. (no date) 'Hesperides sive de malorum aureorum cultura et usu'.
- Flexas, J. *et al.* (2012) 'The Response of Photosynthesis to Soil Water Stress', in R. Aroca (ed.) *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 129–144. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_5.
- Fulton, A. *et al.* (2014) 'Using the Pressure Chamber for Irrigation Management in Walnut, Almond and Prune'. Available at: <https://doi.org/10.3733/ucanr.8503>.
- Allen, G.R. (1998) 'Crop Evapotranspiration', *FAO Irrigation and Drainage Paper*, 56, pp. 60–64.
- García-Sánchez, F. *et al.* (2007) 'Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency', *Physiologia Plantarum*, 130(4), pp. 532–542. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00925.x>.
- García-Tejero, I. F., Durán-Zuazo, V. H., Muriel-Fernández, J. L., & Jiménez-Bocanegra, J. A. (2011). Linking canopy temperature and trunk diameter fluctuations with other physiological water status tools for water stress management in citrus orchards. *Functional Plant Biology*, 38(2), 106-117.
- Garnsey, S. *et al.* (2001) 'Budunion Incompatibilities and Associated Declines Observed in Florida Among Trees on Swingle Citrumelo and other Trifoliate Orange-Related Rootstocks', 114, pp. 121–127.
- Gayomba, S.R., Watkins, J.M. and Muday, G.K. (2017) 'Flavonols Regulate Plant Growth and Development through Regulation of Auxin Transport and Cellular Redox Status', in *Recent Advances in Polyphenol Research*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 143–170. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781118883303.ch7>.

- Gebre, G.M. and Kuhns, M.R. (1993) 'Effects of water stress preconditioning on gas exchange and water relations of *Populusdeltoides* clones', *Canadian Journal of Forest Research*, 23(7), pp. 1291–1297. Available at: <https://doi.org/10.1139/x93-165>.
- Georgiou, A. (2009) 'Evaluation of rootstocks for the Cyprus local lemon variety "Lapithkiotiki"', *Scientia Horticulturae*, 123(2), pp. 184–187. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.07.010>.
- Ghafar, M.F. *et al.* (2010) 'Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species', *African Journal of Biotechnology*, 9(3). Available at: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/77908> (Accessed: 16 January 2025).
- Giménez, M.J. *et al.* (2023) 'Effect of Cysteine with Essential Oils on Quality Attributes and Functional Properties of "Blanca de Tudela" Fresh-Cut Artichoke', *Foods*, 12(24), p. 4414. Available at: <https://doi.org/10.3390/foods12244414>.
- Goldhamer, D. A., & Salinas, M. (2000, December). Evaluation of regulated deficit irrigation on mature orange trees grown under high evaporative demand. In *Proceedings of internat soc citriculture IX congress* (pp. 227-231).
- Gomez-Cadenas, A. *et al.* (1996) 'Leaf Abscission Induced by Ethylene in Water-Stressed Intact Seedlings of Cleopatra Mandarin Requires Previous Abscisic Acid Accumulation in Roots', *Plant Physiology*, 112(1), pp. 401–408. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.401>.
- Gong, Z., Xiong, L., Shi, H., Yang, S., Herrera-Estrella, L. R., Xu, G. and Zhu, J. K. 2020. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, 63(5), 635-674.
- Gori, A. *et al.* (2020) 'Seasonal and Diurnal Variation in Leaf Phenolics of Three Medicinal Mediterranean Wild Species: What Is the Best Harvesting Moment to Obtain the Richest and the Most Antioxidant Extracts?', *Molecules*, 25(4), p. 956. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25040956>.
- Gould, K.S., McKelvie, J. and Markham, K.R. (2002) 'Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury', *Plant, Cell & Environment*, 25(10), pp. 1261–1269. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00905.x>.
- Grossiord, C. *et al.* (2020) 'Plant responses to rising vapor pressure deficit', *New Phytologist*, 226(6), pp. 1550–1566. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.16485>.
- Guitton, B., Kelner, J. J., Velasco, R., Gardiner, S. E., Chagne, D., and Costes, E. 2012. Genetic control of biennial bearing in apple. *J. Exp. Bot.* 63, 131–149. doi: 10.1093/jxb/err261.
- Guo, S. *et al.* (2007) 'Effect of Ammonium and Nitrate Nutrition On Some Physiological Processes in Higher Plants - Growth, Photosynthesis, Photorespiration, and Water Relations', *Plant Biology*, 9(1), pp. 21–29. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-2006-924541>.
- Hoch, W.A., Zeldin, E.L. and McCown, B.H. (2001) 'Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence', *Tree Physiology*, 21(1), pp. 1–8. Available at: <https://doi.org/10.1093/treephys/21.1.1>.
- Hochberg, U. *et al.* (2013) 'Near isohydric grapevine cultivar displays higher photosynthetic efficiency and photorespiration rates under drought stress as compared with near anisohydric grapevine cultivar', *Physiologia Plantarum*, 147(4), pp. 443–452. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01671.x>.
- Hueso, A., Camacho, G. and Gómez-del-Campo, M. (2021) 'Spring deficit irrigation promotes significant reduction on vegetative growth, flowering, fruit growth and production in hedgerow olive orchards (cv. Arbequina)', *Agricultural Water Management*, 248, p. 106695. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106695>.
- Iglesias, D.J. *et al.* (2002) 'Regulation of photosynthesis through source: sink imbalance in citrus is mediated by carbohydrate content in leaves', *Physiologia Plantarum*, 116(4), pp. 563–572. Available at: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1160416.x>.
- Incesu, M. *et al.* (2013) 'Rootstock effects on yield, fruit quality, rind and juice color of "Moro" blood orange',

Journal of Food, Agriculture and Environment, 11, pp. 867–871.

ISTAT, 2020. Coltivazioni Legnose Fruttifere /<http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=33705>.

Jensen ME (1968) Water consumption by agricultural plants. In: Kozlowski T (ed) *Water deficits and plants growth*, vol 2(M). Academic Press, New York, pp 1–22

Jifon, J.L. and Syvertsen, J.P. (2003) ‘Moderate shade can increase net gas exchange and reduce photoinhibition in citrus leaves†’, *Tree Physiology*, 23(2), pp. 119–127. Available at: <https://doi.org/10.1093/treephys/23.2.119>.

Jonckheere, I. *et al.* (2004) ‘Review of methods for in situ leaf area index determination: Part I. Theories, sensors and hemispherical photography’, *Agricultural and Forest Meteorology*, 121(1), pp. 19–35. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2003.08.027>.

Jones, C.G. and Hartley, S.E. (1999) ‘A Protein Competition Model of Phenolic Allocation’, *Oikos*, 86(1), pp. 27–44. Available at: <https://doi.org/10.2307/3546567>.

Jones, H.G. (1985) ‘Physiological Mechanisms Involved In The Control Of Leaf Water Status: Implications For The Estimation Of Tree Water Status’, *Acta Horticulturae*, (171), pp. 291–296. Available at: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.171.27>.

Jones, H.G. (1990) ‘Plant Water Relations And Implications For Irrigation Scheduling’, *Acta Horticulturae*, (278), pp. 67–76. Available at: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1990.278.4>.

Kameli, A. and Lösel, D.M. (1995) ‘Contribution of Carbohydrates and other Solutes to Osmotic Adjustment in Wheat Leaves Under Water Stress’, *Journal of Plant Physiology*, 145(3), pp. 363–366. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81903-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81903-6).

Kaufmann, M.R. (1981) ‘Development of Water Stress in Plants1’, *HortScience*, 16(1), pp. 34–36. Available at: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.16.1.34>.

Kazan, K., and Lyons, R. 2016. The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 67(1), 47-60.

Khan, M. R. G., Ai, X. Y., and Zhang, J. Z. 2014. Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(3), 347-359.

Khan, Z., and Shahwar, D. 2020. Role of heat shock proteins (HSPs) and heat stress tolerance in crop plants. In *Sustainable agriculture in the era of climate change* (pp. 211-234). Springer, Cham.

Kucharik, C.J., Norman, J.M. and Gower, S.T. (1998) ‘Measurements of branch area and adjusting leaf area index indirect measurements’, *Agricultural and Forest Meteorology*, 91(1), pp. 69–88. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(98\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(98)00064-1).

Lattanzio, V., Lattanzino, V.M.T. and Cardinali, A. (2006) ‘Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects’, 661, pp. 23–67.

Lei, Y., Yin, C. and Li, C. (2006) ‘Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*’, *Physiologia Plantarum*, 127(2), pp. 182–191. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00638.x>.

Leppä, K. *et al.* (2020) ‘Vegetation controls of water and energy balance of a drained peatland forest: Responses to alternative harvesting practices’, *Agricultural and Forest Meteorology*, 295, p. 108198. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108198>.

Li, X. *et al.* (2017) ‘Effect of cutting styles on quality and antioxidant activity in fresh-cut pitaya fruit’, *Postharvest Biology and Technology*, 124, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.09.009>.

Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., and Yu, H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Developmental cell*, 15(1), 110-120.

- Li, Q., Qi, J., Qin, X., Dou, W., Lei, T., Hu, A., and He, Y. (2020). CitGVD: a comprehensive database of citrus genomic variations. *Horticulture research*, 7(1), 1-8.
- Li, Z.-M., Zhang, J.-Z., Mei, L., Deng, X.-X., Hu, C.-G. and Yao, J.-L. 2010. PtSVP, an SVP homolog from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), shows seasonal periodicity of meristem determination and affects flower development in transgenic Arabidopsis and tobacco plants *Plant Mol. Biol.* 74 129 142.
- Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C. (2001) 'Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy', *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), p. F4.3.1-F4.3.8. Available at: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>.
- Lim, K. *et al.* (2003) 'LiDAR remote sensing of forest structure', *Progress in Physical Geography*, 27(1), pp. 88–106. Available at: <https://doi.org/10.1191/0309133303pp360ra>.
- Ma, D. *et al.* (2014) 'Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress', *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, pp. 60–66. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.024>.
- Medrano, H. *et al.* (2002) 'Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter', *Annals of Botany*, 89(7), pp. 895–905. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf079>.
- Meinzer, F.C. *et al.* (2017) 'Stomatal kinetics and photosynthetic gas exchange along a continuum of isohydric to anisohydric regulation of plant water status', *Plant, Cell & Environment*, 40(8), pp. 1618–1628. Available at: <https://doi.org/10.1111/pce.12970>.
- Meyer, S. *et al.* (2006) 'Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon–nitrogen balance within leaves?', *Plant, Cell & Environment*, 29(7), pp. 1338–1348. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01514.x>.
- Michaels, S. D., and Amasino, R. M. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell*, 11(5), 949-956.
- Miran, W., Nawaz, M., Jang, J. and Lee, D.S., 2016. Sustainable electricity generation by biodegradation of low-cost lemon peel biomass in a dual chamber microbial fuel cell. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 106, 75–79. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.009>.
- Moles, A.T. *et al.* (2009) 'Global patterns in plant height', *Journal of Ecology*, 97(5), pp. 923–932. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01526.x>.
- Monsi, M., Saeki, T. and Schortemeyer, M. (2005) 'On the factor light in plant communities and its importance for matter production', *Annals of Botany*, 95(3), pp. 549–567. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mci052>.
- Morgan, J.M. (1984) 'Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants', *Annual Review of Plant Biology*, 35(Volume 35, 1984), pp. 299–319. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001503>.
- Morita, Y. *et al.* (2014) 'A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation', *The Plant Journal*, 78(2), pp. 294–304. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.12469>.
- Moya, J.L. *et al.* (2003) 'Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use', *Journal of Experimental Botany*, 54(383), pp. 825–833. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erg064>.
- Naikoo, M.I. *et al.* (2019) 'Chapter 9 - Role and Regulation of Plants Phenolics in Abiotic Stress Tolerance: An Overview', in M.I.R. Khan *et al.* (eds) *Plant Signaling Molecules*. Woodhead Publishing, pp. 157–168. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>.
- Naor, A. (2000) 'midday stem water potential as a plant water stress indicator for irrigation scheduling in fruit trees', *Acta Horticulturae*, (537), pp. 447–454. Available at: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.537.52>.
- Nilson, T. (1971) 'A theoretical analysis of the frequency of gaps in plant stands', *Agricultural Meteorology*,

8, pp. 25–38. Available at: [https://doi.org/10.1016/0002-1571\(71\)90092-6](https://doi.org/10.1016/0002-1571(71)90092-6).

Noguera-Artiaga, L. *et al.* (2020) ‘Influence of regulated deficit irrigation and rootstock on the functional, nutritional and sensory quality of pistachio nuts’, *Scientia Horticulturae*, 261, p. 108994. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108994>.

Norman, J.M. and Campbell, G.S. (1989) ‘Canopy structure’, in R.W. Pearcy *et al.* (eds) *Plant Physiological Ecology: Field methods and instrumentation*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 301–325. Available at: https://doi.org/10.1007/978-94-009-2221-1_14.

Nunes, M.A., Catarino, F. and Pinto, E. (1989) ‘Strategies for acclimation to seasonal drought in *Ceratonia siliqua* leaves’, *Physiologia Plantarum*, 77(1), pp. 150–156. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb05991.x>.

Omasa, K., Hosoi, F. and Konishi, A. (2007) ‘3D lidar imaging for detecting and understanding plant responses and canopy structure’, *Journal of Experimental Botany*, 58(4), pp. 881–898. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl142>.

Ortuno, M.F. *et al.* (2006) ‘Stem and leaf water potentials, gas exchange, sap flow, and trunk diameter fluctuations for detecting water stress in lemon trees’, *Trees*, 20(1), pp. 1–8.

Oshio, H. *et al.* (2015) ‘Estimation of the leaf area density distribution of individual trees using high-resolution and multi-return airborne LiDAR data’, *Remote Sensing of Environment*, 166, pp. 116–125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2015.05.001>.

Pantin, F. *et al.* (2013) ‘The dual effect of abscisic acid on stomata’, *New Phytologist*, 197(1), pp. 65–72. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.12013>.

Patakas, A. and Noitsakis, B. (1997) ‘Cell Wall Elasticity as a Mechanism to Maintain Favorable Water Relations During Leaf Ontogeny in Grapevines’, *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), pp. 352–356. Available at: <https://doi.org/10.5344/ajev.1997.48.3.352>.

Peer, W.A. and Murphy, A.S. (2007) ‘Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators?’, *Trends in Plant Science*, 12(12), pp. 556–563. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.10.003>.

Pérez-Pérez, J.G. *et al.* (2008) ‘Response of sweet orange cv “Lane late” to deficit-irrigation strategy in two rootstocks. II: Flowering, fruit growth, yield and fruit quality’, *Irrigation Science*, 26(6), pp. 519–529. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00271-008-0113-4>.

Pou, A. *et al.* (2012) ‘Anisohydric behaviour in grapevines results in better performance under moderate water stress and recovery than isohydric behaviour’, *Plant and Soil*, 359(1), pp. 335–349. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1206-7>.

Proulx, R. (2021) ‘On the general relationship between plant height and aboveground biomass of vegetation stands in contrasted ecosystems’, *PLOS ONE*, 16(5), p. e0252080. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252080>.

Putarjunan, A., and Rodermel, S. 2014. Gigantea suppresses immutans variegation by interactions with cytokinin and gibberellin signaling pathways. *Plant physiology*, 166(4), 2115–2132.

Rao, M.J. *et al.* (2019) ‘Ectopic expression of citrus UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE gene enhances anthocyanin and proanthocyanidins contents and confers high light tolerance in *Arabidopsis*’, *BMC Plant Biology*, 19(1), p. 603. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2212-1>.

Rao, M.J. *et al.* (2021) ‘Antioxidant Metabolites in Primitive, Wild, and Cultivated Citrus and Their Role in Stress Tolerance’, *Molecules*, 26(19), p. 5801. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26195801>.

Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M. (2004) ‘Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants’, *Journal of Plant Physiology*, 161(11), pp. 1189–1202. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>.

Risso, A. and Poiteau, A. (1818) *Histoire naturelle des oranges*. Herissant Le Doux.

- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C., and Conti, L. 2013. GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *Plant physiology*, 162(3), 1706-1719.
- Riboni, M., Robustelli Test, A., Galbiati, M., Tonelli, C., and Conti, L. 2016. ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6309-6322.
- Romero, P. *et al.* (2006) 'Deficit irrigation and rootstock: their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of *Clemenules mandarin*', *Tree Physiology*, 26(12), pp. 1537–1548. Available at: <https://doi.org/10.1093/treephys/26.12.1537>.
- Santesteban, L.G., Miranda, C. and Royo, J.B. (2011) 'Regulated deficit irrigation effects on growth, yield, grape quality and individual anthocyanin composition in *Vitis vinifera* L. cv. "Tempranillo"', *Agricultural Water Management*, 98(7), pp. 1171–1179. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2011.02.011>.
- Scalisi, A., O'Connell, M. G., Stefanelli, D., and Lo Bianco, R. (2019). Fruit and leaf sensing for continuous detection of nectarine water status. *Frontiers in Plant Science*, 10, 805.
- Schaible, G. and Aillery, M. (2012) 'Water Conservation in Irrigated Agriculture: Trends and Challenges in the Face of Emerging Demands'. Rochester, NY. Available at: <https://doi.org/10.2139/ssrn.2186555>.
- Shanker, A. K., Maheswari, M., Yadav, S. K., Desai, S., Bhanu, D., Attal, N. B., and Venkateswarlu, B. 2014. Drought stress responses in crops. *Functional & integrative genomics*, 14(1), 11-22.
- Scholander, P.F. *et al.* (1964) 'Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants*', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52(1), pp. 119–125. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.52.1.119>.
- Schuler, T.M. and Smith, F.W. (1988) 'Effect of species mix on size/density and leaf-area relations in Southwest pinyon/juniper woodlands', *Forest Ecology and Management*, 25(3), pp. 211–220. Available at: [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(88\)90088-6](https://doi.org/10.1016/0378-1127(88)90088-6).
- Schultz, H. (2000) 'Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), pp. 2–12. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00156.x>.
- Shahrokhnia, M.A. *et al.* (2022) 'Determination of Applied Water and water productivity of lemon orchards in Iran', *Irrigation and Drainage Structures Engineering Research*, 23(87), pp. 1–20. Available at: <https://doi.org/10.22092/idser.2022.358902.1512>.
- Sharma, S. and Rao, T.R. (2015) 'Xanthan gum based edible coating enriched with cinnamic acid prevents browning and extends the shelf-life of fresh-cut pears', *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), pp. 791–800.
- Sinclair, W.B. (1984) *The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruits*. Available at: <https://agris.fao.org/search/en/providers/122621/records/6477619ff2e6fe92b3679d77> (Accessed: 11 April 2024).
- Southwick, S.M. and Davenport, T.L. (1986) 'Characterization of Water Stress and Low Temperature Effects on Flower Induction in Citrus 1', *Plant Physiology*, 81(1), pp. 26–29. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.81.1.26>.
- Stewart, J. I., Hagan, R. M., Pruitt, W. O., Danielson, R. E., Franklin, W. T., Hanks, R. J., ... & Jackson, E. B. (1977). Optimizing crop production through control of water and salinity levels in the soil.
- Syvertsen, J. and Levy, Y. (2005) 'Salinity interactions with other abiotic and biotic stresses in citrus', *HortTechnology*, 15(1), pp. 100–103.
- Syvertsen, J.P. and Smith, M.L. (1983) 'Environmental Stress and Seasonal Changes in Proline Concentration of Citrus Tree Tissues and Juice'. Available at: <https://doi.org/10.21273/JASHS.108.5.861>.

- Tamaskani Esfehankalateh, A., Ngarambe, J. and Yun, G.Y. (2021) 'Influence of Tree Canopy Coverage and Leaf Area Density on Urban Heat Island Mitigation', *Sustainability*, 13(13), p. 7496. Available at: <https://doi.org/10.3390/su13137496>.
- Tardieu, F. and Simonneau, T. (1998) 'Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours', *Journal of Experimental Botany*, 49, pp. 419–432.
- Tardieu, F., Simonneau, T. and Muller, B. (2018) 'The Physiological Basis of Drought Tolerance in Crop Plants: A Scenario-Dependent Probabilistic Approach', *Annual Review of Plant Biology*, 69(Volume 69, 2018), pp. 733–759. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040218>.
- Torreillas, A. *et al.* (1999) 'Gas exchange and water relations of young apricot plants under drought conditions', *The Journal of Agricultural Science*, 132(4), pp. 445–452. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0021859699006577>.
- Torrise, M. (1952). Indagini fisiologiche sugli agrumi. I. La differenziazione delle gemme a fiore del limone e dati preliminari sulla forzatura. «*Ann. Sper. Agr.*» ns, 4.
- Tremblay, N., Wang, Z. and Cerovic, Z.G. (2012) 'Sensing crop nitrogen status with fluorescence indicators. A review', *Agronomy for Sustainable Development*, 32(2), pp. 451–464. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0041-1>.
- Treutter, D. (2006) 'Significance of flavonoids in plant resistance: a review', *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), pp. 147–157. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>.
- Vellidis, G. *et al.* (2016) 'A Dynamic Variable Rate Irrigation Control System'.
- Volkamer, J.C. (1708) *Nürnbergische Hesperides, Oder Gründliche Beschreibung Der Edlen Citronat, Citronen, und Pomerantzen-Früchte: Wie solche, in selbiger und benachbarten Gegend, recht mögen eingesetzt, gewartet, erhalten und fortgebracht werden. Samt einer ausführlichen Erzählung der meisten Sorten, welche theils zu Nürnberg würcklich gewachsen, theils von verschiedenen fremden Orten dahin gebracht worden. Auff das accurateste in Kupffer gestochen... Beneben der Flora...* Endter. Available at: <https://books.google.com/books?hl=it&lr=&id=PeFkAAAACAAJ&oi=fnd&pg=IA1&dq=Volkamer,+J.C.,+1708.+N%C3%BCrnbergische+Hesperides,+oder+gr%C3%BCndliche+Beschreibung+der+Edlen+Citronat,+Citronen,+und+Pomerantzen-Fr%C3%BCchte.+2.+Sohn+and+Erben+editors,+Nuremberg,+pp.+1708%E2%80%931714.+Bei+Johan+Andrea+Endters+feel.&ots=T0dNjffJQG&sig=EzTYtT3--ECAbyDsOEd0hlwuu4Q> (Accessed: 2 October 2024).
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A. and Schmid, M. 2013. Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120), 704-707.
- Wang, M. *et al.* (2014) 'Chapter One - New Insight into the Strategy for Nitrogen Metabolism in Plant Cells', in K.W. Jeon (ed.) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 1–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00001-3>.
- Wei, S. *et al.* (2020) 'An assessment study of three indirect methods for estimating leaf area density and leaf area index of individual trees', *Agricultural and Forest Meteorology*, 292–293, p. 108101. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2020.108101>.
- Wilson, J.W. (1960) 'Inclined Point Quadrats', *New Phytologist*, 59(1), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1960.tb06195.x>.
- www.ismeamercati.it, I.M.- (no date) *Ortofrutta - Agrumi - Prezzi - Prezzi medi - Settimanali per varietà*, www.ismeamercati.it. Available at: <https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/591> (Accessed: 6 November 2024).
- Xu, Z., Zhou, G. and Shimizu, H. (2010) 'Plant responses to drought and rewatering', *Plant Signaling & Behavior*, 5(6), pp. 649–654. Available at: <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11398>.
- Yang, L. *et al.* (2018) 'Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors', *Molecules*, 23(4),

p. 762. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>.

Yang, Y.-J. *et al.* (2021) 'Evolution of stomatal closure to optimize water-use efficiency in response to dehydration in ferns and seed plants', *New Phytologist*, 230(5), pp. 2001–2010. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.17278>.

Yin, X. *et al.* (2011) 'In-Season Prediction of Corn Yield Using Plant Height under Major Production Systems', *Agronomy Journal*, 103(3), pp. 923–929. Available at: <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0450>.

Zandalinas, S.I. *et al.* (2017) 'Modulation of Antioxidant Defense System Is Associated with Combined Drought and Heat Stress Tolerance in Citrus', *Frontiers in Plant Science*, 8, p. 953. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00953>.

Zhang, J. and Davies, W.J. (1990) 'Does ABA in the Xylem Control the Rate of Leaf Growth in Soil-Dried Maize and Sunflower Plants?', *Journal of Experimental Botany*, 41(9), pp. 1125–1132. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/41.9.1125>.

Zhang, Y. *et al.* (2018) 'Effects of drought stress and rehydration on physiological parameters and proline metabolism in kiwifruit seedling.', *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(12), pp. 2891–2896.

Zheng, G. and Moskal, L.M. (2012) 'Spatial variability of terrestrial laser scanning based leaf area index', *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 19, pp. 226–237. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jag.2012.05.002>.

Ziogas, V. *et al.* (2023) 'Effect of Rootstock Selection on Tree Growth, Yield, and Fruit Quality of Lemon Varieties Cultivated in Greece', *Agronomy*, 13(9), p. 2265. Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy13092265>.

POSTER E ALTRI CONTRIBUTI IN VOLUME

1. **Guccione E.**, Inglese P., Sortino G. (2025). *Impatto della forzatura e del deficit idrico controllato sulla biometria di piante di Citrus limon (L. Burm.) cv. Femminello Zagara Bianca, XV GIORNATE SCIENTIFICHE SOI, 25-27 GIUGNO 2025 – PISA. Firenze: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI).*
2. **Guccione E.**, Allegra A., Inglese, P., Gallotta A., Todaro A., Sortino, G., (2023). *Impiego di trattamenti antiossidanti per prolungare la shelf-life di fette di mela (Malus domestica L.) della cv. Story coltivate in biologico. XIV GIORNATE SCIENTIFICHE SOI, 21-23 GIUGNO 2023 - TORINO. Firenze: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI).*
3. Allegra A., **Guccione E.**, Farina V., Sortino S., Inglese P. (2022) *Studi preliminari sull'effetto della manna come composto antiossidante su limoni di IV gamma. VIII CONVEGNO NAZIONALE GDL SOI POSTRACCOLTA, 29-30 SETTEMBRE 2022 PESCIA (PT). Firenze: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI).*
4. Sortino G., **Guccione E.**, Allegra A., Farina V., Inglese P. (2021). *Valutazione dei cambiamenti qualitativi di frutti di pero trattati con edibile coating in post-raccolta. XIII GIORNATE SCIENTIFICHE SOI, 22-23 GIUGNO 2021 – CATANIA. Firenze: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI).*

PUBBLICAZIONI

1. Sortino, G., Inglese, P., **Guccione, E.**, Allegra, A. (2022). *Use of chemical treatments to reduce browning color of white fresh-cut peaches, harvested in summer and late crop. ACTA HORTICULTURAE, 1352, 619-625 [10.17660/ActaHortic.2022.1352.83]. Articolo in rivista*
2. Sortino, G., Inglese, P., Farina, V., Gullo, G., **Guccione, E.**, Allegra, A. (2022). *Effect of mucilage edible coating on fresh-cut nectarine cultivar 'Big Bang'. ACTA HORTICULTURAE, 1352, 253-262 [10.17660/ActaHortic.2022.1352.34]. Articolo in rivista*
3. Allegra, A., Inglese, P., **Guccione, E.**, Farina, V., Sortino, G. (2022). *Calcium Ascorbate Coating Improves Postharvest Quality and Storability of Fresh-Cut Slices of Coscia and Abate Fétel Pears (Pyrus communis L.). HORTICULTURAE, 8(3), 227 [10.3390/horticulturae8030227]. Articolo in rivista*
4. **Guccione E.**, Allegra A., Farina V., Inglese I., Sortino S. (2023). *Use of xanthan gum and calcium ascorbate to prolong pear slices cv Butirra shelf life during storage. ADVANCES IN HORTICULTURAL SCIENCE 37(1) , 59-66. Articolo in rivista*
5. Allegra A., Sortino G., Inglese P., Farina V., Gullo G., **Guccione E.** (2023) *Color and sensory changes in fresh cut pear during storage comparing two cvs 'Coscia' and 'Butirra', cultivated in South Italy. ACTA HORTICULTURAE, 1364, 403-408 [10.17660/ActaHortic.2023.1364.51]. Articolo in rivista*
6. Allegra A., Inglese P., Farina V., **Guccione E.**, Sortino G., (2023) *Effects of xanthan gum and calcium ascorbate treatments on colour and nutritional quality of fresh cut*

pear fruit. *ACTA HORTICULTURAE* 1364, 351-358
[10.17660/ActaHortic.2023.1364.45]. **Articolo in rivista**

7. **Guccione E.**, Allegra A., Sortino G., (2023) *Pere di IV gamma: la qualità dipende anche dal film edibile*. In *L'INFORMATORE AGRARIO* vol. 32 - Edizioni L'Informatore Agrario **Articolo in rivista**
8. Allegra, A., **Guccione, E.**, Gimenez, M. J., Alessandra, G., Gugino, I. M., and Sortino, G. (2024). Extending shelf-life of fresh-cut apples using manna from ash tree (*Fraxinus angustifolia*) as natural antioxidant agent in comparison with calcium ascorbate. *Postharvest Biology and Technology*, 214, 112986. **Articolo in rivista**
9. Sortino, G., **Guccione, E.**, De Chiara, M. L. V., Passafiume, R., Gallotta, A., and Allegra, A. (2024). Application of *Opuntia ficus-indica* mucilage and aloe gel-based edible coating to enhance postharvest quality and microbiological aspects of fresh figs (*Ficus carica* L.). *Horticulturae*, 10(5), 482. **Articolo in rivista**
10. **Guccione, E.**, Allegra, A., Inglese, P., Zapata, P. J., Giménez, M. J. and Sortino, G. (2024, May). The influence of water stress and two rootstocks on cv Femminello Zagara Bianca lemon (*Citrus limon* L.) fruit quality. In *European Horticulture Congress, 12-16 May 2024. S10. Postharvest and horticultural products quality* (pp. 14-14). <https://ehc.usamv.ro/wp-content/uploads/2024/05/S10-Book-of-Abstracts.pdf>. **Articolo in rivista**
11. **Guccione, E.**, Serna Escolano, V., Allegra, A., Sortino, G., Solivella-Poveda, A. M., Serrano, M., and Giménez, M. J. (2025). Involvement of ethylene production and polyamines in rind pitting of 'fino'lemon fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109851. **Articolo in rivista**

SEMINARI E CORSI SEGUITI

1. Corso di statistica di base per dottorandi (46 ore) tenuto dal Prof. Stefano Barone presso il Dipartimento SAAF nel bimestre febbraio-marzo del 2022;
2. Corso di Inglese tecnico per l'agricoltura (30 ore) tenuto dal Prof. Riccardo Lo Bianco presso il Dipartimento SAAF nel bimestre aprile-maggio del 2022;
3. Corso di inglese per dottorandi CLA tenuto da Mrs. Geraldine Ann Foster (20 ore)
4. Corso di statistica per dottorandi, secondo modulo: tenuto dal Prof. Stefano Barone presso il Dipartimento SAAF nel mese di novembre del 2022 (40 ore);
5. Spectroscopic and chromatographic analytical techniques in agricultural chemistry: HPLC & LC-MS, tenuto dal Prof. F. Saiano – Università degli Studi di Palermo (09/02/2022);
6. Spectroscopic and chromatographic analytical techniques in agricultural chemistry: HPLC & LC-MS, tenuto dal Prof. F. Saiano – Università degli Studi di Palermo (16/02/2022);
7. Spectroscopic and chromatographic analytical techniques in agricultural chemistry: GC-FID, GC-ECD, GC-TCD, GC-MS, tenuto dal Prof. F. Saiano – Università degli Studi di Palermo (24/02/22);
8. Tavola rotonda: Le imprese agroalimentari e dell'ortofrutta nel contesto della sfida epocale – Vittoria (RG) (11/05/2022)

9. ANOVA and experimental design, tenuto dal Prof. M. Acutis – Università degli Studi di Milano (07/06/2022);
10. Seminario sulla fisiologia vegetale tenuto dal Dr. G. Brar, - California State University (09/09/2022);
11. Frutticoltura tropicale mediterranea: ricerca, innovazione e trasferimento alle aziende - Università degli Studi di Palermo (06/12/2022)
12. Enofocus 2023 - Università degli Studi di Palermo (02/03/2023);
13. Giornata studio "innovazione per lo sviluppo sostenibile e valorizzazione del limone di Rocca Imperiale IGP - Università degli Studi di Palermo (03/03/2023)
14. "Le piante alofite come nuove colture orticole" - Università degli Studi di Palermo (08/03/2023)
15. I workshop VEISCA - Università degli Studi di Palermo (10/03/2023)
16. International Workshop on Citrus Genome - Università degli Studi di Palermo (28/03/2023)
17. Seminario "CITRUS Genome" - Acireale CREA Agrumicoltura (28/05/2023)
18. "Nuevas soluciones al problema del agua: agricultura de precision aplicada" – Universidad Miguel Hernandez de Orihuela (14/12/2023)

CONVEGNI

1. ISHS X international peach symposium – Naoussa, Grecia – 30, 31 maggio 2022 1, 2 giugno 2022
2. VIII convegno nazionale gruppo di lavoro SOI Postraccolta – Pescia (PT) 29-30 settembre 2022 -presentazione orale 30 settembre
3. XIV Giornate Scientifiche SOI – Università degli Studi di Torino, Campus Luigi Einaudi, Torino (TO) 20-23 giugno 2023 – Presentazione orale del 22/06/2023
4. X EHC Congress – ISHS – Bucarest, 12-16 maggio 2024

QUALIFICHE CONSEGUITE

1. Abilitazione all'attività di consulente prodotti fitosanitari – Acireale (CT) – 15/12/2022