

Il saccarosio e il sorbitolo regolano diversamente l'espressione genica ed epigenetica e il cambiamento di fase in espianti di pesco *in vitro*

Marco Cirilli^{1,2}, Emilia Caboni³, Simona Monticelli³, Adele Gentile³, Fabiano Gattabria¹, Calogero Iacona⁴, Maurizio Zecchini¹, Rosario Muleo^{1*}

¹ Università della Tuscia

² Università di Milano

³ Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), Roma

⁴ Università di Pisa

Sucrose and sorbitol differently affect gene expression and epigenetic regulation and changing phase in peach plantlets grown *in vitro*

Abstract. In plants, carbohydrates play a plethora of roles: as carbon substrates in energy metabolism and in polymer biosynthesis; as hormone-like function, since they are primary messengers in signal transduction, regulating processes of differentiation; as osmolytes because of their role in the regulation of osmotic and water potential of the cell. Sucrose is the most diffused sugar in plants, and sorbitol, a photosynthetic sugar alcohol, is the main translocated carbon source in many species of *Rosaceae*. In micropropagation, autotrophic ability of explant is reduced, and external carbon sources are required to promote growth. Although sucrose is the most widely-used carbohydrate in tissue cultures, sorbitol was shown to be more suitable for shoot multiplication and rooting of some *Rosaceae* family species. In plants, epigenetic changes occur in relation to many stress and ontogenetic development. In plant tissue culture, changes in DNA methylation and histone modifications have been detected in some species in *in vitro* culture condition. In the present work, the effect of carbon source, sorbitol versus sucrose, on the expression of genes regulating the DNA epigenetic status and chromatin remodelling was evaluated in peach (*Prunus persica* L.) micro shoot of cv. Rich Lady during the proliferation phase. The expression of some genes playing a pivotal role in phase change from juvenile to adult, has also been studied. Phenological parameters related to branching, rooting and health state of plantlets were also evaluated. Four treatments were set through the addition of both sucrose

and sorbitol to MS medium, modifying the carbohydrate source as following: 1st treatment, 15 g L⁻¹ sucrose + 5 g L⁻¹ sorbitol; 2nd treatment 10 g L⁻¹ sucrose + 10 g L⁻¹ sorbitol; 3rd treatment 5 g L⁻¹ sucrose + 15 g L⁻¹ sorbitol; 4th 20 g L⁻¹ sucrose, used as control. After the 4th subculture the multiplication rate, the length of shoot leader and the chlorophylls, carotenoids and total phenols content were evaluated. Rooting was induced after the 4th subculture onto IBA-enriched MS medium. Percentage of rooting and number of roots per explant were detected. Molecular data indicate a diverse role of sorbitol in gene regulation of *de novo* methylation events and chromatin remodelling, as shown by the increase of expression levels of genes under the treatment with higher amount of sorbitol. A change in the expression of genes related with the phase change was also detected, indicating that the plantlets move towards the adult phase. The multiplication rate was reduced in the plantlets exposed to the highest amount of sorbitol (15 g L⁻¹), and a similar trend was detected for the rooting development. At the highest amount of sorbitol in the medium the plantlets reduced their health status and 30% of them showed symptoms of hyperhydricity. Among treatments, no significant differences were found in chlorophylls, total phenols and carotenoids contents.

Key words: carbohydrates, genes of methylation, shoot proliferation.

Introduzione

I carboidrati svolgono una pletera di funzioni nelle piante, influenzando: la crescita, come substrati di carbonio del metabolismo energetico e della biosintesi di polimeri; la regolazione dello sviluppo, simil-

* muleo@unitus.it

mente all'azione svolta dagli ormoni, come messaggeri primari nella trasduzione del segnale alla base dei processi di differenziazione; la regolazione del potenziale osmotico e idrico cellulare, con funzione da osmoliti. Il saccarosio è il carboidrato più diffuso nelle piante e il sorbitolo, zucchero alcolico della via fotosintetica, è la fonte principale di carbonio trasportata in varie specie di *Rosaceae*.

In micropropagazione la capacità autotrofa di un espianto è ridotta e la crescita e lo sviluppo sono promossi da fonti esterne di carbonio (George, 1996). Anche se il saccarosio è il carboidrato più diffuso nella coltura di tessuti, il sorbitolo, in diversi esperimenti noti in letteratura, ha dimostrato di svolgere un ruolo positivo sulla moltiplicazione ascellare e sulla radicazione degli espianti in specie della famiglia delle *Rosaceae* (Ahmad *et al.*, 2007; Yaseen *et al.*, 2013).

Nella pianta i cambiamenti epigenetici si verificano in relazione agli stress e allo sviluppo ontogenico. Nella coltura *in vitro* dei tessuti vegetali, in alcune specie, sono stati rilevati cambiamenti nella metilazione del DNA e modificazioni degli istoni, che sembrerebbero indicare una reazione della pianta alle condizioni di coltura *in vitro* (Miguel e Marum, 2011; Neelakandan e Wang, 2012; Smulders e de Klerk, 2011).

Nel presente lavoro è stato valutato l'effetto della fonte di carbonio, sorbitolo e saccarosio, sull'espressione di geni regolanti lo stato epigenetico del DNA e il rimodellamento della cromatina, e sulla risposta morfo-fisiologica degli espianti nella fase di proliferazione in colture *in vitro* di germogli di *Prunus persica*, L., cv. Rich Lady. È stata, inoltre, analizzata l'espressione di geni con un ruolo *pivot* nella regolazione genica del cambiamento di fase da giovanile ad adulto. I dati molecolari, fisiologici e morfologici indicano un ruolo del sorbitolo nella regolazione genica, associati ad eventi di metilazione *de novo*, e nella proliferazione e qualità degli espianti.

Materiali e metodi

Materiale vegetale, condizioni colturali e trattamenti

Gli espianti sono stati clonati a partire da un'unica gemma ascellare, campionata in primavera da una pianta coltivata in condizioni di pieno campo presso il CREA-OFA. La coltura è stata effettuata in contenitori Magenta (Sigma, Italia) contenenti 50 ml di terreno di moltiplicazione (Gentile *et al.*, 2014) costituito da macro-elementi QL (Quoirin *et al.*, 1977), micro-elementi e vitamine MS (Murashige e Skoog, 1962) e 5,5 g L⁻¹ di agar (B & V, Italia). Il terreno è stato integrato da 58,5 mM di saccarosio (Eridania, Italia), 1,11

μM BA, 16,3 μM di adenina solfato, 0,29 μM IBA e 0,19 μM GA₃. Il pH è stato portato a 5,7. Le colture sono state mantenute in condizioni standard (CS) di 24±2°C, fotoperiodo di 16 ore con irradianza di 40 μM m⁻² s⁻¹, generata da tubi fluorescenti (Fluora L58 vv/77, Osram, Italy). I germogli sono stati subcoltivati ogni 21 giorni. I trattamenti hanno previsto le seguenti fonti di carbonio addizionate al substrato: **1.** Saccarosio (100%), 20 g L⁻¹; **2.** Saccarosio (75%) - Sorbitolo (25%), 15 g L⁻¹ - 5 g L⁻¹; **3.** Saccarosio (50%) - Sorbitolo (50%), 10 g L⁻¹ - 10 g L⁻¹; **4.** Saccarosio (25%) - Sorbitolo (75%), 5 g L⁻¹ - 15 g L⁻¹. Alla fine della 4^a subcoltura è stato rilevato il tasso di moltiplicazione, sono state effettuate le osservazioni morfologiche e le analisi fisiologiche e molecolari. Le analisi delle clorofille, dei carotenoidi e dei fenoli totali sono state effettuate come riportato da Gentile *et al.* (2014). Parte dei germogli è stata trasferita in un terreno di radicazione contenente sali e vitamine MS con macroelementi a concentrazione dimezzata, 58,5 mM di saccarosio (Eridania, Italia), 11,42 μM IAA e 5,5 g L⁻¹ di agar (B&V, Italia) e mantenuta in CS. Per la valutazione del tasso di moltiplicazione e di radicazione sono stati utilizzati 3 magenta contenenti 6 espianti ciascuno per ogni trattamento. Per le analisi fisiologiche sono stati utilizzati 3 germogli con 3 ripetizioni. Per l'analisi statistica è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA a una via e il Tukey's LSD test come *post hoc* (Statgraphics Software).

Analisi dell'espressione genica

L'RNA totale è stato estratto da tessuti di foglia e germoglio mediante reagente TRIzol (Invitrogen, Italia), purificato con RNeasy Plant Mini-Kit (Qiagen, Germania) e quantificato con il fluorometro QUBIT. Il cDNA è stato sintetizzato con il kit miScriptII (Qiagen, Germania). Sono stati studiati geni implicati nella regolazione epigenetica, *MET1*, *CMT3*, *DDMI*, *ROS1*, *EBS*, e geni implicati nel sistema di regolazione del cambiamento di fase giovanile-adulto. Le sequenze di nucleotidi dei geni sono state identificate in Peach Genome V2.0 (Verde *et al.*, 2013) tramite tBLASTX, utilizzando sequenze aminoacidiche di geni orologi caratterizzati in altre specie. I trascritti identificati sono stati impiegati per il disegno di primer specifici, effettuati con Primer3 (www.Primer3.com). L'analisi Real-Time PCR è stata condotta con il termociclatore LC480II® (Roche, Italia). Ogni reazione (20 μL) conteneva 10 μL di Light Cycler 480 SYBR Green I Master mix (Roche, Italia), 0,5 μM di ciascun primer, 1 μL di cDNA e 7 μL di acqua. La reazione PCR è stata effettuata alle seguenti condizioni: 95°C per 10 min; 45 cicli a 94°C

per 20 s, 58°C per 30 s e 72°C per 30 s, seguiti da un ciclo di fusione da 65°C. Per ogni campione sono state eseguite tre repliche biologiche, ciascuna con tre repliche tecniche. I dati sono stati espressi con il metodo $2\Delta\Delta C_p$ (Kubista *et al.* 2006) utilizzando il gene *ACTIN* come riferimento endogeno per la normalizzazione dell'analisi di espressione. I test ANOVA e Student-Newman-Keuls sono stati utilizzati per il confronto di più gruppi, considerando per $p < 0,05$ le medie come statisticamente significative.

Risultati

La presenza di 25% sorbitolo nel terreno di coltura, in sostituzione del saccarosio, ha ridotto l'espressione dei geni implicati nella regolazione epigenetica *MET1*, *CMT3*, *DDMI*, *ROSI*, *EBS*, talvolta anche drasticamente. L'aggiunta ulteriore di sorbitolo, fino alla quantità del 50% in sostituzione del saccarosio, ha indotto un aumento di espressione di *MET1*, ad un livello doppio di quello del controllo saccarosio 100% (fig. 1), e un aumento di espressione di *EBS* e di *DDMI*, anche se in maniera ridotta. L'espressione dei geni *CMT3* e *ROSI*, invece, è risultata inferiore a quella del controllo.

Alle quantità maggiori di sorbitolo, pari al 75% del totale dei carboidrati nel terreno, il contenuto dei trascritti di tutti i geni è risultato il più elevato tra i trattamenti, ad eccezione del quantitativo di trascritti del gene *MET1*, il quale è diminuito rispetto al trattamento con 50% sorbitolo, pur rimanendo però significati-

vamente maggiore rispetto al sorbitolo 25% (fig. 1).

Per quanto riguarda l'espressione dei geni implicati nel sistema di regolazione del cambiamento di fase giovanile-adulta, è l'espressione di *CONSTANS-like* è risultata inferiore negli espianti su terreni colturali in cui il saccarosio è stato sostituito con 25 e 50% sorbitolo, mentre la quantità di sorbitolo nel terreno, pari al 75% del totale dei due carboidrati, ha indotto un aumento significativo dell'espressione del gene *CONSTANS-like*, rispetto a tutti gli altri trattamenti. L'espressione del gene *SVP* nei tessuti degli espianti coltivati in 25% sorbitolo è risultata analoga o poco ridotta rispetto al controllo 100% saccarosio. L'espressione del gene *SVP* è stata fortemente indotta dall'aumento delle quantità di sorbitolo nel terreno, raggiungendo il quantitativo massimo negli espianti coltivati in 75% sorbitolo. Controversa è risultata l'espressione del gene *RAVI/TEM* negli espianti coltivati in sorbitolo 50%, risultata inferiore al controllo (saccarosio 100%). L'espressione risultata elevata con il 25% sorbitolo, raggiungendo il massimo dell'espressione con il 75%.

L'espressione del gene *FT* è risultata ridotta nei tessuti degli espianti coltivati su terreno di coltura con 25% sorbitolo, mentre è stata fortemente indotta da 75% sorbitolo (fig. 2).

Il trattamento con 5 g L⁻¹ di saccarosio e 15 g L⁻¹ di sorbitolo ha indotto una riduzione del tasso di proliferazione, mentre alle altre combinazioni di carboidrati non sono state riscontrate differenze statisticamente significative rispetto al controllo (saccarosio

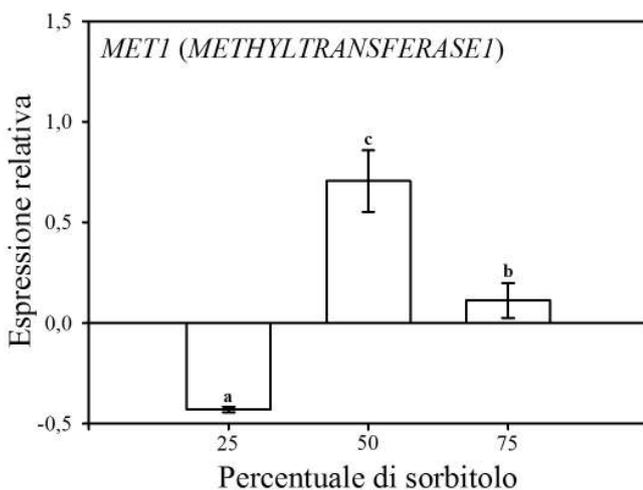


Fig. 1 - Analisi dell'espressione relativa del gene *MET1* (*DNA methyltransferase1*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio. Il livello di espressione è normalizzato con quello determinato nel trattamento saccarosio 100%.

Fig. 1 - Relative gene expression analysis of *MET1* gene (*DNA methyltransferase1*) as detected in each combination of sorbitol and sucrose; the level of transcripts is normalized to that of level detected in plantlets cultured onto medium containing 100% of sucrose.

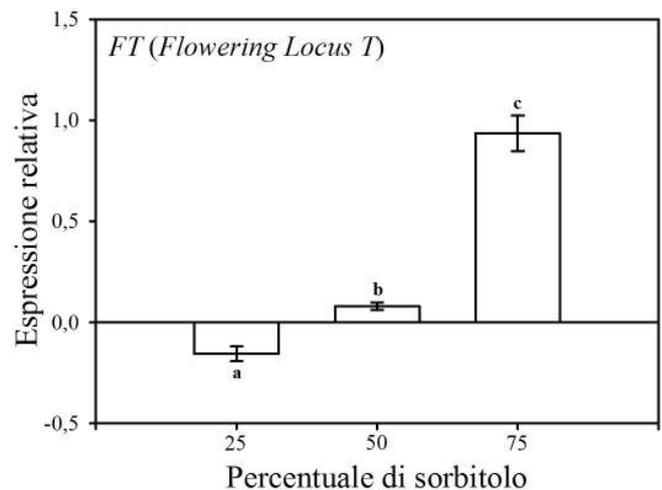


Fig. 2 - Analisi dell'espressione relativa del gene *FT* (*Flowering Locus T*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio. Il livello di espressione è normalizzato con quello determinato nel trattamento saccarosio 100%.

Fig. 2 - Relative gene expression analysis of *FT* (*Flowering Locus T*) gene as detected in each combination of sorbitol and sucrose; the level of transcripts is normalized to that of level detected in plantlets cultured onto medium containing 100% of sucrose.

100%) (tab. 1).

In presenza di sorbitolo nel terreno di coltura il tasso di radicazione è risultato significativamente ridotto alla concentrazione di 15 g L⁻¹ ed il numero di radici per espianto anche alla concentrazione di 10 g L⁻¹ (tab. 1).

Il sorbitolo nel terreno non ha modificato significativamente il contenuto di clorofilla, di fenoli totali e di carotenoidi nei tessuti degli espianti (tab. 1), mentre alla concentrazione di 15 g L⁻¹ (75%), è stato riscontrato un 30% di espianti vitrescenti (iper-idrici).

Discussione e conclusioni

L'azione positiva del sorbitolo sulla proliferazione dei germogli *in vitro* è stata già in precedenza osservata in albicocco, pero giapponese, GF677 (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) e in altre *Rosaceae* (Ahmad *et al.*, 2007; Kadota *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 1993; Yaseen *et al.*, 2013).

Alle nostre condizioni sperimentali, tuttavia, abbiamo rilevato che all'aumento della concentrazione di sorbitolo diminuiva la proliferazione negli espianti di pesco della cv. Rich Lady. Un effetto negativo è stato osservato anche sull'induzione di radicazione avventizia e sullo sviluppo del numero di radici per espianto radicato. Questi dati concordano con i risultati ottenuti da Harada e Murai (1996) in *Prunus mume*, suggerendo che all'interno della famiglia delle *Rosaceae* possa manifestarsi, in condizioni di coltura *in vitro*, una risposta al sorbitolo legata alla specie, ed in grado di stimolare risposte morfologiche e di regolazione trascrizionale differenti.

Nelle colture *in vitro*, le piante sono incubate e coltivate in condizioni artificiali. Tali condizioni possono causare variazioni epigenetiche sia durante gli eventi di rigenerazione avventizia sia durante lo sviluppo di germogli laterali a partire da gemme ascellari (Smulders e de Klerk, 2011). Negli espianti di pesco abbiamo osservato una diversa regolazione dell'espressione dei geni *ROS1* e *CMT3*, le cui proteine

sono implicate nella metilazione del DNA, e dei geni *DDMI* e *EBS*, le cui proteine sono coinvolte nel rimodellamento della cromatina, dal sorbitolo rispetto al saccarosio, suggerendo un effetto quantitativo degli zuccheri sull'espressione di questi geni. La diversa regolazione dei geni legati alla metilazione potrebbe aver inciso notevolmente sullo stato di metilazione di diverse regioni del DNA, tra cui quelle associate a geni del cambiamento di fase, inducendo così dei cambiamenti epigenetici. Infatti, i dati permettono di ipotizzare un ruolo del sorbitolo nella regolazione dei geni *CONSTANS-like*, *FT* e *SVP* diverso da quello del saccarosio, che incide sui processi fisiologici a cui questi geni sono associati: l'induzione fiorale e la dormienza. L'insieme dei dati morfologici raccolti in questo studio nella cv. Rich Lady di pesco appaiono coerenti con i dati molecolari, lasciando supporre che il sorbitolo possa attivare, in alcune specie, processi di invecchiamento nei tessuti, a loro volta, influenti anche sulla capacità rizogena, come recentemente osservato in *Pisum sativum* (Rasmussen *et al.*, 2015).

Riassunto

I carboidrati nelle piante svolgono una pletera di funzioni: nella crescita, nei sistemi di regolazione dello sviluppo e del potenziale osmotico e idrico della cellula. Il saccarosio è lo zucchero più diffuso e il sorbitolo è quello principalmente traslocato nelle *Rosaceae*. In microtalee di pesco, in fase di proliferazione *in vitro*, è stato valutato l'effetto del sorbitolo e del saccarosio sull'espressione di geni codificanti enzimi che regolano lo stato epigenetico del DNA e il rimodellamento della cromatina, e di geni codificanti proteine, coinvolte nel cambiamento di fase da giovanile ad adulto. Il sorbitolo ha regolato diversamente dal saccarosio l'espressione genica, la proliferazione, l'induzione radicale e la qualità degli espianti.

Parole chiave: carboidrati, geni della metilazione, proliferazione.

Tab. 1 - Tasso di proliferazione, radicazione e contenuto di clorofilla degli espianti coltivati alle diverse combinazioni di sorbitolo e saccarosio nel terreno.

Tab. 1 - Proliferation rate, rooting rate and number of roots per explant, and content of chlorophyll of micro shoots subcultured onto the medium containing diverse combinations of sorbitol and sucrose amounts.

Carboidrato g L ⁻¹		Fase di moltiplicazione		Fase di radicazione	
Saccarosio	Sorbitolo	Tasso di proliferazione	Clorofilla Totale mg g ⁻¹	Radicazione (%)	No. Radici x Espianto
15	5	4,4 a	0,47 a	35 a	2,7 a
10	10	4,5 a	0,44 a	47 a	1,6 b
5	15	3,7 b	0,39 a	10 b	1,0 b
20	0	4,5 a	0,40 a	55 a	2,8 a

Bibliografia

- AHMAD T., ABBASI N.A., AHMAD HAFIZ I., ALI A., 2007. *Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy source in morphogenesis of peach rootstock GF-677*. Pak. J. Bot., 39(4): 1264-1275.
- GENTILE A., JÁQUEZ GUTIÉRREZ M., MARTINEZ J., FRATTARELLI A., NOTA P., CABONI E., 2014. *Effect of meta-Topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in Prunus rootstocks*. Plant Cell, Tiss. Organ Cult., 118:373-381.
- GEORGE E.F., 1996. *Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology*. Exegetics Ltd, Edington, Wilts. BA13 4QG, England.
- HARADA H., MURAI Y., 1996. *Micropropagation of Prunus mume*. Plant Cell, Tiss. Organ Cult., 46(3): 265-267.
- KADOTA M., IMIZU K., HIRANO T., 2001. *Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear*. Sci. Hortic., 89(3): 207-215.
- KUBISTA M., ANDRADE J.M., BENGTTSSON M., FOROOTAN A., JONÁK J., LIND K., SINDELKA R., ET AL. 2006. *The real-time polymerase chain reaction*. Mol. Aspects Med., 27 (2-3): 95-125.
- MARINO G., BERTAZZA G., MAGNANINI E., ALTAN A.D., 1993. *Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot*. Plant Cell, Tiss. Organ Cult., 34(3): 235-244.
- MIGUEL C., MARUM L., 2011. *An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond*. J. Exp. Bot., 62(11): 713-725.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant., 15(3): 473-497
- NEELAKANDAN A.K., WANG K., 2012. *Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications*. Plant Cell Rep., 31(4): 597-620.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE P.H., BOXUS P.H., 1977. *Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication in vitro de fruitiers ligneux*. In: compte rendu des recherches. In: "Compte Rendu des Recherches". Station de cultures fruitières et maraichères, Gembloux, 93-117.
- RASMUSSEN A., HOSSEINI S.A., HAJIREZAEI M-R., DRUEGE U., GEELLEN D., 2015. *Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis*. J. Exp. Bot., 66(5):1437-1452
- SMULDERS M.J.M., DE KLERK G.J., 2011. *Epigenetics in plant tissue culture*. Plant Growth Regul., 63: 137-146.
- VERDE I., ABBOTT A.G., SCALABRIN S., JUNG S., SHU S., MARRONI F., ZHEBENTYAYEVA T., ET AL; *International Peach Genome Initiative, 2013. The high-quality draft genome of peach (Prunus persica) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution*. Nat. Genet., 45 (5): 487-494.
- YASEEN M., AHMAD T., SABLOK G., STANDARDI A., AHMAD HAFIZ I., 2013. *Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development*. Mol. Biol. Rep., 40: 2837-2849.