

Ciclo cellulare in *Populus alba* L.: monitoraggio delle cicline D *in planta* e durante la callogenesi

Silvia Traversari^{1*}, Anna De Carlo², Maria Laura Traversi², Giovanni Emiliani², Monica Anichini², Alessandra Francini¹, Luca Sebastiani¹, Alessio Giovannelli^{1,2}

¹Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa

²Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (IVALSA-CNR), Sesto F.no (Firenze)

Cell cycle in *Populus alba* L.: cyclin D analysis in plant and during the callogenesis

Abstract. *In vitro* establishment of primary explants (*phase 0*) is a crucial step of plant micropropagation. The success of *phase 0* is influenced by the health and the physiological conditions of the donor plant and it is commonly accepted that proliferating tissues are more suitable for *in vitro* culture than dormant ones. In this context, the individuation of markers for meristem activity could be an useful tool to increase the success of *phase 0*. Cell cycle is an orderly and tightly controlled process, divided in 4 phases: G1, S (DNA replication), G2, and M (mitosis). D-type cyclins control the G1-to-S transition. We hypothesized that cyclins D could be suitable markers of the meristem activity in poplar and good indicators for the physiological stage assessment of the donor plant. The mRNA accumulation of two D-type cyclin isoforms was evaluated in dormant and active cambial region of *Populus alba* L. as well as during the *in vitro* callogenesis. The mRNA accumulation of *CycD2.1.1* and *CycD3.B* isoforms was low in dormant cambial region and it increased in response to the forcing. This trend was recorded particularly for *CycD3.B*. Moreover, the transcription was evaluated in callus subcultured in medium supplemented with different concentrations of sucrose (0, 10, 20, or 30 g l⁻¹), in parallel with dry weight and water content measures, non-structural soluble carbohydrates content and osmotic potential determination in callus and medium. Callus dry weight increased with the increment of sucrose in the medium while water content was constant. After callus transferring, sucrose concentration decreased in the medium while glucose and fructose concentrations increased. Within the callus only glucose and fructose were recorded while sucrose was present only in trace. Soluble sugars were not detectable in the calli on the medium without sucrose. Callus adjusted its

osmotic potential to be higher than the medium for maintaining an osmotic balance in the system callus-medium. The mRNA accumulation was detected when sucrose was present in the medium and *CycDB.3* resulted significantly more transcribed in the calli maintained on the medium supplemented with 20 g l⁻¹ of sucrose compared to the medium supplemented with 0 or 10 g l⁻¹ of sucrose. In summary, the two isoforms of cyclin D could be good markers for the evaluation of the cambium onset in donor plant and, consequently, for choosing the favourable moment to take the explant for *in vitro* culture establishment, while *CycD3.B* can give useful information regarding the optimal concentration of sucrose in the medium.

Key words: callus, mitosis, proliferation, sucrose, gene transcription.

Introduzione

L'introduzione di materiale vegetale *in vitro* può rappresentare una fase critica della micropropagazione perché fortemente influenzata dalle condizioni sanitarie e fisio-fenologiche della pianta madre (Giovannelli e Giannini, 2000). In questo contesto, l'individuazione di marker che forniscano informazioni sullo stato di attività cellulare dei tessuti della pianta madre può rappresentare uno strumento valido per aumentare il successo della *Fase 0* e garantire una migliore e più efficiente produzione del materiale *in vitro*. Il modello classico del ciclo cellulare è diviso in quattro stadi: la fase G1, la fase S, in cui la cellula raddoppia il materiale genetico, la fase G2 e la fase M, in cui avvengono mitosi e citodieresi (Howard e Pelc, 1986, Nieuwland *et al.*, 2009). Le cicline sono proteine che si accumulano in relazione alla fase del ciclo cellulare e funzionano come subunità regolatrici delle serina/treonina chinasi dipendenti da cicline (CDK), molecole che regolano il passaggio nei punti di controllo del ciclo (Fowler *et al.*, 1998). Il passag-

* s.traversari@santannapisa.it

gio nella fase S del ciclo cellulare è attivato dalla sintesi di cicline di tipo D. Studi sul ciclo cellulare hanno dimostrato che l'espressione genica delle famiglie *CycD2* e *CycD3* è influenzata dalla disponibilità di saccarosio (Nieuwland *et al.*, 2009; Riou-Kamlich *et al.*, 2000; Stals e Inzè, 2001). Inoltre, è stato osservato l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 in condizioni limitanti di nutrienti evidenziando, quindi, la dipendenza della divisione cellulare alla disponibilità di fonti energetiche (Fowler *et al.*, 1998).

Considerando l'importante funzione svolta dalle cicline D nella mediazione del passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare, in questo lavoro è stato ipotizzato un loro ruolo come marker per valutare il momento più favorevole per il prelievo dell'espianto per l'allestimento della coltura *in vitro* e le condizioni fisiologiche migliori della coltura (es. livello di nutrienti). L'obiettivo è stato quindi quello di analizzare l'espressione di due isoforme di cicline D in tessuto cambiale (dormiente vs riattivato mediante forzatura) e in cellule di callo di *Populus alba* L. per verificare l'eventuale corrispondenza tra attività proliferativa ed espressione genica. Inoltre, è stato valutato il ruolo del saccarosio sull'attività delle cicline durante la fase di proliferazione del callo per verificare l'eventuale relazione tra espressione genica, concentrazione dei nutrienti e stato della coltura (peso, contenuto di acqua, potenziale osmotico).

Materiali e metodi

Materiale e disegno sperimentale

Nel mese di gennaio sono state prelevate delle marze da piante adulte di *P. alba* L., clone 'Marte', cresciute presso il vivaio del CNR-IVALSA di Sesto Fiorentino (Firenze, Italia) e messe in forzatura per stimolare l'attività cambiale. La ripresa dell'attività del cambio è stata monitorata con osservazioni al microscopio ottico (Nikon Eclipse 800). Sono stati prelevati campioni di tessuto cambiale dalla pianta madre (PM) e dalle marze dopo 7 e 14 giorni di forzatura (M_{F7} , M_{F14}) seguendo la metodica riportata in Giovannelli *et al.* (2011). Le marze sono state quindi sterilizzate, porzioni di tessuto cambiale sono state prelevate e introdotte *in vitro* ed è stata indotta callogenese seguendo la procedura riportata in Emiliani *et al.* (2016) e riassunta in figura 1. I calli sono stati mantenuti a 23 ± 1 °C al buio e subculturati ogni 4 settimane. I calli in fase esponenziale di crescita sono stati subculturati su substrato di proliferazione MS (Murashige e Skoog, 1962) con l'aggiunta di 4,4 μ M 6-benzil-adenina (BA), 5,4 μ M acido α -naftalenacetico (NAA), 30 g l⁻¹ di saccarosio, 0,6% agar (Duchefa,

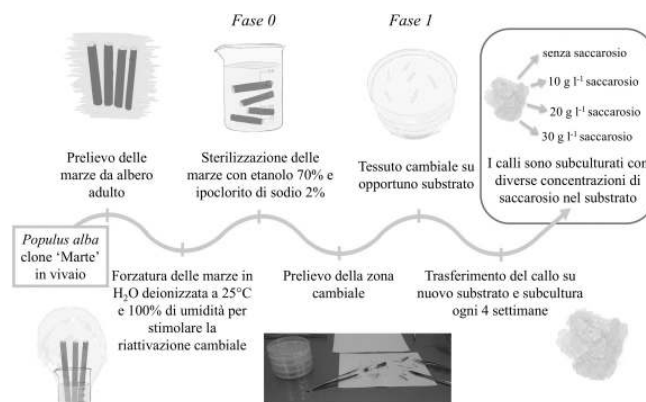


Fig. 1 - Processo di callogenese e strategia sperimentale.

Fig. 1 - Callus production and experimental strategy.

Olanda). Il pH è stato aggiustato a 5,8 prima della sterilizzazione in autoclave a 121 °C per 20 min. I calli, dopo 14 giorni, sono stati subculturati sul substrato di crescita sopra riportato ma con 0, 10, 20 o 30 g l⁻¹ di saccarosio.

Analisi biometriche, biochimiche e molecolari

All'inizio dell'esperimento (0 d) e a 28 giorni del trasferimento su nuovo substrato (28 d) sono stati eseguiti i seguenti rilievi: peso fresco, peso secco e contenuto di acqua. Inoltre, sono stati quantificati gli zuccheri solubili non strutturali e il potenziale osmotico ($\Psi\pi$) nel callo e nel substrato, seguendo quanto riportato in Emiliani *et al.* (2016).

L'RNA totale, estratto dal tessuto cambiale (PM M_{F7} , M_{F14}) e dal callo (0 d, 28 d), è stato retrotrascritto in cDNA ed utilizzato come template nelle RT-PCR, in accordo con Emiliani *et al.* (2016). Per il disegno dei primers è stato utilizzato l'albero filogenetico riportato in Emiliani *et al.* (2016) con la nomenclatura usata da Dong *et al.* (2011). È stato analizzato l'accumulo trascrizionale di mRNA codificante per un isoforma di ciclina D2, da noi indicata come D2.1.1, corrispondente alla sequenza POPTR0002s10370, e per un isoforma di ciclina D3, da noi indicata come D3.B, corrispondente alla sequenza POPTR0002s12450. Sono stati utilizzati i seguenti primers: *CycD2.1.1* Forward: 5' GCA-CAAGTGCCTACTCCTA 3'; *CycD2.1.1* Reverse: 5' CGCAGGGTTTGTCTAGCTTC 3'; *CycD3.B* Forward: 5' TTGTGAATGATCTTTTCCAC 3'; *CycD3.B* Reverse: 5' GACCTTAAGCATCCACTC-CA 3'.

Risultati

Come riportato in Emiliani *et al.* (2016), l'analisi dei carboidrati solubili ha evidenziato che la concentrazione di saccarosio nel substrato non è alterata dal

processo di sterilizzazione in autoclave. Al contrario, la presenza del callo sul substrato di crescita determina la rapida scissione del saccarosio in glucosio e fruttosio le cui concentrazioni diminuiscono durante la subcultura (Emiliani *et al.*, 2016, fig. 2A, dati nel substrato dopo 28 giorni). La composizione glucidica del callo è costituita principalmente da glucosio e fruttosio (fig. 2B, dati a 28 giorni), mentre il saccarosio è presente solo in traccia (in media < 3 mM). Il $\Psi\pi$ dei calli è in equilibrio con quello del substrato ($\Delta\Psi\pi_{\text{callo-substrato}} \approx 0.20 \text{ MPa}$) permettendo il mantenimento del turgore cellulare (il contenuto di acqua rimane costante – dato non mostrato). L'aumento della concentrazione di saccarosio nel substrato di coltura determina un aumento del peso fresco e secco del callo a 28 d (Peso secco (g): $0,072 \pm 0,003$ su 30 g l^{-1} ; $0,054 \pm 0,028$ su 20 g l^{-1} ; $0,053 \pm 0,002$ su 10 g l^{-1} ; $0,044 \pm 0,012$ su 0 g l^{-1}).

L'analisi dell'accumulo trascrizionale di mRNA codificante per le due isoforme di cicline D evidenzia una maggior trascrizione delle due isoforme analizzate nel cambio in proliferazione rispetto a quello in dormienza (fig. 3), che incrementa con i giorni di for-

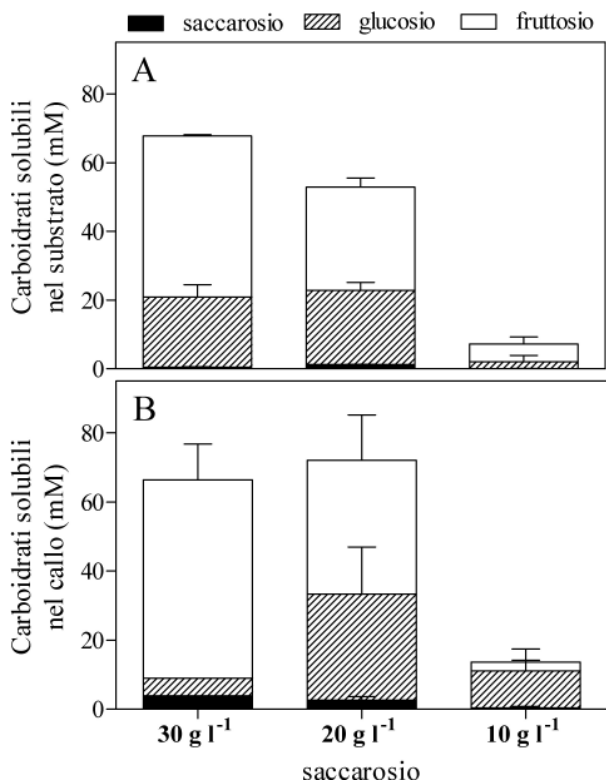


Fig. 2 - Concentrazione degli zuccheri solubili non strutturali nel substrato (A) e nel callo (B) dopo 28 giorni dall'inizio dell'esperimento. In assenza di saccarosio non sono rilevabili carboidrati solubili nel callo e nel substrato.

Fig. 2 - Non-structural soluble sugar contents within the medium (A) and the callus (B) after 28 days from the start of the experiment. In absence of sucrose, soluble sugars within the calli and the medium were undetectable.

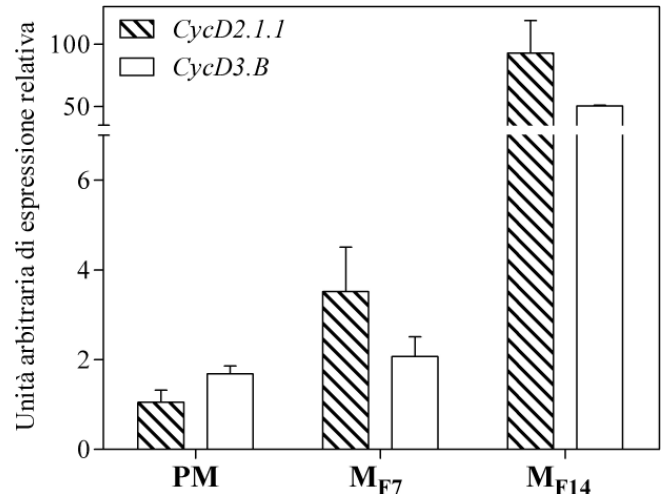


Fig. 3 - Accumulo trascrizionale di mRNA codificante per i geni *CycD2.1.1* e *CycD3.B*. PM=pianta madre; M_{F7}=marza dopo 7 giorni di forzatura; M_{F14}=marza dopo 14 giorni di forzatura. Fig. 3 - Transcriptional accumulations of mRNA codifying for *CycD2.1.1* and *CycD3.B* genes. PM=donor plant; M_{F7}=cutting after 7 days of forcing; M_{F14}=cutting after 14 days of forcing.

zatura per *CycD2.1.1*, mentre solo dopo 14 giorni di forzatura per *CycD3.B*. Nel callo l'accumulo trascrizionale delle due isoforme di ciclina D tende a diventare maggiore all'aumentare della concentrazione di saccarosio nel substrato (fig. 4, dato a 28 giorni) e, in particolare, tale aumento è significativo nel caso di *CycD3.B* sul substrato con 20 g l^{-1} di saccarosio, rispetto all'accumulo nel substrato con 10 g l^{-1} . Nei calli su substrato senza saccarosio le due isoforme di cicline D non sono espresse.

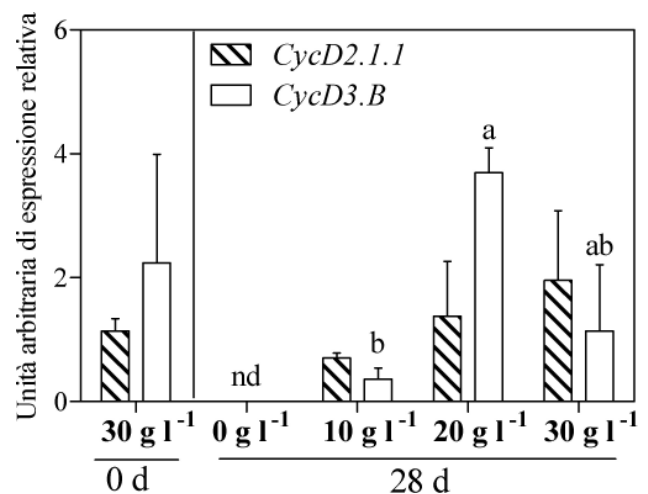


Fig. 4 - Accumulo trascrizionale di mRNA codificante per i geni *CycD2.1.1* e *CycD3.B* nel callo mantenuto su substrato con 0, 10, 20 o 30 g l^{-1} di saccarosio al giorno 0 e a 28 giorni dall'inizio della prova. nd=non rilevato. I dati sono stati analizzati con ANOVA a una via e test di Bonferroni (se $P < 0,05$).

Fig. 4 - Transcriptional accumulations of mRNA codifying for *CycD2.1.1* and *CycD3.B* genes in callus maintained on 0, 10, 20, or 30 g l^{-1} of sucrose at day 0 and after 28 days from the start of the experiment. nd=undetected. Data were analysed with one-way ANOVA and Bonferroni test ($P < 0.05$).

Discussione e conclusioni

Le cicline D hanno un ruolo centrale nella modulazione del tasso di crescita dei tessuti meristematici la cui proliferazione è regolata nella fase G1 (Cockcroft *et al.*, 2000). L'analisi trascrizionale condotta *in vivo* evidenzia un aumento dell'espressione delle due isoforme di ciclina analizzate nel tessuto cambiale attivo, evidenziando una trascrizione proporzionale all'attività mitotica del meristema. L'espressione delle due isoforme di ciclina D analizzate nel callo risulta influenzata dalla concentrazione di saccarosio disponibile nel substrato. Risultati simili sono stati riportati in *Arabidopsis thaliana* (Nieuwland *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2002; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). L'influenza della concentrazione del saccarosio sulla trascrizione delle cicline D nei calli di pioppo è in accordo con quanto evidenziato per le cicline B (Emiliani *et al.*, 2016). Le due cicline analizzate non sono trascritte nei calli mantenuti su substrato senza saccarosio, confermando che una fonte di carbonio è necessaria per l'attività di queste proteine (Fowler *et al.*, 1998). L'alta variabilità nell'espressione genica rilevata per le due cicline D nei calli mantenuti su substrato con 30 g l⁻¹ di saccarosio potrebbe essere imputata ad un'influenza negativa di alte concentrazioni del disaccaride sulla trascrizione di questa famiglia genica, come già evidenziato per le cicline B (Richard *et al.*, 2002; Emiliani *et al.*, 2016).

In conclusione, entrambe le due isoforme di ciclina D analizzate potrebbero rappresentare marker ottimali per valutare la riattivazione cambiale nella pianta madre in modo da contribuire a individuare il momento opportuno per il prelievo dell'espianto per gli allestimenti della coltura *in vitro*, mentre la ciclina D3.B può fornire utili informazioni per definire il livello ottimale di saccarosio nel substrato per favorire la proliferazione della coltura.

Riassunto

E' stata valutata la possibilità di utilizzare due cicline D (*CycD2.1.1* e *CycD3.B*) come marker dello stato di attività nella pianta madre e nel callo di pioppo. L'accumulo trascrizionale di due isoforme di ciclina D è stato analizzato *in vivo* (tessuto cambiale

prelevato da marze prima e dopo la forzatura) ed *in vitro* (callo mantenuto su diverse concentrazioni di saccarosio). I dati hanno mostrato che i due geni analizzati potrebbero rappresentare marker ottimali per valutare il momento migliore per il prelievo dell'espianto, mentre *CycD3.B* può fornire informazioni sul livello ottimale di saccarosio nel substrato di coltura.

Parole chiave: callo, mitosi, proliferazione, saccarosio, trascrizione genica.

Bibliografia

- COCKCROFT C.E., DEN BOER B.G.W., HEALY J.M.S., MURRAY J.A.H., 2000. *Cyclin D control of growth rate in plants*. Nature, 405: 575-579.
- DONG Q., ZHAO Y., JIANG H., HE H., ZHU S., CHENG B., XIANG Y., 2011. *Genome-wide identification and characterization of the cyclin gene family in Populus trichocarpa*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 107: 55-67.
- EMILIANI G., TRAVERSARI S., DE CARLO A., TRAVERSI M.L., CANTINI C., GIOVANNELLI A., 2016. *B-type cyclin modulation in response to carbon balance in callus of Populus alba*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 124 (2): 283-293.
- FOWLER M.R., EYRE S., SCOTT N.W., SLATER A., ELLIOTT M.C., 1998. *The plant cell cycle in context*. Molecular Biotechnology, 10 (2): 123-153.
- GIOVANNELLI A., EMILIANI G., TRAVERSI M.L., DESLAURIERS A., ROSSI S., 2011. *Sampling cambial region and mature xylem for non structural carbohydrates and starch analyses*. Dendrochronologia, 29: 177-182.
- GIOVANNELLI A., GIANNINI R., 2000. *Reinvigoration of mature chestnut (Castanea sativa) by repeated grafting and micro-propagation*. Tree physiology, 20 (18): 1243-1248.
- HOWARD A., PELC S.R., 1986. *Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage*. International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine, 49 (2): 207-218.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum, 15 (3): 473-497.
- NIEUWLAND J., SCOFIELD S., MURRAY J.A.H., 2009. *Control of division and differentiation of plant stem cells and their derivatives*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 20 (9): 1134-1142.
- RICHARD C., LESCOT M., INZÈ D., DE VEYLDER L., 2002. *Effect of auxin, cytokinin and sucrose on cell cycle gene expression in Arabidopsis thaliana cell suspension cultures*. Plant Cell Tissue Organ Culture, 69: 167-176.
- RIOU-KHAMLICH C., MENGES M., HEALY J.M.S., MURRAY J.A.H., 2000. *Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression*. Molecular Cellular Biology, 20 (3): 4513-4521.
- STALS H., INZÈ D., 2001. *When plant cells decide to divide*. Trends Plant Science, 6 (8): 359-364.