



¹Università degli studi
della Tuscia, Viterbo



²Consiglio per la
ricerca in agricoltura
e per l'analisi
dell'economia agraria,
Centro di ricerca
frutticoltura, Roma.



⁴Università di Pisa.



Saccarosio e sorbitolo regolano diversamente l'espressione genica ed epigenetica e lo sviluppo di espianti di pesco *in vitro*

Cirilli M¹, **Caboni E²**, **Monticelli S²**, **Gentile A²**,
Gattabria F¹, **Zecchini M¹**, **Iacona C³**, **Muleo R¹**



I carboidrati svolgono una pletora di funzioni, tra i più importanti:

*la crescita, essendo substrati di carbonio del metabolismo energetico e della biosintesi di polimeri;

*la regolazione simile agli ormoni, poiché sono messaggeri primari nella trasduzione del segnale, regolanti i processi di differenziazione;

*la regolazione osmotica e idrica della cellula, con funzioni da osmoliti.



Il saccarosio è lo zucchero più diffuso nelle piante.

Il sorbitolo, zucchero alcolico della via fotosintetica, è la fonte principale di carbonio traslocata in molte specie di Rosaceae.

In micropropagazione, la capacità autotrofa di un espianto è ridotta e la crescita e lo sviluppo sono promosse dalle fonti esterne di carbonio.



Il sorbitolo promuove la proliferazione e la radicazione in espianti di specie della famiglia delle Rosaceae (Marino et al 1993; Ahmad et al., 2007; Yaseen et al., 2013).

Nelle piante *in vitro* eventi epigenetici si verificano in relazione ai molti stress e allo sviluppo ontogenetico (Miguel e Marum, 2011). Nelle colture del tessuto vegetale sono state riscontrate modifiche nella metilazione del DNA e nelle modificazioni delle proteine istoniche specifiche di queste condizioni (Smulders e de Klerk e riferimenti in esso, Neelakandan e Wang, 2012).

Valutare se il sorbitolo regola, diversamente dal saccarosio, l'espressione di geni che codificano enzimi regolanti lo stato epigenetico del DNA (metilazione), il rimodellamento della cromatina e il cambiamento di fase, da giovanile ad adulto, nei cluster della cv Rich Lady di *Prunus persica* L., durante la proliferazione in coltura *in vitro*.



P. persica cultivar 'Rich Lady'

Materiali e metodi

Gli espianti sono stati clonati a partire da un'unica gemma ascellare, campionata in primavera da una pianta in campo (CREA)



La coltura è stata avvenuta in un vaso (Magenta, Sigma, Italia) contenente 50 ml di un mezzo di moltiplicazione (MM) costituito da sali macro-elementi QL, micro-elementi e vitamine MS, 87,7 mM di saccarosio (Eridania, Italia) e 5,5 g di L⁻¹ agar (B & V, Italia). MM è stato integrato da 1,11 μM BA, 16,3 μM di adenina solfato, 0,29 μM IBA e 0,19 μM GA₃. Il pH 5,7. Le colture sono state mantenute a 24±2°C ad un fotoperiodo di 16 ore e all'irradianza di 40 μM m⁻² s⁻¹, generata da tubi fluorescenti (Fluora L58 vv/77, Osram, Italy). Gli espianti erano subculturati ogni 21 giorni.



Mezzo colturale

Fonte di carbonio nei trattamenti

Saccarosio : 20 g L⁻¹

Saccarosio – **Sorbitolo** : 15 g L⁻¹ – 5 g L⁻¹

Saccarosio – **Sorbitolo** : 10 g L⁻¹ – 10 g L⁻¹

Saccarosio – **Sorbitolo** : 5 g L⁻¹ – 15 g L⁻¹

La prova è stata effettuata alla **quarta subcoltura** dall'adattamento al in vitro.

La sequenza di ciascun gene target è stato identificato con analisi BLAST nel sito Peach Genome v1.0 (40) assembly (http://www.rosaceae.org/species/prunus_persica/genome_v1.0), disponibile nel database GDR.

I primer di ciascun gene sono stati disegnati con Primer3 software (www.Primer3.com).

L'RNA totale è stato estratto da tessuti di foglia con il protocollo di Reid et al (2006). La trascrizione inversa è stata effettuata con il Kit SuperscritII (Invitrogen).

I pattern di espressione sono stati analizzati con Rea-Time qPC LC480II (Roche) con la chimica di SYBRGreen. La quantificazione relativa è stata effettuata con il metodo ΔC_p (Kubista et al 2006).



Risultati

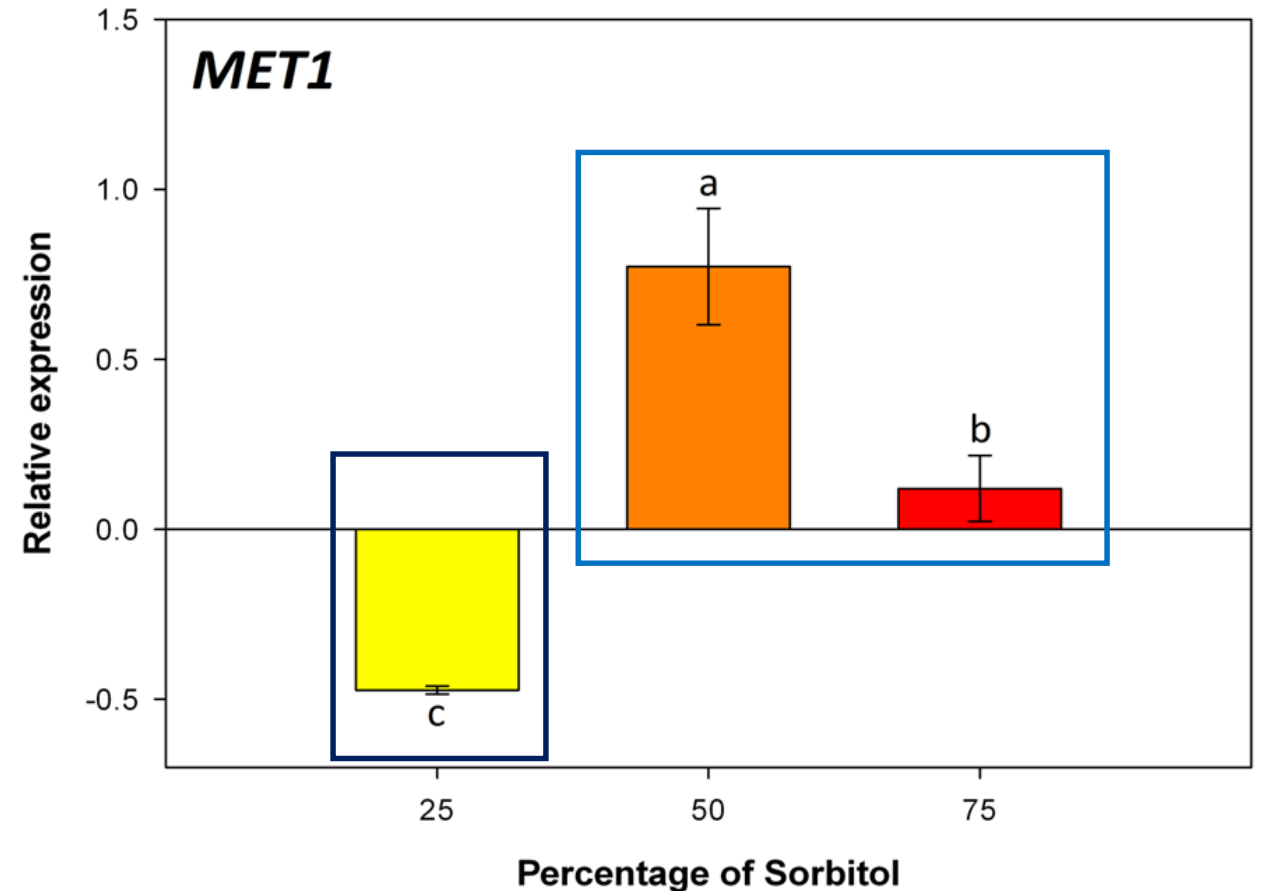
L'espressione del gene *MET1* (*DNA METHYLTRANSFERASE1*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata a quella determinata nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione di *MET1* è ridotta a meno della metà nel trattamento in cui il sorbitolo era presente al 25%, in sostituzione del saccarosio.

L'incremento del sorbitolo nel mezzo fino al 50% del totale induce un aumento di espressione del gene *MET1* ad un valore doppio di quello del controllo saccarosio 100%. L'aumento della espressione permane in presenza del 75% di Sorbitolo, anche se si riduce drasticamente

Espressione dei geni implicati nella metilazione

La proteina *MET1* mantiene lo stato di metilazione del DNA nel sito simmetrico CpG



Risultati

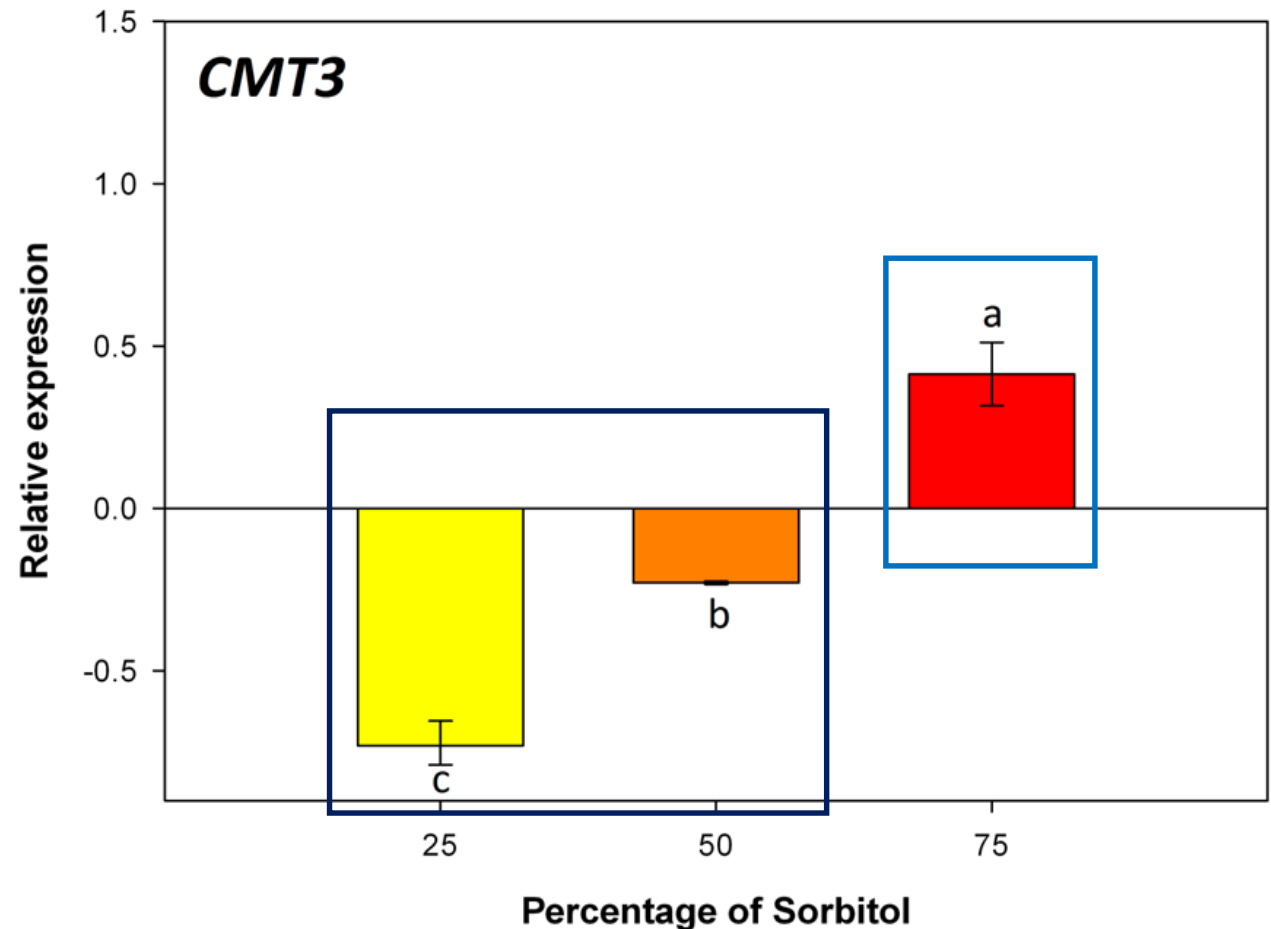
L'espressione del gene *CMT3* (*CHROMOMETHYLASE 3*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata a quella determinata nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione di *CMT3* è ridotta fortemente nel trattamento in cui il sorbitolo era presente al 25%, in sostituzione del saccarosio. La riduzione dell'espressione è presente anche negli espianti posti al trattamento 50% di sorbitolo.

L'incremento del sorbitolo nel mezzo fino al 75% induce un aumento di espressione del gene *DDM1* ad un valore significativo rispetto al controllo saccarosio 100%.

Espressione dei geni implicati nella metilazione

La proteina *CMT3* mantiene la metilazione nei siti asimmetrici CpHpG e CpHpH.



Risultati

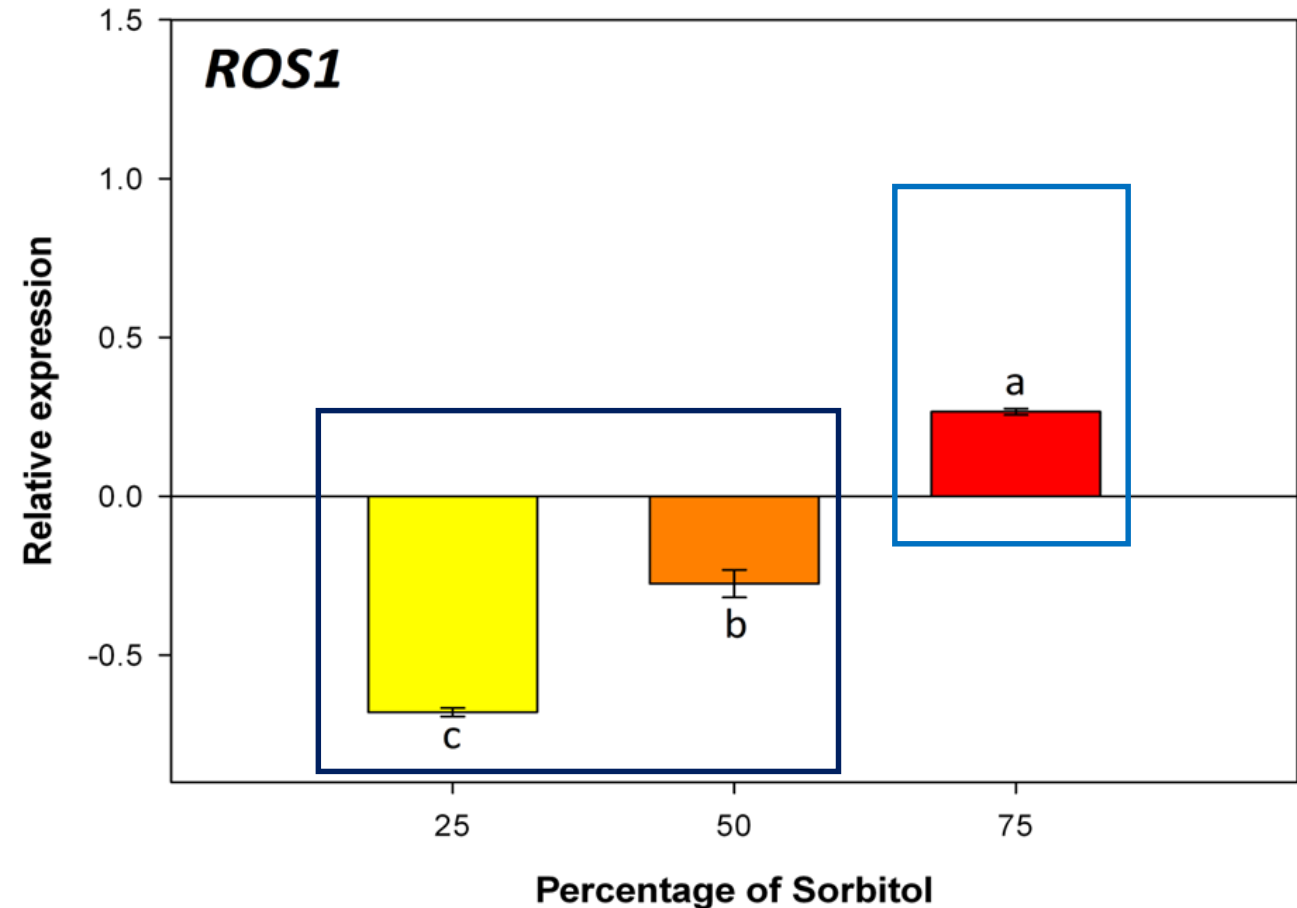
L'espressione del gene *ROS1* (*REPRESSOR OF SILENCING 1*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata a quella determinata nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione di *ROS1* è ridotta a meno della metà nel trattamento in cui il sorbitolo era presente al 25%, in sostituzione del saccarosio. La riduzione dell'espressione è presente anche negli espianti posti al trattamento 50% di saccarosio.

L'incremento del sorbitolo nel mezzo fino al 75% del totale dei due carboidrati induce un aumento significativo dell'espressione del gene *ROS1*, anche rispetto a Saccarosio 100%.

Espressione dei geni implicati nella metilazione

La proteina *ROS1* è una glicosilasi/liasi, reprime la metilazione ed attiva la trascrizione



Risultati

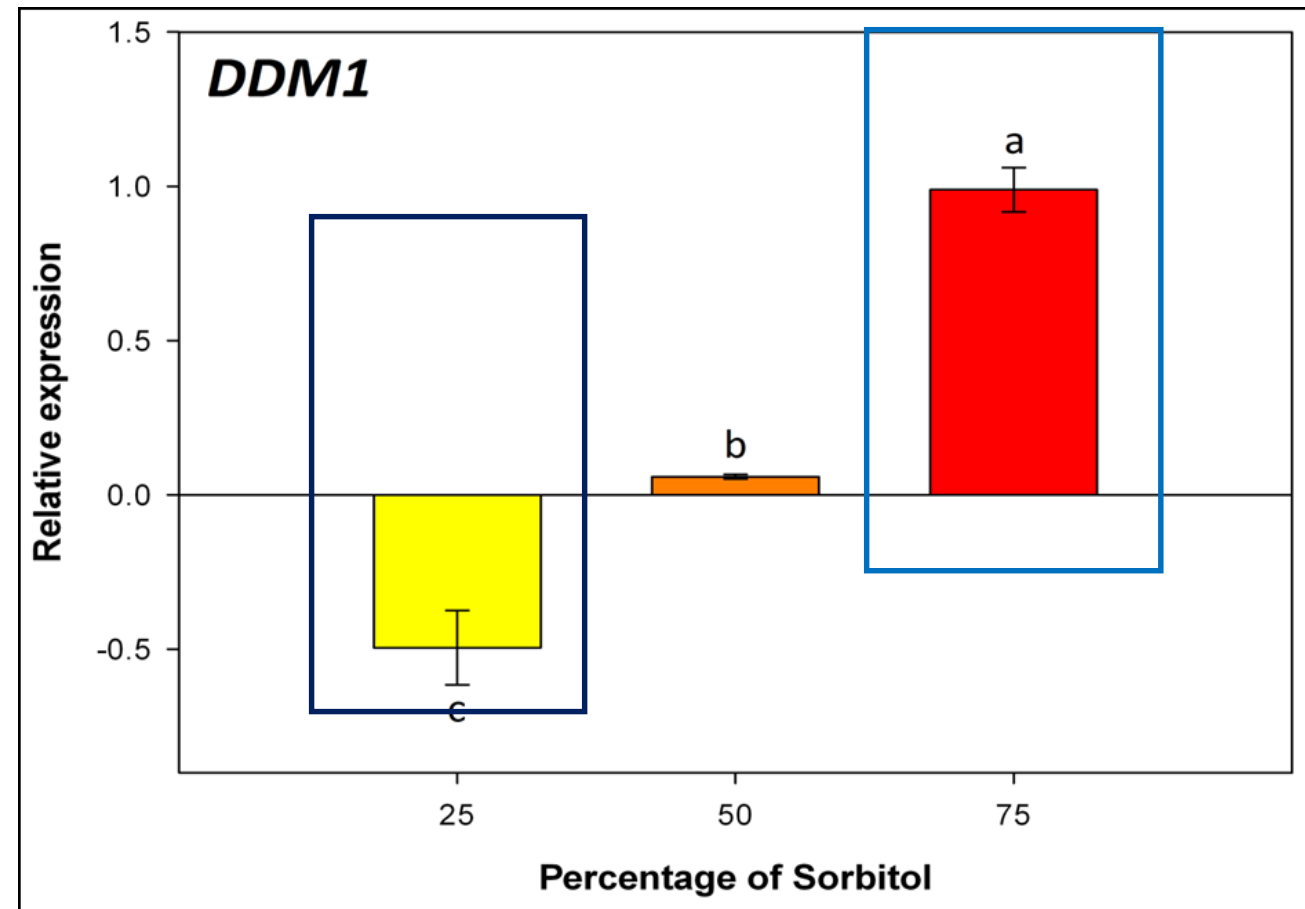
L'espressione del gene *DDM1* (*DECREASE IN DNA METHYLATION 1*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata a quella determinata nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione di *DDM1* è ridotta a meno della metà nel trattamento in cui il sorbitolo era presente al 25%, in sostituzione del saccarosio.

L'incremento del sorbitolo nel mezzo fino al 75% del totale dei due carboidrati induce un aumento di espressione del gene *DDM1* ad un valore doppio di quello del controllo saccarosio 100%.

Espressione dei geni implicati nella metilazione

La proteina *DDM1* regola la metilazione del DNA e quella istonica, rimodellando la cromatina.



Risultati

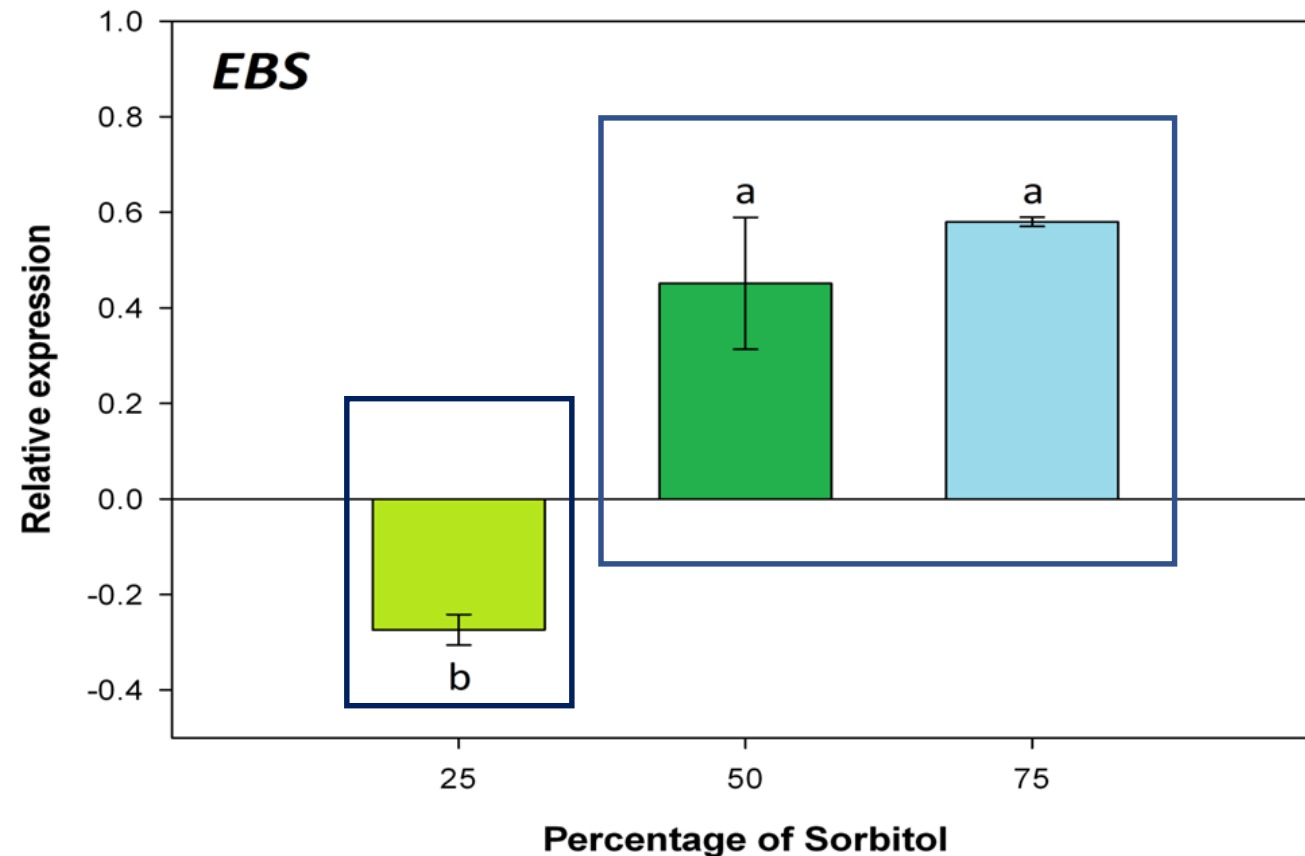
L'espressione del gene *EBS* (*EARLY BOLTING IN SHORT DAYS*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata a quella del trattamento Saccarosio 100%

L'espressione di *EBS* è ridotta a meno della metà nel trattamento in cui il sorbitolo era presente al 25%, in sostituzione del saccarosio.

L'incremento del sorbitolo nel mezzo, sia al 50% sia al 75% del totale dei due carboidrati, induce un aumento di espressione del gene *EBS* ad un valore significativamente diverso dal controllo saccarosio 100%, ma non significativo tra le due quantità di sorbitolo.

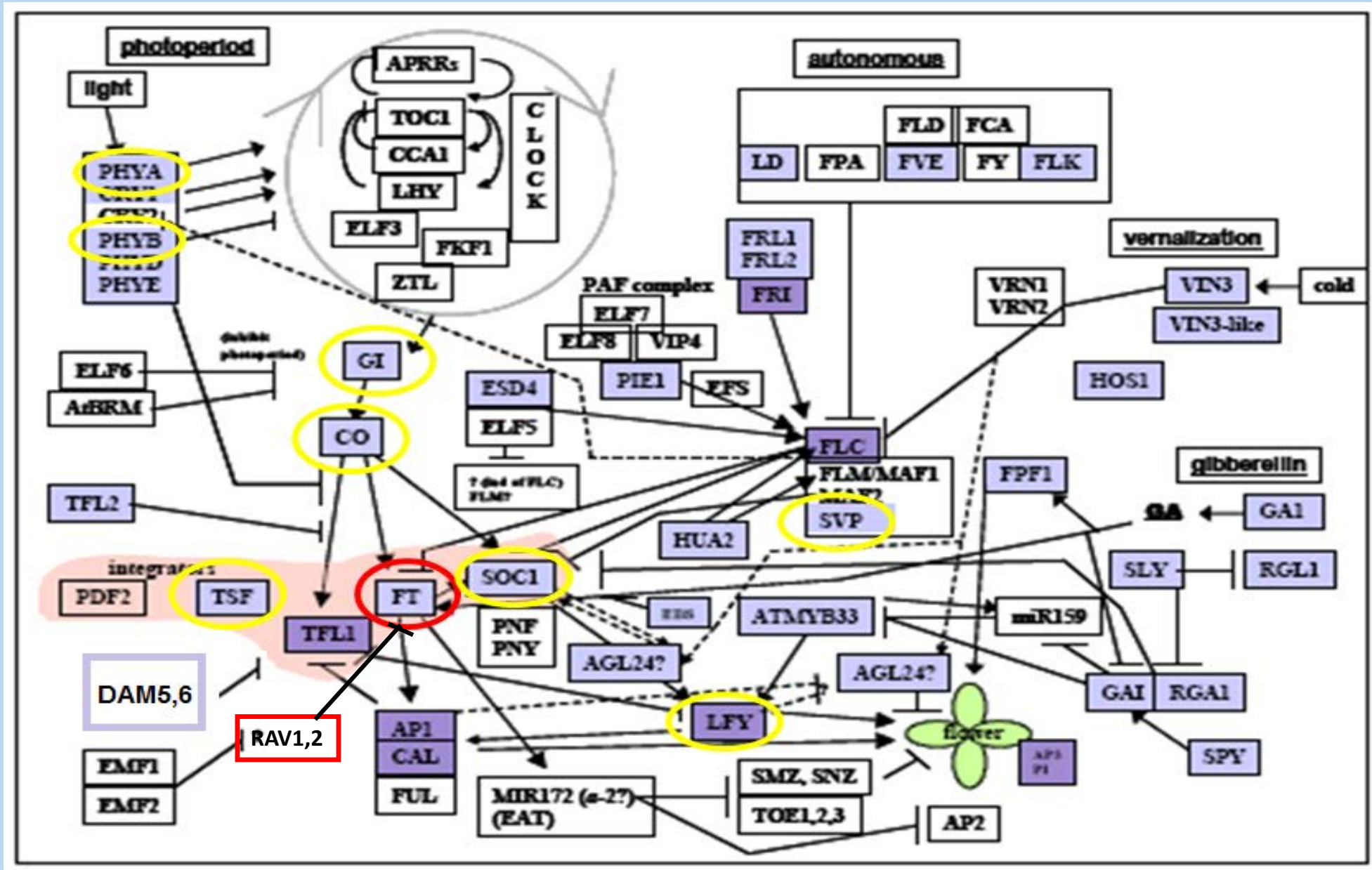
Espressione dei geni implicati nella metilazione

La proteina *EBS*, parte del complesso che rimodella la cromatina, accelera l'induzione fiorale in condizioni fotoperiodiche non induttive



Evoluzione

Cambiamento di fase e pathway di regolazione della fioritura in *Arabidopsis*, confermato in tutte le specie vegetali



i carboidrati nel mezzo colturale regolano diversamente l'espressione dei geni del cambiamento di fase nei tessuti delle piante coltivate in vitro?



Risultati

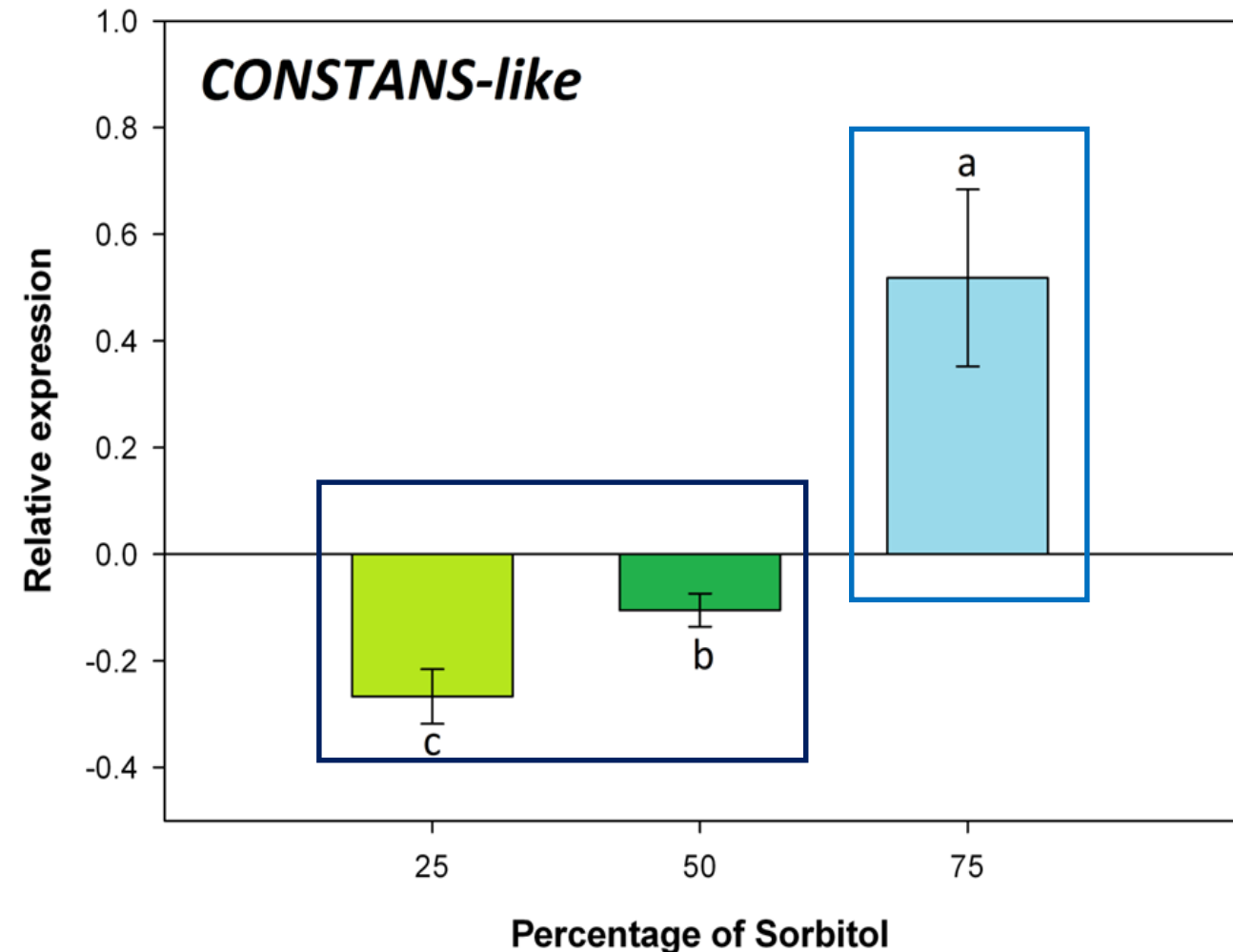
L'espressione del gene *CONSTANS-like* determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata all'espressione del gene rilevato nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione di *COMSTANS-like* è ridotta negli espianti coltivati su mezzo colturale in cui il saccarosio è stato sostituito con 25 e 50% di sorbitolo.

L'incremento del sorbitolo nel mezzo fino al 75% del totale dei due carboidrati induce un aumento significativo dell'espressione del gene *CONSTANS-like* rispetto a tutti gli altri trattamenti.

Espressione dei geni implicati nel cambiamento di fase (giavanile/adulto)

La proteina *CONSTANS-like* è un trasduttore del segnale dell'orologio biologico, del fotoperiodo e segnali interni, e regola positivamente l'espressione di FT



Risultati

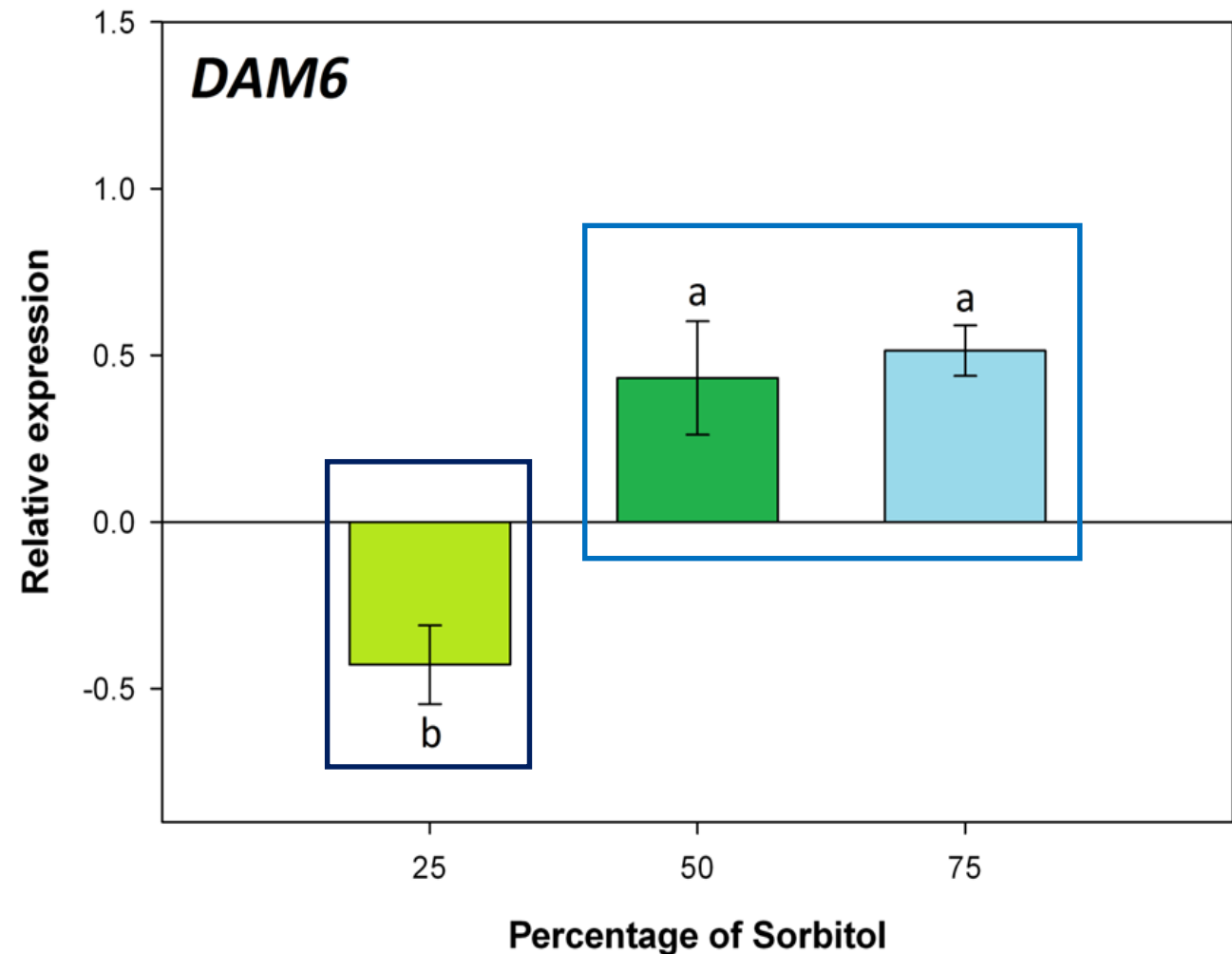
L'espressione del gene *DAM6* (*Dormancy Associated MADS-box*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata all'espressione del gene rilevato nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione del gene ***DAM6*** nei tessuti degli espianti coltivati su un mezzo contenente 25% di Sorbitolo è significativamente repressa rispetto al controllo Saccarosio 100%.

L'espressione è significativamente attivata man mano che la quantità di Sorbitolo aumenta nel mezzo, e in presenza di 50% di Sorbitolo raggiunge il massimo di espressione.

Espressione dei geni implicati nel cambiamento di fase (giavanile/adulto)

La proteina **DAM6** è coinvolta nella segnalazione termica, indipendentemente da quella della vernalizzazione, inibisce TFL1, inibitore dell'espressione del gene FT



Risultati

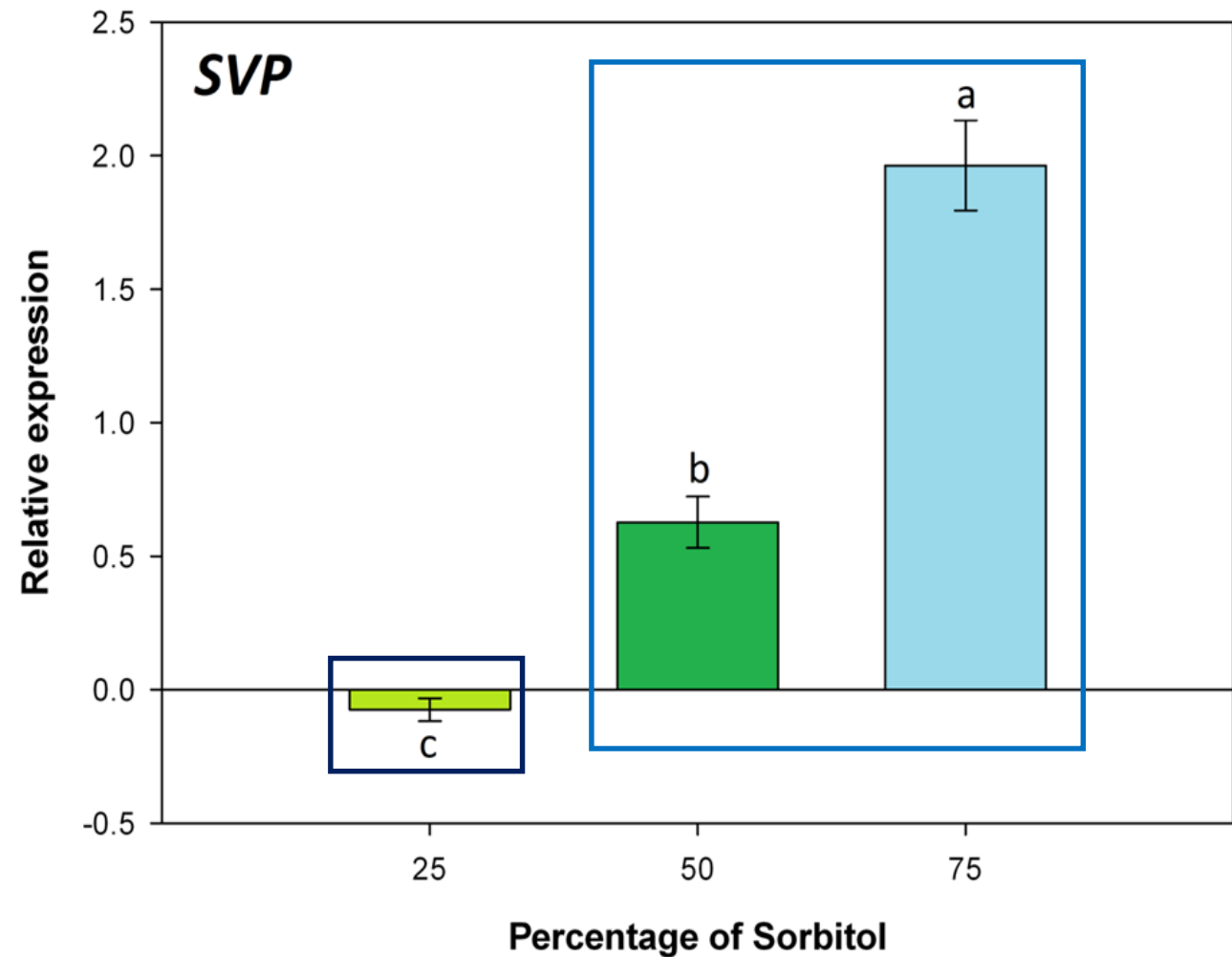
L'espressione del gene *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata all'espressione del gene rilevato nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione del gene *SVP* nei tessuti degli espianti coltivati su un mezzo contenente 25% di Sorbitolo è analoga o poco ridotta rispetto al controllo Saccarosio 100%.

L'espressione è fortemente espressa man mano che la quantità di Sorbitolo aumenta nel mezzo, raggiungendo il massimo nei tessuti degli espianti coltivati su un mezzo contenente 75% di Sorbitolo.

Espressione dei geni implicati nel cambiamento di fase (giavanile/adulto)

La proteina *SVP* traduce il segnale della temperatura ambiente sopprimendo l'espressione di FT



Risultati

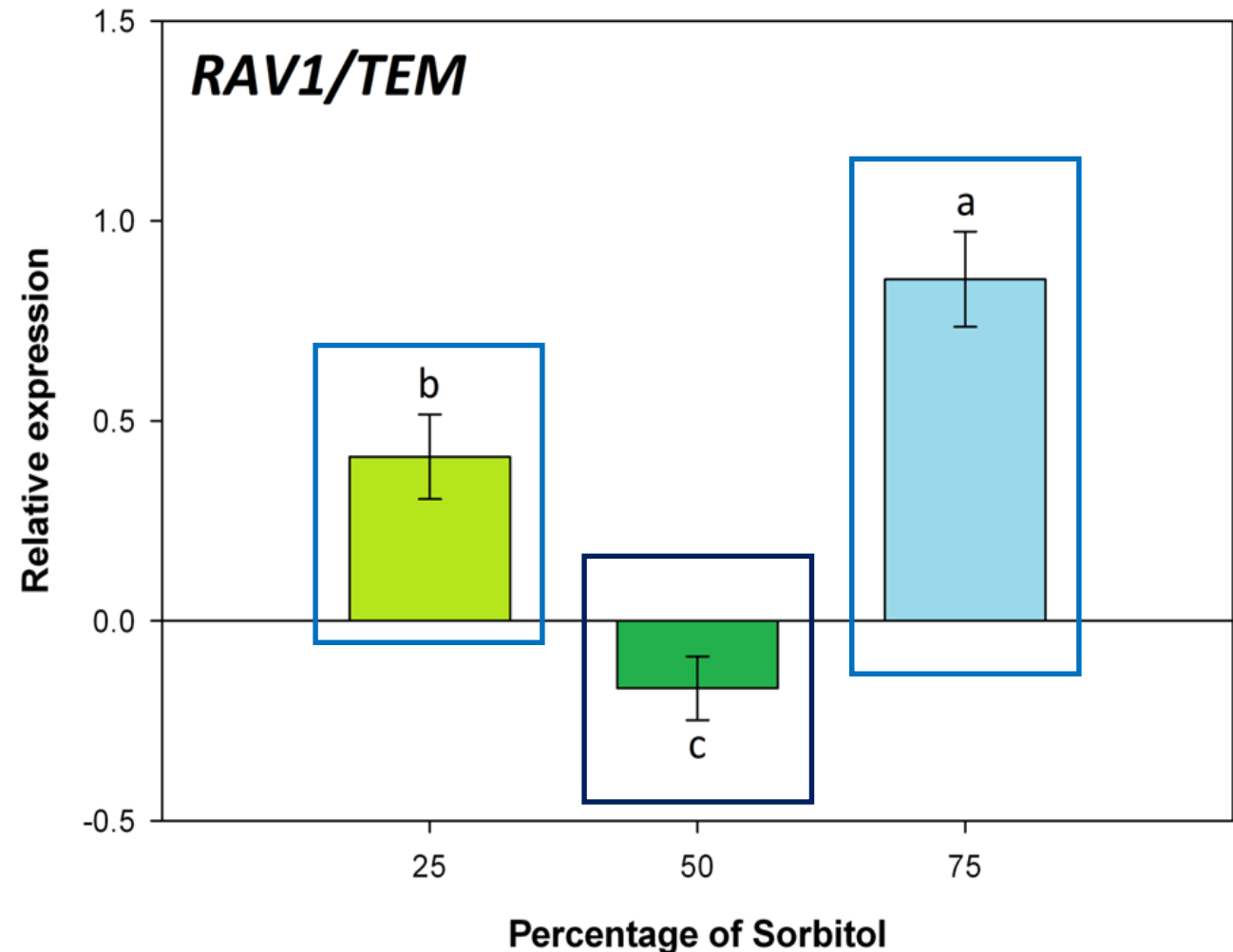
L'espressione del gene *RAV1/TEM* (*RELATED TO ABI3 AND VP1/TEMPRANILLO*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata all'espressione del gene rilevato nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione del gene *RAV1/TEM* nei tessuti degli espianti coltivati su un mezzo contenente 50% di Sorbitolo è ridotta rispetto al controllo Saccarosio 100%.

L'espressione è fortemente espressa a 25% di Sorbitolo ed ancor di più a 75% di Sorbitolo in cui raggiunge il massimo dell'espressione.

Espressione dei geni implicati nel cambiamento di fase (giavanile/adulto)

La proteina *RAV1/TEM*, interagisce con gibberelline ed è un repressore di FT e CO



Risultati

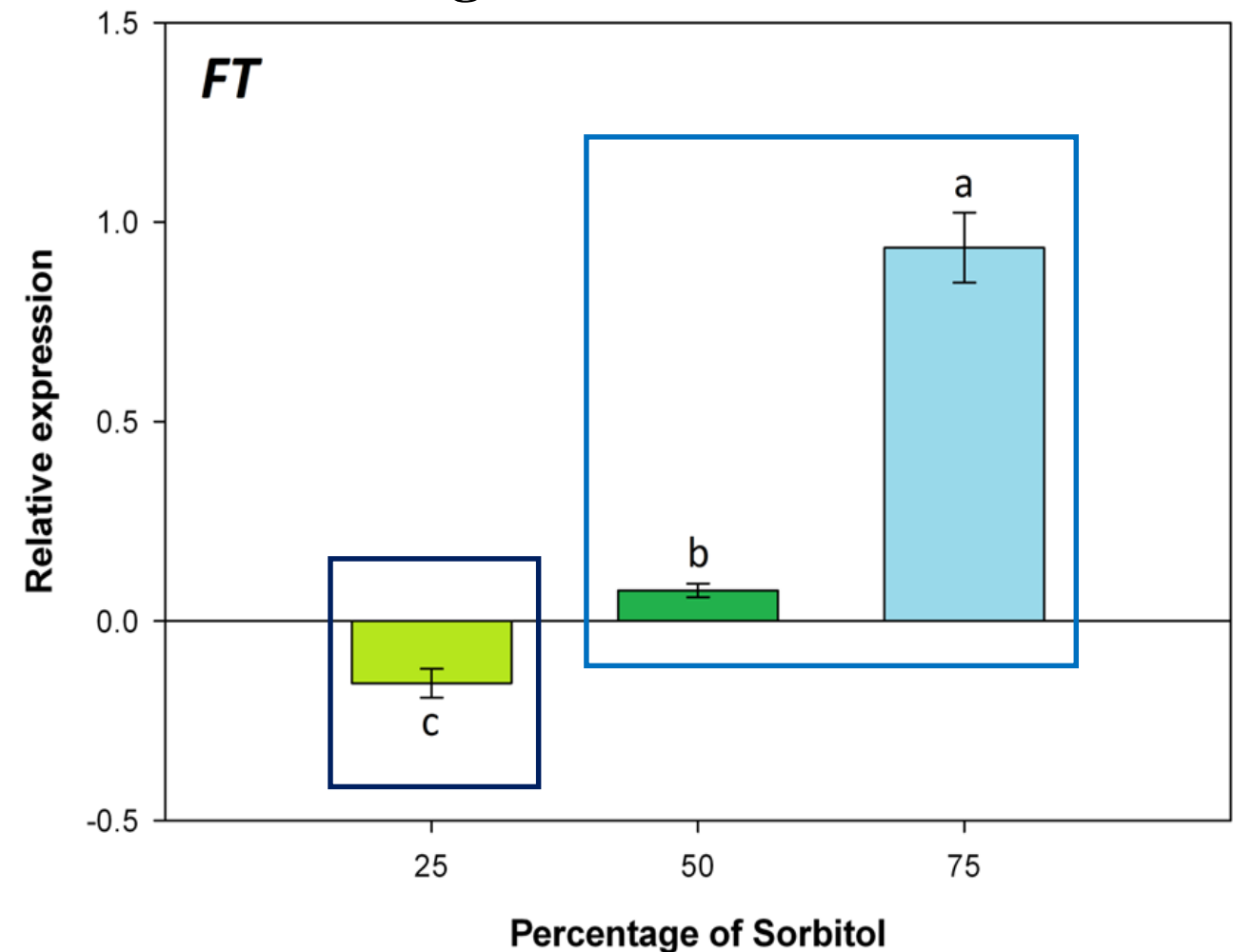
L'espressione del gene *FT* (*FLOWERING in TIME*) determinata in ciascuna combinazione di sorbitolo e saccarosio è normalizzata all'espressione del gene rilevato nel trattamento Saccarosio 100%

L'espressione del gene *FT* è ridotta nei tessuti degli espianti coltivati con il 25% di Sorbitolo.

L'espressione del gene *FT* è fortemente incrementato dalla presenza di 75% di Sorbitolo nel mezzo colturale.

Espressione dei geni implicati nel cambiamento di fase (giavanile/adulto)

La proteina Flowering in Time è il **florigeno**, sintetizzata nella foglia, migra nei fasci vascolari, come proteina e trascritto, nelle gemme laterali



Risultati

Qual è in comportamento degli espianti

Carboidrato g L ⁻¹		Fase di moltiplicazione			Fase di radicazione	
Saccarosio	Sorbitolo	Tasso di moltiplicazione	Allungamento in %	Clorofilla Totale mg g ⁻¹	Radicazione (%)	No. Radici x Espianto
15	5	4,4 a	31 ns	0,47 a	35 a	2,7 a
10	10	4,5 a	27 ns	0,44 a	47 a	1,6 b
5	15	3,7 b	22 ns	0,39 b	10 b	1,0 b
20	0	4,5 a	32 ns	0,40 b	55 a	2,8 a

La combinazione di 5g/L di Saccarosio e 15g/L di Sorbitolo reduce il tasso di moltiplicazione e la radicazione.

La stessa combinazione induce fenomeni di vitrescenza (iper-idricità).



Nessuna differenza significativa tra i trattamenti è stata trovata per il contenuto dei fenoli totali e dei carotenoidi

Qual è la frequenza di variazione epigenetica negli espianti clonati *in vitro*, rispetto alla pianta donatrice *in vivo*?

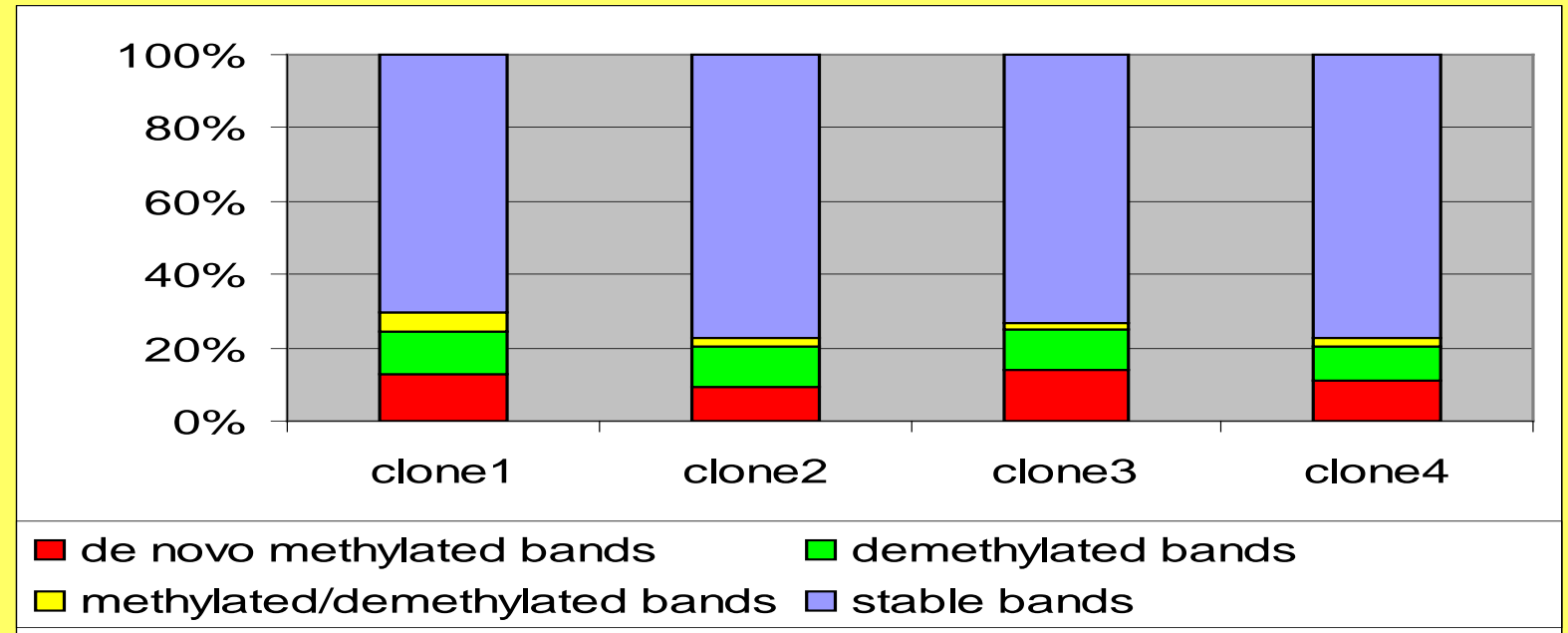


Risultati

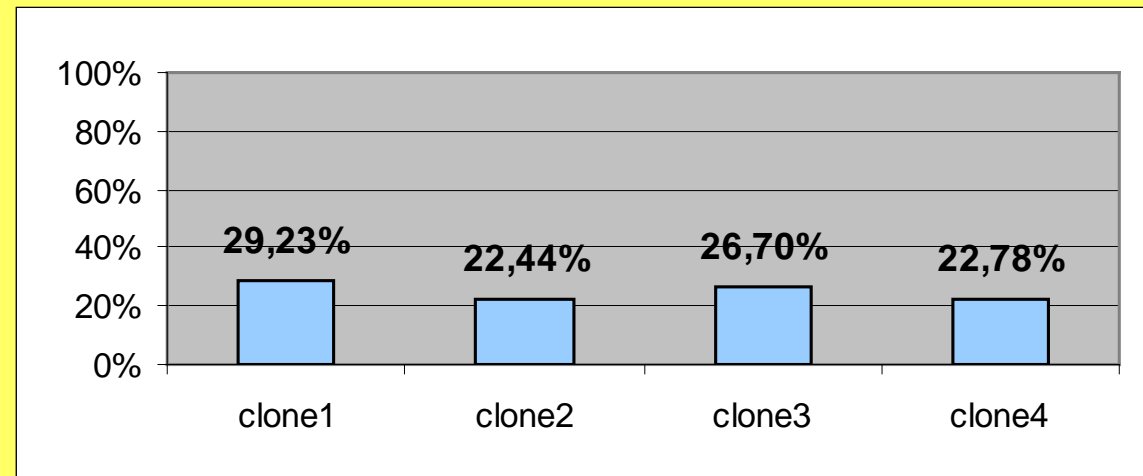
Analisi M-SAP analysis di cloni dopo 97 giorni di coltura (4,5 subcolture), comparati con la pianta donatrice

HPAII: sensibile alla metilazione

MSPI: insensibile alla metilazione



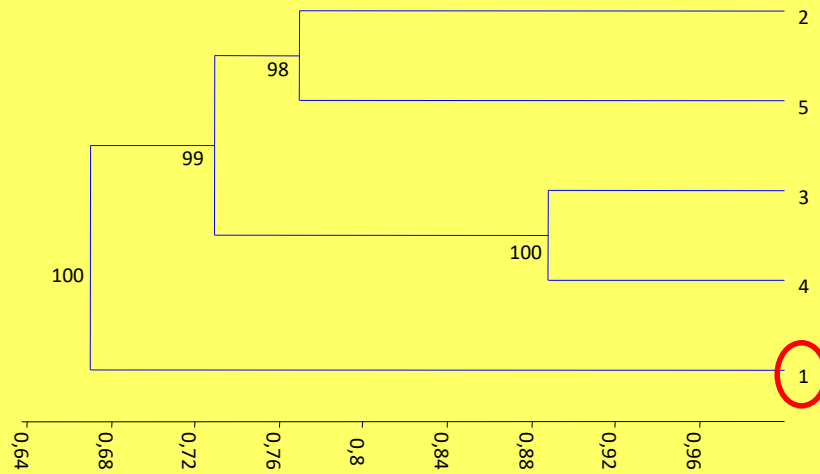
Tasso di epipolimorfismo
osservato



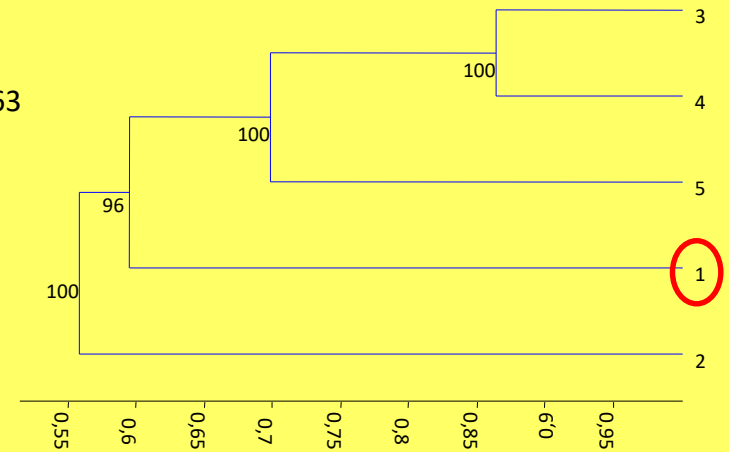
Risultati

Cluster analysis

Sample
1° HPAII
Coph. Corr=0.953

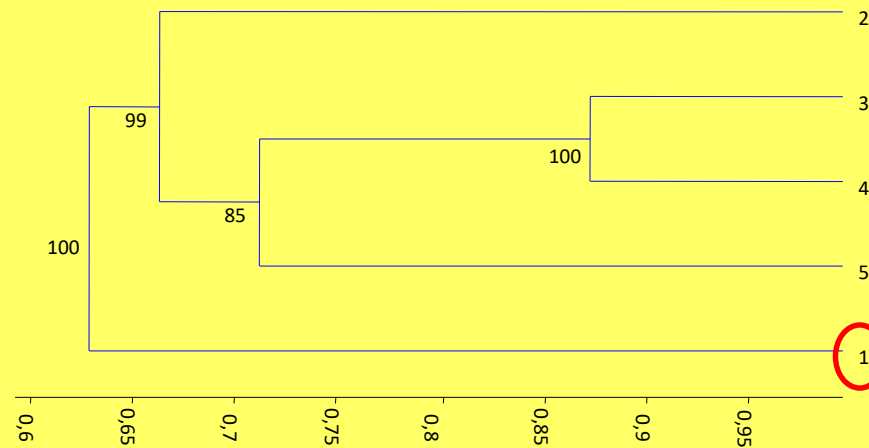


Sample
2° MSPI
Coph. Corr=0.963



- 1. Donor plant
- 2. Clone 1 sub 4°
- 3. Clone 2 sub 4°
- 4. Clone 3 sub 4°
- 5. Clone 4 sub 4°

Sample
1°+2° enzymes
Coph. Corr=0.955



Genome coverage
2,8%

E' presente sia una variabilità epigenetica sia genetica

Considerazioni

Non esistono conclusioni univoche da trarre

La pianta in vitro cerca di adattarsi e la variabilità epigenetica indica che ciascun espianto cerca una sua via all'adattamento:

pur provenendo dalla stessa gemma donatrice, ogni espianto in vitro ha una propria storia che ne determina una canalizzazione adattativa.

I risultati dell'espressione dei geni della metilazione e del rimodellamento della cromatina, sono regolati diversamente dal saccarosio e la soglia pari alla presenza del 50% di Sorbitolo nel mezzo è un chinale tra down ed up-regulation. Quali siano i target? Misterooo!

I risultati dell'espressione dei geni inerenti il cambiamento di fase generano un rompicapo interpretativo, a meno che non si riprendono i vecchi studi sul comportamento eco-fisiologico della pianta. La domanda che sorge è:

quando nei tessuti si accumula Sorbitolo la pianta come si comporta?

III CONVEGNO NAZIONALE SULLA MICROPROPAGAZIONE
Pescia, 20 – 31 maggio.



*Grazie per
l'attenzione*
