

УДК 575.174:582.683.2

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АДАПТАЦИИ: ВРЕМЯ НАЧАЛА ЦВЕТЕНИЯ И СТЕПЕНЬ ПОКОЯ СЕМЯН У *ARABIDOPSIS THALIANA* СЕВЕРНЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

М. В. Зарецкая, О. М. Федоренко, О. Н. Лебедева

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Работа посвящена проблеме генетических основ адаптации растений. Изучены адаптивно значимые признаки модельного вида *Arabidopsis thaliana* – потребность в яровизации, время начала цветения и сроки прорастания семян – у растений северных природных популяций (Карелия). Выявлены особенности экспрессии генов *FLC* и *VIN3*, контролирующих эти признаки. Установлен низкий уровень транскриптов мРНК *FLC* у неярвизированных растений на стадии розетки с последующим усилением экспрессии на 10–30-й день яровизации, что отличается от данных других исследователей. Первоначально низкий уровень транскриптов мРНК *VIN3* у неярвизированных растений неожиданно повышается в некоторых популяциях в процессе яровизации на 20-й день, в отличие от данных литературы. Показано, что для массового перехода к цветению растений из популяций северной периферии ареала вида в бассейне Онежского озера требуется более длительная (9-недельная) яровизация по сравнению с растениями из более мягкого климата островов Ладоги (6 недель низких температур). Изучение степени покоя семян, влияющего на сроки их прорастания, показало, что в условиях холодного климата семена *A. thaliana* имеют более сильный покой при высокой летней температуре (22 °С) по сравнению с прохладной температурой осени (10 °С). Это обеспечивает их прорастание осенью и цветение весной после окончания яровизации. Предполагается, что у *Arabidopsis thaliana* карельских популяций, расположенных на северной периферии ареала вида, одним из механизмов адаптации растений к холодному климату является адаптивная плейотропия, выражающаяся в особенностях экспрессии генов *FLC* и *VIN3*, контролирующих сроки прорастания семян осенью и цветения растений весной, после яровизации, что обеспечивает как выживание всходов, так и максимальный репродуктивный успех.

Ключевые слова: адаптация; *Arabidopsis thaliana*; северные природные популяции; время начала цветения; яровизация; покой семян; экспрессия генов *FLC* и *VIN3*.

**M. V. Zaretskaya, O. M. Fedorenko, O. N. Lebedeva. GENETIC GROUNDS FOR ADAPTATION: FLOWERING ONSET TIME AND DEGREE OF SEED DORMANCY IN NORTHERN NATURAL *ARABIDOPSIS THALIANA* POPULATIONS**

The study deals with genetic grounds for plant adaptation. Important adaptive traits of a model species, *Arabidopsis thaliana*, were studied: demand for vernalization, timing of flowering onset and of seed germination in plants in northern natural populations (Karelia). Specific expression patterns of the genes *FLC* and *VIN3*, which control these

traits, were revealed. A low transcription level of *FLC* mRNA in non-vernalized plants at the rosette stage was detected, followed by a rise in expression on the 10<sup>th</sup>–30<sup>th</sup> days of vernalization, which differs from the data reported by other researchers. The initially low level of *VIN3* mRNA transcripts in non-vernalized plants rose unexpectedly in some populations on the 20<sup>th</sup> day of the vernalization process, in contrast to data in the literature. It has been shown that a longer (9-week) vernalization is needed for a massive flowering onset in plants from populations in the northern periphery of the species range in Lake Onego catchment area as compared to 6 weeks of cold exposure for plants from the milder climate of Lake Ladoga islands. A study of the seeds' degree of dormancy, which affects the timing of germination, showed that in colder climates *A. thaliana* seeds go deeper into dormancy at a high summer temperature (22 °C) compared to a cool autumn temperature (10 °C). This ensures their germination in the autumn and flowering in the spring, after the end of vernalization. Supposedly, one of the mechanisms for plant adaptation to a cold climate in Karelian *Arabidopsis thaliana* populations, growing in the northern periphery of the species range, is adaptive pleiotropy, exhibited in the peculiar expression patterns of the *FLC* and *VIN3* genes, which control the timing of seed germination in autumn and flowering in spring, after vernalization, providing for both seedling survival and maximum reproductive success.

**Key words:** adaptation; *Arabidopsis thaliana*; northern natural populations; flowering onset time; vernalization; seed dormancy; *FLC* and *VIN3* gene expression.

## Введение

Вопросы адаптации к условиям окружающей среды имеют первостепенное значение для живых организмов. Особенно это актуально на границах ареалов видов. У однолетних растений кроме времени начала цветения адаптивно значимым является и время прорастания семян, зависящее от периода их покоя. Эти два ключевых события должны происходить строго в определенные сроки, чтобы обеспечить выживание всходов и максимальный репродуктивный успех. На *Arabidopsis thaliana*, классическом модельном объекте, показано, что ген *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), являющийся ключевым компонентом регуляторной сети инициации цветения, регулирует также и сроки прорастания семян, контролируя их покой [Chiang et al., 2009; Chen, Penfield, 2018]. Хотя многое известно о сезонной и генетической регуляции времени цветения, гораздо меньше известно об экологической и генетической основе прорастания, более раннем переходе в развитии растения.

В последнее время получены данные, которые указывают на зависимость периода покоя семян и их способность к прорастанию от уровня экспрессии гена *FLC* в созревающих на материнском растении семенах. Предполагается, что ген *FLC* опосредованно (с участием генов *AP1*, *FT* и *SOC1*, контролирующих зацветание) влияет на синтез и катаболизм гормонов гиббереллина и абсцизовой кислоты, что определяет длительность покоя семян и их способность к прорастанию [Choi et al., 2009; Chen, Penfield,

2018]. Экспрессия *FLC* контролируется различными активаторами и репрессорами. Автономный путь регуляции времени начала цветения конститутивно контролирует подавление экспрессии *FLC* для стимуляции цветения [He et al., 2003; Ausin et al., 2004]. Ген *FRI* (*FRIGIDA*) кодирует белок FRI, являющийся основным активатором *FLC* [Johanson et al., 2000]. Эффект активации *FLC* под действием FRI доминирует над супрессирующим эффектом генов-регуляторов автономного пути, однако может быть преодолен влиянием низких температур (яровизацией) [Schmitz, Amasino, 2007]. У *A. thaliana* сезонные изменения температуры определяются с помощью эпигенетического статуса гена *FLC*. Длительный период холода способствует экспрессии антисмысловых транскриптов в *FLC*, известных как *COOLAIR*, которые обеспечивают «молчание» транскрипции mRNA *FLC* путем набора PRC2-комплексов и депонирования хроматиновых меток H3 K27me3 [Chen, Penfield, 2018].

К настоящему времени сложилось мнение, что условия окружающей среды, с которыми сталкиваются материнские растения, влияют на поведение потомства [Marshall, Uller, 2007; English et al., 2015; Auge et al., 2017]. Так, температурные условия перед цветением растений заметно влияют на состояние покоя семян и, соответственно, на сроки их прорастания. В течение репродуктивного развития *A. thaliana* материнское растение использует белок FLC для модулирования периода покоя семенного потомства в ответ на температуру и таким образом передает сезонную информацию по-

томству [Chen et al., 2014; Chen, Penfield, 2018]. Также известно, что естественная аллельная изменчивость *FLC* и уровень экспрессии этого гена связаны с естественной изменчивостью температурозависимого прорастания семян [Chiang et al., 2009] и что большинство генов яровизационного пути влияют на прорастание семян и их реакцию на материнскую яровизацию [Auge et al., 2017]. Однако остается еще много неясного в генетических механизмах регуляции покоя семян; по некоторым вопросам между исследователями нет единого мнения, а результаты противоречивы.

Многие экотипы *A. thaliana* северных широт представляют собой поздние зимние однолетние растения, у которых семена прорастают при прохладной температуре осенью и откладывают цветение до окончания яровизации [Chiang et al., 2009]. В яровизационно-опосредованном переходе к цветению озимых форм растений *A. thaliana* ведущую роль играют два гена – *FLC* и *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) [Kim, Sung, 2013; Lee et al., 2015], при этом *VIN3* необходим для запуска молекулярного механизма модификации хроматина *FLC* [Adrian et al., 2009; Andrés, Coupland, 2012]. Таким образом, целью работы явилось изучение генетических и эпигенетических механизмов контроля адаптивно значимых признаков растений *A. thaliana* (времени начала цветения, потребности в яровизации и степени покоя семян) на северной периферии ареала вида. В задачи исследования входило: 1) изучение влияния длительности яровизации на сокращение времени до начала цветения растений северных природных популяций; 2) изучение степени покоя семян при различных температурных условиях выращивания материнских растений и проращивания семян; 3) оценка уровня транскрипционной активности генов *FLC* и *VIN3* до холодового воздействия и в процессе яровизации различной продолжительности.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** В работе использовали растения *A. thaliana*, выращенные из собранных в природе семян северных природных популяций, находящихся в Карелии. Изучение влияния продолжительности яровизации на сокращение времени до начала цветения растений и изучение степени покоя семян проводили на популяциях бассейна Онежского озера (популяции сельских поселений Царевичи, Шуйская, Кончезеро и популяции островов Радколье, Большой Климецкий) и более южных популяциях островов Ладожского озера (Валаам, Маркатси-

мансаари, Пиени-Сартосаари). Для определения уровня экспрессии генов *FLC* и *VIN3* отобраны популяции, различающиеся по времени начала цветения отдельных растений и по реакции их на яровизацию. Проанализированы растения двух карельских популяций, представленных поздноцветущими формами (Кончезеро и Шуйская), и одной смешанной по времени цветения – ранние и поздние формы – популяции (Царевичи). В качестве контроля использована раннецветущая линия – *Ler* (*Landsberg erecta*).

**Выращивание растений в лабораторных условиях** проводили по общепринятым методикам культивирования арабидопсиса [Иванов и др., 1966]. Семена, собранные во время экспедиции 2015 г., высевали в чашки Петри и проращивали на простой среде по Гихнеру – Велеминскому, которая готовилась на основе 8% агар-агара с добавлением растворов макроэлементов:  $\text{KNO}_3$ ;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; ЭДТА (натриевая соль) и микроэлементов. Растения в чашках Петри выращивали под люминесцентными лампами при температуре 22–24 °С и круглосуточном освещении (10000 лк). Для моделирования природных условий в лаборатории яровизировали 14-дневные проростки (стадия розетки) в чашках Петри при 2–4 °С в течение 10, 20, 30, 40 или 63 (9 недель) дней. После яровизации по 40 растений каждой популяции пересаживали из чашек Петри в почву (смесь земли и песка 1:1) и выращивали в тех же условиях, что и до яровизации, для определения времени начала цветения.

Анализ экспрессии генов *FLC* и *VIN3* проводили на 14-дневных проростках до яровизации или после нее (14 + 10, 20 ... 63 дня). Для изучения степени покоя свежесобранных семян материнские растения выращивали в лабораторных условиях при 22 °С, как описано выше, или использовали растения, выросшие в природной среде, среднесуточная температура июня 2019 г. ~ 15 °С. Свежесобранные семена в количестве 200 шт. (50×4 повторности) для каждой популяции высевали на второй день и выращивали в чашках Петри на агаризованной питательной среде, как описано выше, в камере искусственного климата при 10 или 22 °С, 16-часовом фотопериоде и освещении 10000 лк. О степени покоя семян судили по их всхожести на 10-й день.

**Анализ уровня транскриптов генов.** Выделение суммарной РНК из листьев растений осуществлялось с использованием набора ExtractRNA («Евроген», Россия) по методике производителя. Навеску листьев 50 мг гомогенизировали в лизирующем буфере ExtractRNA. Депротеинизацию проводили с помощью хло-

роформа. Тотальную РНК осаждали в этиловом спирте. Качество и количество РНК определяли на спектрофотометре Smart Spec (Bio-Rad, США). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (1 е. а.). Первую цепь кДНК синтезировали с помощью набора для обратной транскрипции MMLV RT kit («Евроген», Россия). Содержание мРНК генов *FLC* и *VIN3* оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green на приборе iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) с набором для ПЦР-РВ («Евроген», Россия). Для определения уровня экспрессии генов каждую ПЦР проводили три раза, на трех независимых образцах кДНК. Последовательности праймеров для анализа экспрессии: *FLC* f: 5'-GCCAAGAAGACC-GAACTCATGTTGA-3', r: 5'-CAACCGCCGATTTAAGGTGGCTA-3'; *VIN3* f: 5'-AGAAGCTGTGTTCTCAGGCAATGG-3', r: 5'-TCTTCGTCTTCGACTTTCGACAAA-3'. Анализ относительного содержания транскриптов проводился с помощью метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [Livak, Schmittgen, 2001], основанного на нормализации данных по экспрессии относительно двух референсных генов. В качестве референсных использованы гены *18sRNA* и *UBQ10*. Последовательности праймеров референсных генов: *18sRNA* f: 5'-TGCCCGTTGCTCTGA-TGA-3', r: 5'-GGATGTGGTAGCCGTTTCT-3'; *UBQ10* f: 5'-TCTTCTTTATCATCGCTTCG-3', r: 5'-GCTCAACACTTTCGCTACAT-3'. О специфичности фрагментов судили по кривым плавления.

**Статистическая обработка данных.** Экспериментальные данные обрабатывали с использованием статистических программ Microsoft Excel и Statgraphics 2.1 (ANOVA). Достоверность различий содержания мРНК генов *FLC* и *VIN3* в листьях растений разных популяций и между отдельными группами растений по длительности яровизации оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни (U-тест).

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

## Результаты и обсуждение

### *Влияние длительности яровизации на сокращение времени до начала цветения растений в карельских популяциях A. thaliana*

Как показали предыдущие наши исследования, карельские популяции *A. thaliana* представлены в основном поздноцветущи-

ми формами растений, которым для цветения требуется продолжительный период низких температур. При этом увеличение длительности холодового воздействия приводит к сокращению доли поздно зацветающих растений и реакция на яровизацию различной продолжительности у растений отдельных популяций неодинакова [Федоренко и др., 2012; Курбидаева и др., 2013]. Растения *A. thaliana* популяций северных широт, как правило, требуют очень длительной яровизации [Kuittinen et al., 1997; Shindo et al., 2006]. Так, образцы, собранные в Северной Швеции (Lov-1) на северной границе ареала арабидопсиса (62,5° с. ш.), нуждаются в трех месяцах яровизации для ускорения цветения [Duncan et al., 2015]. Лocus *FRI* наиболее часто отвечает за потребность в яровизации среди поздних экотипов Центральной Европы и Скандинавии и является доминантным у них [Clarke, Dean, 1994]. Ранее было показано, что эффект позднего цветения *FRI*-локуса полностью элиминируется 40-дневной холодной обработкой [Lee, Amasino, 1995]. Однако для некоторых экотипов северных широт эпигенетическое замолкание экспрессии *FLC*, с помощью накопления триметилированных гистонов H3 K27me3 в *FLC*-хроматине, идет более медленно и 40-дневная яровизация не приводит к стабильной репрессии *FLC*. Для них требуется более длительная, до 12 недель, яровизация [Coustham et al., 2012; Duncan et al., 2015].

В связи с этим мы увеличили время яровизации растений карельских популяций *A. thaliana* до 9 недель (63 дня) и яровизировали 14-дневные проростки на стадии розетки (рис. 1, 2). Некоторое ускорение начала цветения растений в популяциях бассейна Онежского озера при 40-дневной яровизации, по сравнению с 63-дневной, по-видимому, связано с тем, что более короткая яровизация проводилась на намоченных семенах. В этом случае время роста растений 14 дней до стадии розетки отсутствует. Результаты показали, что 9-недельная яровизация растений из популяций бассейна Онежского озера привела к более синхронному зацветанию всех растений в короткие сроки – 30–45 дней по сравнению с 40-дневной яровизацией (рис. 1). В популяциях бассейна Ладожского озера более длительная яровизация не привела к подобному эффекту: время начала цветения осталось почти на прежнем уровне (рис. 2). Возможно, это связано с тем, что популяции бассейна Ладожского озера находятся примерно на 200 км южнее популяций бассейна Онежского озера, в более мягком климате, и яровизация в течение 40 дней достаточно для растений этого региона, чтобы перевести ген *FLC* в репрессивное состояние.

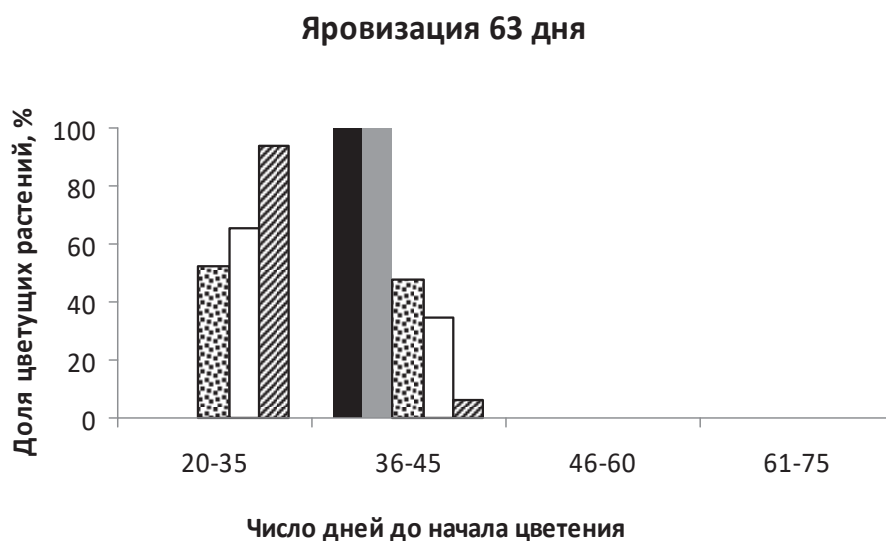
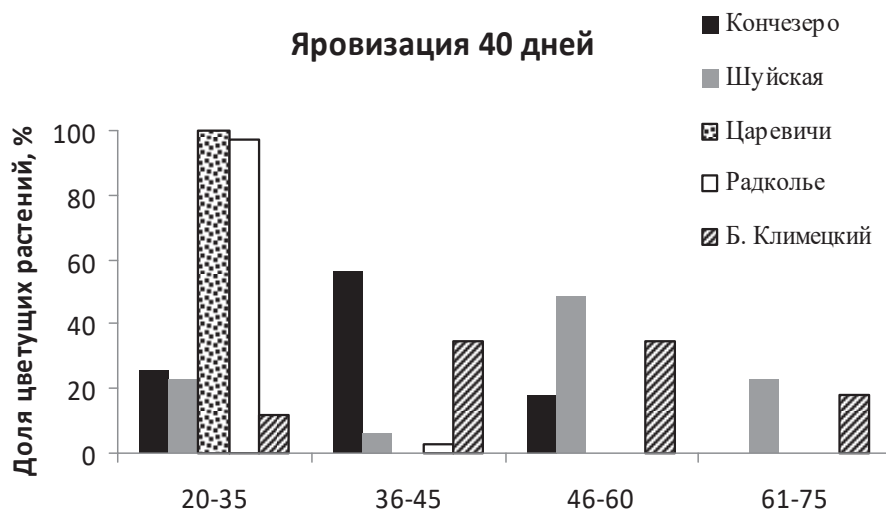


Рис. 1. Влияние длительности яровизации на время начала цветения растений *A. thaliana* карельских популяций бассейна Онежского озера.

40-дневная яровизация проводилась на намоченных семенах в чашках Петри, и начало цветения отсчитывалось с момента перемещения их в тепло.

63-дневная яровизация растений здесь и обе яровизации, представленные на рис. 2, осуществлялись на стадии розетки, поэтому число дней до начала цветения складывалось из 14 дней роста растений до яровизации и количества дней после их яровизации

Fig. 1. Impact of the vernalization duration on the timing of flowering onset of *A. thaliana* plants of the Karelian populations of the Lake Onega basin.

The 40-day vernalization was carried out on wet seeds in Petri dishes, and the timing of flowering onset was counted from the moment they were transferred to warmth.

The 63-day vernalization of plants here and both vernalization periods shown in Fig. 2, were carried out at the rosette stage, so the number of days before the flowering onset was the sum of 14 days of plant growth before vernalization and the number of days after their vernalization

#### Изучение степени покоя свежесозревших семян растений *A. thaliana* карельских популяций

В природных условиях озимые формы *A. thaliana* переживают зиму на стадии розет-

ки. В таком случае созревшие семена должны прорасти осенью, при прохладной температуре. Чтобы выявить адаптационные возможности растений, необходимо насколько возможно достоверное моделирование природных условий в лаборатории, в частности это относится

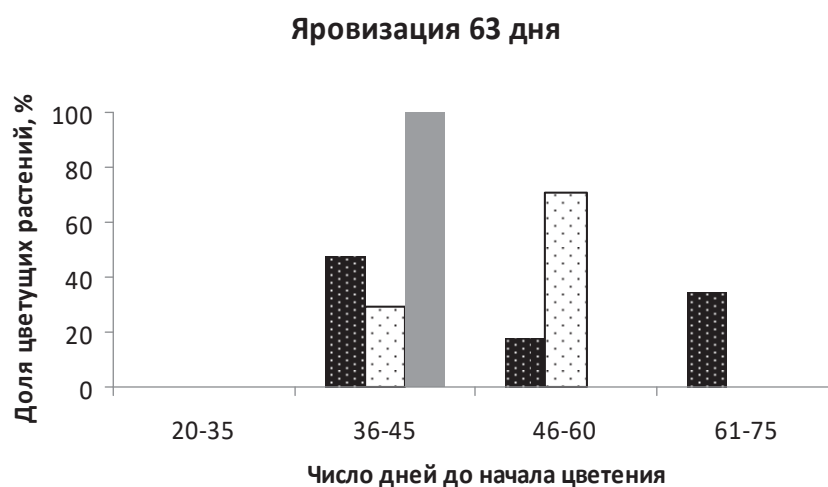
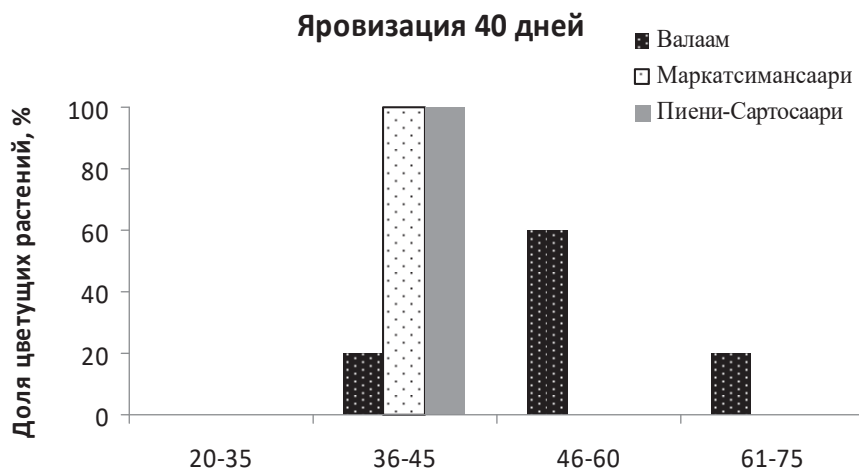


Рис. 2. Влияние длительности яровизации на время начала цветения растений *A. thaliana* карельских популяций бассейна Ладожского озера

Fig. 2. Impact of the vernalization duration on the timing of flowering onset of *A. thaliana* plants of the Karelian populations of the Lake Ladoga basin

к выбору температуры. Для получения сопоставимых результатов с данными других исследователей [Chiang et al., 2009; Chen et al., 2014; Chen, Penfield, 2018] прорастание семян оценивали при 22 °С (летняя температура) и 10 °С (среднесуточная температура осенью). Эта же температурная ситуация соответствует климатическим нормам тех районов Карелии, где находятся исследуемые популяции. Поскольку известно, что температурные условия созревания семян также влияют на их состояние покоя [Chen et al., 2014; Chen, Penfield, 2018], оценивали всхожесть семян от материнских растений, выращенных в лаборатории при 22 °С, и от растений, выросших в природной среде при среднесуточной температуре июня 2019 г. в пригороде Петрозаводска ~ 15 °С. Изучение степени покоя свежесозревших семян *A. thaliana* карельских популяций показало,

что у растений, выросших в лабораторных условиях (при 22 °С), в четырех популяциях всхожесть семян высокая как при 10, так и при 22 °С (в среднем около 78 %) (табл. 1), а в трех популяциях покой семян значительно выше при 22 °С (всхожесть от 0 до 9,5 %) по сравнению с 10 °С (всхожесть в среднем 82,8 %). Также ведет себя и ранозцветающая линия *Ler*, имеющая слабый аллель *flc* (всхожесть семян при 10 °С – 56 %, при 22 °С – 7 %). При этом как в первую, так и во вторую группу попали растения независимо от принадлежности их популяций к бассейну Онежского озера или более южного Ладожского. В популяции Кончезеро всхожесть семян оказалась низкой при обоих условиях проращивания, но немного выше при 10 °С. У растений, выросших в природной среде, покой семян выше при 22 °С (всхожесть от 1,5 до 10,5 %) по сравнению с 10 °С (всхо-

Таблица 1. Прорастание свежесозревших семян *A. thaliana* из карельских популяций (в %) при различных условиях выращивания

Table 1. Germination of freshly ripe seeds of *A. thaliana* from Karelian populations (in %) under different growing conditions

Популяция Population	10 °C	22 °C
Материнские растения выращены в лаборатории / Maternal plants grown in the laboratory (22 °C)		
Шуйская / Shuiskaya	84,5	70,0
Маркатсимансаари / Markatsimansaari	97,5	67,5
Радколье / Radcolier	72,5 } Ср.= 78,3	91,5 } Ср.= 77,5
Б. Климецкий / B. Klimetsky	58,5	81,0
Царевичи / Tsarevichi	76,5	1,5
Валаам / Valaam	95,0 } Ср.= 82,8	0 } Ср.= 3,7
Пиени-Сартосаари / Pieni-Sartosaari	77,0	9,5
Кончезеро / Konchezero	10,0	0,5
<i>Ler</i>	56,0	7,0
Материнские растения росли в природной среде / Maternal plants grew in natural environment (~ 15 °C)		
Шуйская / Shuiskaya	54,5	1,5
Косалма / Kosalma	37,5	10,5
Среднее / Srednee	46,0	6,0

Примечание. В полевых условиях в 2019 г. удалось собрать семена растений только из двух популяций.

Note. In 2019, it was possible to collect plant seeds only from two populations in the field conditions.

жесть в среднем 46,0 %) (табл. 1). Интересно, что по данным Chiang с соавт. [2009], когда растения линии *Ler* росли при 15 °C, соответствующих реальным климатическим условиям весны или осени, их свежесозревшие семена демонстрировали высокую степень покоя как при 22, так и при 10 °C. Результаты исследования позволяют предположить, что, по-видимому, растения, выросшие в прохладных условиях северного лета, формируют более сильный покой семян при 22 °C по сравнению с 10 °C, и это способствует их прорастанию осенью, а не летом, и цветению после окончания яровизации.

#### Анализ транскрипционной активности генов *FLC* и *VIN3*

Анализ экспрессии генов *FLC* и *VIN3*, контролирующих генетический механизм перехода к цветению и формирования периода покоя семян в карельских популяциях *A. thaliana*, показал, что результаты, полученные в настоящем исследовании на яровизированных розетках растений, оказались согласующимися с данными, полученными нами ранее, при яровизации намоченных семян [Федоренко и др., 2019]. То есть в обоих случаях карельские популяции проявили своеобразие (рис. 3). В частности, показан низкий уровень экспрессии *FLC* у неяровизированных растений, что отличается от данных других исследователей [Saleh et al.,

2008; Sheldon et al., 2008; Chiang et al., 2009; Neo, Sung, 2011]. Предполагается, что это может быть связано с чрезмерной активностью генов-регуляторов автономного пути, оказывающих супрессирующий эффект на экспрессию *FLC* – *FCA*, *FY*, *PCFS4*; *REF6*; *FLD*, *FVE* [Austin et al., 2004]. Далее, как видно на диаграмме (рис. 3), идет усиление транскрипционной активности гена на 10-й день яровизации в популяции Кончезеро, на 20-й день в популяции Царевичи и на 30-й день в популяции Шуйская, с последующим снижением ее к 40-му дню яровизации. Такой неожиданный подъем может объясняться генетическими особенностями поздноцветущих растений *A. thaliana* карельских популяций, а снижение экспрессии *FLC* к 40-му дню яровизации согласуется с результатами других исследователей [Saleh et al., 2008; Sheldon et al., 2008; Neo, Sung, 2011].

Транскрипционный уровень *VIN3*, низкий у неяровизированных растений, показал пик экспрессии на 10-й и 20-й день яровизации в популяциях Царевичи и Шуйская соответственно, что отличается от результатов других исследователей [Sung, Amasino, 2004; Jiang et al., 2008; Neo, Sung, 2011], и на 40-й день в популяции Кончезеро, согласно данным литературы. Следует отметить, однако, что хотя уровень экспрессии *FLC* и *VIN3* у неяровизированных растений карельских популяций низкий, тем не менее показаны различия по транскрипционной активности этих локусов

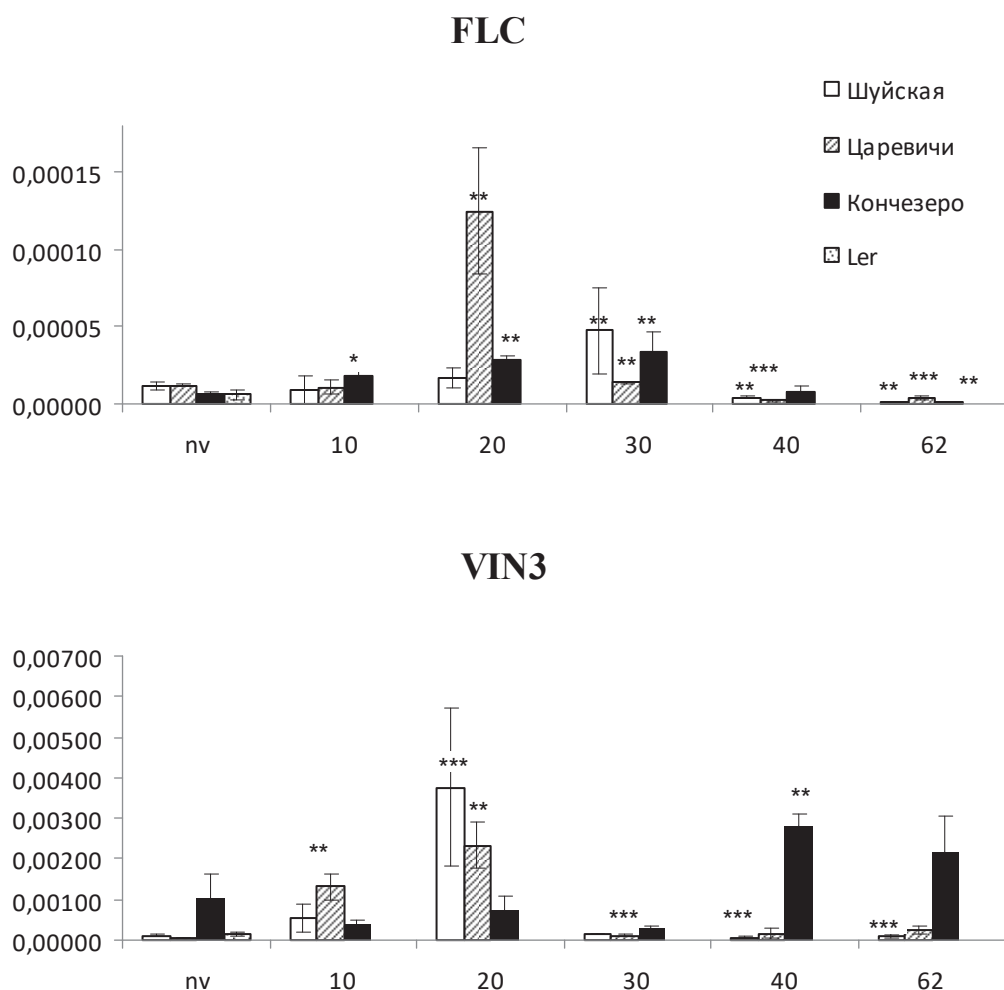


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов *FLC* и *VIN3* у растений *A. thaliana* карельских популяций на разных стадиях яровизации.

По оси X – продолжительность яровизации: nv – без яровизации; 10, 20 ... 62 – длительность яровизации в сутках. По оси Y – уровень транскриптов генов в относительных единицах. Значимость различий неярвизированных растений (nv) с ярвизированными: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Fig. 3. Relative level of expression of genes *FLC* and *VIN3* in *A. thaliana* plants of Karelian populations at different stages of vernalization.

X-axis – duration of vernalization: nv – without vernalization; 10, 20... 62 – duration of vernalization, days. Y-axis – level of gene transcripts, relative units. Significance of differences between non-vernalized plants (nv) and vernalized plants: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

между растениями популяции Царевичи и растениями других популяций (Кончезеро, Шуйская) и *Ler* (табл. 2). Возможно, это связано с тем, что популяция Царевичи представлена как позднецветущими растениями, так и раннецветущими, а популяции Кончезеро и Шуйская – только позднецветущими растениями. Таким образом, особенности экспрессии генов *FLC* и *VIN3* в северных природных популяциях, выявленные нами ранее при яровизации намоченных семян, сохраняются при моделировании условий эксперимента, близких к природным, при яровизации растений *A. thaliana* на стадии розетки.

## Заключение

В результате проведенного исследования показано, что у *A. thaliana* карельских популяций, расположенных на северной периферии ареала вида, одним из механизмов адаптации растений к холодному климату является адаптивная плейотропия, выражающаяся в особенностях экспрессии генов *FLC* и *VIN3*, контролирующей потребность в яровизации различной продолжительности, сроки прорастания семян и время цветения растений. В частности, установлен низкий уровень транскриптов мРНК *FLC* у неярвизированных растений на стадии



Таблица 2. Достоверность различий уровня экспрессии *FLC* и *VIN3* у неярвизированных растений карельских популяций *A. thaliana*

Table 2. Significance of differences in the expression level of *FLC* and *VIN3* in non-vernalized plants among the populations of *A. thaliana* in Karelia

<i>VIN3</i> \ <i>FLC</i>	<i>Ler</i>	Кончезеро Konchezzero	Царевичи Tsarevichi	Шуйская Shuiskaya
<i>Ler</i>	–	нд	**	нд
Кончезеро Konchezzero	нд	–	**	*
Царевичи Tsarevichi	**	**	–	нд
Шуйская Shuiskaya	нд	нд	***	–

Примечание. Значимость различий: нд – недостоверно; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Note. Significance of differences: нд – unreliable; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

розетки с последующим усилением экспрессии на 10–30-й день ярвизации, что отличается от данных других исследователей [Saleh et al., 2008; Sheldon et al., 2008; Chiang et al., 2009; Neo, Sung, 2011]. Первоначально низкий уровень транскриптов мРНК *VIN3* у растений неожиданно повышается в процессе ярвизации на 20-й день в двух популяциях (Царевичи и Шуйская) в отличие от данных литературы [Sung, Amasino, 2004; Jiang et al., 2008; Neo, Sung, 2011]. Северные природные популяции *A. thaliana* представлены в основном позднецветущими формами растений. Однако, как показали исследования, для массового перехода к цветению растений из популяций северной периферии ареала вида в бассейне Онежского озера требуется более длительная (9-недельная) ярвизация по сравнению с растениями из более мягкого климата островов Ладожского озера (6 недель низких температур). Изучение степени покоя семян, влияющего на сроки их прорастания, показало, что в условиях холодного климата семена *A. thaliana* имеют более сильный покой при высокой летней температуре (22 °C) по сравнению с прохладной температурой осени (10 °C). Это обеспечивает их прорастание осенью и цветение весной, после окончания ярвизации.

Таким образом, выявленные особенности экспрессии генов *FLC* и *VIN3* *A. thaliana* карельских популяций, по-видимому, обеспечивают такие фенологические характеристики растений, которые делают возможным выживание всходов и максимальный репродуктивный успех, что фактически является примером адаптивной плейотропии, способствующей местной адаптации в условиях холодного климата. Полученные результаты частично отличаются от данных других исследователей [Sheldon et al., 2008; Chiang et al., 2009; Neo, Sung, 2011] и могут быть связаны с генетическими

особенностями поздноцветущих растений *A. thaliana* карельских популяций.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0077).

## Литература

- Иванов В. И., Касьяненко А. Г., Санина А. В., Тимофеева-Ресовская Е. А. Краткая характеристика *A. thaliana* и некоторые сведения о его культивировании, технике скрещиваний и учете изменчивости // Генетика. 1966. № 8. С. 115–120.
- Курбидаева А. С., Зарецкая М. В., Солтабаева А. Д., Новокрещенова М. Г., Куприянова Е. В., Федоренко О. М., Ежова Т. А. Генетические механизмы адаптации растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. к экстремальным условиям северной границы ареала // Генетика. 2013. Т. 49, № 8. С. 943–953. doi: 10.7868/S0016675813080092
- Федоренко О. М., Грицких М. В., Николаевская Т. С. Полиморфизм по времени начала цветения у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. на северной границе его ареала // Труды КарНЦ РАН. 2012. № 2. С. 139–146.
- Федоренко О. М., Топчиева Л. В., Зарецкая М. В., Лебедева О. Н. Динамика экспрессии *FLC* и *VIN3* в процессе ярвизации растений *Arabidopsis thaliana* северных природных популяций // Генетика. 2019. Т. 55, № 7. С. 811–818. doi: 10.1134/S0016675819060031
- Adrian J., Torti S., Turck F. From decision to commitment: the molecular memory of flowering // Mol. Plant. 2009. Vol. 2. P. 628–642.
- Andrés F., Coupland G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues // Nature Rev. Genet. 2012. Vol. 13. P. 627–639. doi: 10.1038/nrg3291
- Auge G. A., Blair L. K., Neville H., Donohue K. Maternal vernalization and vernalization-pathway genes influence progeny seed germination // New Phytologist. 2017. Vol. 216(2). P. 388–400. doi: 10.1111/nph.14520
- Ausin L., Alonso-Blanco C., Martinez-Zapater J. M. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein // Nat. Genet. 2004. Vol. 36. P. 162–166.

Chen M., MacGregor D. R., Dave A., Florance H., Moore K., Paszkiewicz K., Smirnov N., Graham I. A., Penfield S. Maternal temperature history activates *Flowering Locus T* in fruits to control progeny dormancy according to time of year // PNAS. 2014. Vol. 111, no. 52. P. 18787–18792. doi: 10.1073/pnas.1412274111

Chen M., Penfield S. Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time // Science. 2018. Vol. 360. P. 1014–1017. doi: 10.1126/science.aar7361

Chiang G. C. K., Barua D., Kramer E. M., Amasino R. M., Donohue K. Major flowering time gene, *Flowering Locus C*, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana* // PNAS. 2009. Vol. 106, no. 28. P. 11661–11666. doi: 10.1073/pnas.090367106

Choi J., Hyun Y., Kang M. J., Yun H. I., Yun J.-Y., Lister C., Dean C., Amasino R. M., Noh B., Noh Y.-S., Choi Y. Resetting and regulation of Flowering Locus C expression during *Arabidopsis* reproductive development // Plant J. 2009. Vol. 57. P. 918–931. doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.03776.x

Coustan V., Li P., Strange A., Lister C., Song J., Dean C. Quantitative modulation of polycomb silencing underlines natural variation in vernalization // Science. 2012. Vol. 337. P. 584–587. doi: 10.1126/science.1221881

Clarke J. H., Dean C. Mapping *FRI*, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Gen. Genet. 1994. Vol. 242. P. 81–89.

Duncan S., Holm S., Questa J., Irwin J., Grant A., Dean C. Seasonal shift in timing of vernalization as an adaptation to extreme winter // ELIFE. 2015. Vol. 23(4): e06620. doi: 10.7554/eLife.06620

English R., Pen I., Shea N., Uller T. The information value of non-genetic inheritance in plants and animals // PLoS ONE. 2015. Vol. 10(1): e0116996. doi: 10.1371/journal.pone.0116996

He Y., Michaels S. D., Amasino R. M. Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis* // Science. 2003. Vol. 302. P. 1751–1754. doi: 10.1126/science.1091109

Heo J. B., Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA // Science. 2011. Vol. 331. P. 76–79. doi: 10.1126/science.1197349

Jiang D., Wang Y., Wang Y., He Y. Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the *Arabidopsis* Polycomb Repressive Complex 2 components // PLoS ONE. 2008. Vol. 3(10): e3404. doi: 10.1371/journal.pone.0003404

Johanson U., West J., Lister C., Michaels S., Amasino R., Dean C. Molecular analysis of *FRIGIDA*, major

determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time // Science. 2000. Vol. 290. P. 344–347. doi: 10.1126/science.290.5490.344

Kim D. H., Sung S. Coordination of the vernalization response through a *VIN3* and *FLC* gene family regulatory network in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2013. Vol. 25. P. 454–469. doi: 10.1105/tpc.112.104760

Lee I., Amasino R. M. Effect of vernalization, photoperiod and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the *FRIGIDA* gene // Plant Physiol. 1995. Vol. 108. P. 157–162.

Lee J., Yun J. Y., Zhao W., Shen W.-H., Amasino R. M. A methyltransferase required for proper timing of the vernalization response in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. Vol. 112. P. 2269–2274. doi: 10.1073/pnas.1423585112

Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method // Methods. 2001. Vol. 25. P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Kuittinen H., Sillanpää M. J., Savolainen O. Genetic basis of adaptation: flowering time in *Arabidopsis thaliana* // Theor. Appl. Genet. 1997. Vol. 95. P. 573–583.

Marshall D. J., Uller T. When is a maternal effect adaptive? // Oikos. 2007. Vol. 116. P. 1957–1963. doi: 10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x

Saleh A., Alvarez-Venegas R., Avramova Z. Dynamic and stable histone H3 methylation patterns at the *Arabidopsis FLC* and *AP1* loci // Gene. 2008. Vol. 423. P. 43–47. doi: 10.1016/j.gene.2008.06.022

Schmitz R. J., Amasino R. M. Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants // Biochim. Biophys. Acta. 2007. No. 1769. P. 269–275. doi: 10.1016/j.bbaexp.2007.02.003

Sheldon C. C., Hills M. J., Lister C., Dean C., Dennis E. S., Peacock W. J. Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 2214–2219. doi: 10.1073/pnas.0711453105

Shindo C., Lister C., Crevillen P., Nordborg M., Dean C. Variation in the epigenetic silencing of *FLC* contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response // Genes & Development. 2006. Vol. 20. P. 3079–3083. doi: 10.1101/gad.405306

Sung S., Amasino R. M. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein *VIN3* // Nature. 2004. Vol. 427. P. 159–164. doi: 10.1038/nature02195

Поступила в редакцию 24.03.2020

## References

Fedorenko O. M., Gritskikh M. V., Nikolaevskaya T. S. Polimorfizm po vremeni nachala tsveteniya u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. na severnoi granitse ego areala [Polymorphism based on the onset of flowering in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. at the northern limit of the distribution range]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2012. No. 2. P. 139–146.

Fedorenko O. M., Topchieva L. V., Zaretskaya M. V., Lebedeva O. N. Changes in *FLC* and *VIN3* expres-

sion during vernalization of *Arabidopsis thaliana* plants from northern natural populations. *Russ. J. Genetics*. 2019. Vol. 55, no. 7. P. 865–818. doi: 10.1134/S1022795419060036

Ivanov V. I., Kas'yanenko A. G., Sanina A. V., Timofeeff-Ressovskaya E. A. Kratkaya kharakteristika *A. thaliana* i nekotorye svedeniya o ego kul'tivirovanii, tekhnike skreshchivanii i uchete izmenchivosti [A brief description of *A. thaliana* and some information about its cultivation,

crossbreeding technique, and accounting for variability]. *Genetika* [Genetics]. 1966. No. 8. P. 115–120.

Kurbidaeva A. S., Zaretskaya M. V., Soltabaeva A. D., Novokreshchenova M. G., Kupriyanova E. V., Fedorenko O. M., Ezhova T. A. Genetic base of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: fitness of plants for extreme conditions in northern margins of species range. *Rus. J. Genetics*. 2013. No. 8. P. 819–826. doi: 10.1134/S1022795413080097

Adrian J., Torti S., Turck F. From decision to commitment: the molecular memory of flowering. *Mol. Plant*. 2009. Vol. 2. P. 628–642.

Andrés F., Coupland G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Rev. Genet*. 2012. Vol. 13. P. 627–639. doi: 10.1038/nrg3291

Auge G. A., Blair L. K., Neville H., Donohue K. Maternal vernalization and vernalization-pathway genes influence progeny seed germination. *New Phytologist*. 2017. Vol. 216(2). P. 388–400. doi: 10.1111/nph.14520

Ausin L., Alonso-Blanco C., Martinez-Zapater J. M. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat. Genet*. 2004. Vol. 36. P. 162–166.

Chen M., MacGregor D. R., Dave A., Florance H., Moore K., Paszkiewicz K., Smirnov N., Graham I. A., Penfield S. Maternal temperature history activates *Flowering Locus T* in fruits to control progeny dormancy according to time of year. *PNAS*. 2014. Vol. 111, no. 52. P. 18787–18792. doi: 10.1073/pnas.1412274111

Chen M., Penfield S. Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time. *Science*. 2018. Vol. 360. P. 1014–1017. doi: 10.1126/science.aar7361

Chiang G. C. K., Barua D., Kramer E. M., Amasino R. M., Donohue K. Major flowering time gene, *Flowering Locus C*, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*. 2009. Vol. 106, no. 28. P. 11661–1666. doi: 10.1073/pnas.090367106

Choi J., Hyun Y., Kang M. J., Yun H. I., Yun J.-Y., Lister C., Dean C., Amasino R. M., Noh B., Noh Y.-S., Choi Y. Resetting and regulation of Flowering Locus C expression during *Arabidopsis* reproductive development. *Plant J*. 2009. Vol. 57. P. 918–931. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03776.x

Coustham V., Li P., Strange A., Lister C., Song J., Dean C. Quantitative modulation of polycomb silencing underlines natural variation in vernalization. *Science*. 2012. Vol. 337. P. 584–587. doi: 10.1126/science.1221881

Clarke J. H., Dean C. Mapping *FRI*, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet*. 1994. Vol. 242. P. 81–89.

Duncan S., Holm S., Questa J., Irwin J., Grant A., Dean C. Seasonal shift in timing of vernalization as an adaptation to extreme winter. *ELIFE*. 2015. Vol. 23(4): e06620. doi: 10.7554/eLife.06620

English R., Pen I., Shea N., Uller T. The information value of non-genetic inheritance in plants and animals. *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10(1): e0116996. doi: 10.1371/journal.pone.0116996

He Y., Michaels S. D., Amasino R. M. Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabi-*

*dopsis*. *Science*. 2003. Vol. 302. P. 1751–1754. doi: 10.1126/science.1091109

Heo J. B., Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science*. 2011. Vol. 331. P. 76–79. doi: 10.1126/science.1197349

Jiang D., Wang Y., Wang Y., He Y. Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the *Arabidopsis* Polycomb Repressive Complex 2 components. *PLoS ONE*. 2008. Vol. 3(10): e3404. doi: 10.1371/journal.pone.0003404

Johanson U., West J., Lister C., Michaels S., Amasino R., Dean C. Molecular analysis of *FRIGIDA*, major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science*. 2000. Vol. 290. P. 344–347. doi: 10.1126/science.290.5490.344

Kim D. H., Sung S. Coordination of the vernalization response through a *VIN3* and *FLC* gene family regulatory network in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2013. Vol. 25. P. 454–469. doi: 10.1105/tpc.112.104760

Lee I., Amasino R. M. Effect of vernalization, photoperiod and light quality on the flowering phenotype of *Arabidopsis* plants containing the *FRIGIDA* gene. *Plant Physiol*. 1995. Vol. 108. P. 157–162.

Lee J., Yun J. Y., Zhao W., Shen W.-H., Amasino R. M. A methyltransferase required for proper timing of the vernalization response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. Vol. 112. P. 2269–2274. doi: 10.1073/pnas.1423585112

Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*. 2001. Vol. 25. P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Kuittinen H., Sillanpää M. J., Savolainen O. Genetic basis of adaptation: flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet*. 1997. Vol. 95. P. 573–583.

Marshall D. J., Uller T. When is a maternal effect adaptive? *Oikos*. 2007. Vol. 116. P. 1957–1963. doi: 10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x

Saleh A., Alvarez-Venegas R., Avramova Z. Dynamic and stable histone H3 methylation patterns at the *Arabidopsis FLC* and *AP1* loci. *Gene*. 2008. Vol. 423. P. 43–47. doi: 10.1016/j.gene.2008.06.022

Schmitz R. J., Amasino R. M. Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. No. 1769. P. 269–275. doi: 10.1016/j.bbaexp.2007.02.003

Sheldon C. C., Hills M. J., Lister C., Dean C., Dennis E. S., Peacock W. J. Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. Vol. 105. P. 2214–2219. doi: 10.1073/pnas.0711453105

Shindo C., Lister C., Crevillen P., Nordborg M., Dean C. Variation in the epigenetic silencing of *FLC* contributes to natural variation in *Arabidopsis* vernalization response. *Genes & Development*. 2006. Vol. 20. P. 3079–3083. doi: 10.1101/gad.405306

Sung S., Amasino R. M. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein *VIN3*. *Nature*. 2004. Vol. 427. P. 159–164. doi: 10.1038/nature02195

Received March 24, 2020

## **СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:**

### **Зарецкая Марина Витальевна**

научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: genmg@mail.ru  
тел.: (8142) 573107

### **Федоренко Ольга Михайловна**

старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: fedorenko\_om@mail.ru  
тел.: (8142) 573107

### **Лебедева Ольга Николаевна**

заместитель директора по научной работе, руководитель  
лаб. генетики, к. б. н.  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«Карельский научный центр РАН»  
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,  
Россия, 185910  
эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru  
тел.: (8142) 573107

## **CONTRIBUTORS:**

### **Zaretskaya, Marina**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: genmg@mail.ru  
tel.: (8142) 573107

### **Fedorenko, Olga**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: fedorenko\_om@mail.ru  
tel.: (8142) 573107

### **Lebedeva, Olga**

Institute of Biology, Karelian Research Centre,  
Russian Academy of Sciences  
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia  
e-mail: lebedeva@krc.karelia.ru  
tel.: (8142) 573107