

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.154+575.224.46: 582.542.1.

ГЕНОМНЫЙ ИМПРИНТИНГ У F_1 -ГИБРИДНЫХ ПОТОМСТВ *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. С СУПРЕССИРОВАННОЙ ТЕМПЕРАТУРОЗАВИСИМОЙ ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТЬЮ

О. Н. Лебедева, Т. С. Николаевская, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Показаны особенности проявления мутантного гена и гена-супрессора, контролирующей температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность у F_1 -гибридных потомств *F. pratensis* L., полученных в результате реципрокных скрещиваний материнских растений различных фенотипов, и роль этих генов в формировании эпигенетической изменчивости растительных организмов. У F_1 -гибридных потомств, сформированных в реципрокных скрещиваниях, мутантный ген может проявлять как одинаковый, так и разный геномный импринтинг. Различия в эффекте зависели от глубины хлорофилльного дефекта проростков при десупрессии и модифицирующего действия гена-супрессора при ресупрессии. Мутантный ген, контролирующей более глубокие типы депигментации X, A и их комбинированные фенотипы, не несет специфического «отпечатка» пола родителя, т. е. отцовские и материнские гены проявляют одинаковый геномный импринтинг. У F_1 -гибридных потомств с менее выраженной депигментацией проявляется материнский или отцовский эффект: для растений с фенотипами V, VN проявляется материнский, а у *w-type* и XV – отцовский эффект. Ген-супрессор обладает мультипликативным действием, не только подавляя фенотипическое проявление мутантного гена, контролирующего температурозависимую хлорофиллдефектность, но и маскируя разный геномный импринтинг у отдельных F_1 -гибридных фенотипов.

Ключевые слова: супрессированная температурозависимая хлорофиллдефектность; де- и ресупрессия; *Festuca pratensis* Huds.; F_1 -гибридные потомства; геномный импринтинг.

O. N. Lebedeva, T. S. Nikolaevskaya, A. F. Titov. GENOMIC IMPRINTING IN F_1 HYBRID PROGENIES OF *FESTUCA PRATENSIS* HUDS. WITH SUPPRESSED TEMPERATURE-DEPENDENT CHLOROPHYLL DEFECTS

We demonstrate patterns in the penetrance of the mutant gene and the suppressor gene which control suppressed temperature-dependent chlorophyll defects in F_1 hybrid progenies of *F. pratensis* L. obtained through reciprocal crossings of mother plants of different phenotypes, and the contributions of these genes to the epigenetic variation of plant

organisms. In F_1 hybrid progenies from reciprocal crossings the mutant gene may demonstrate either the same or differential genomic imprinting. Variations of the effect depended on the degree of the chlorophyll defect in the seedlings at desuppression and the modifying action of the suppressor gene at resuppression. Furthermore, the suppressor gene had a multiplier effect, as it not only suppressed the penetrance of the mutant gene that controlled temperature-dependent chlorophyll defects but also masked the different genomic imprinting in individual F_1 hybrid phenotypes.

Key words: suppressed temperature-dependent chlorophyll defects; de- and resuppression; *Festuca pratensis* Huds.; F_1 hybrid progenies; genomic imprinting.

Введение

У большинства организмов при реципрокных скрещиваниях основная масса наследственных признаков, как правило, подчиняется определенной закономерности: ген проявляет свои свойства в фенотипе потомства вне зависимости, от какого из родителей он унаследован. Это явление было открыто еще Г. Менделем в опытах на горохе и получило название «принципа эквивалентности» [Mendel, 1866]. Однако ряд признаков не подчиняются данной закономерности и управляются так называемым геномным импринтингом. Термин «импринтинг» (imprint – отпечаток) впервые предложил в 1960 г. Х. Кроуз из Колумбийского университета США для описания селективной элиминации отцовских хромосом у насекомых. Геномный импринтинг является генетическим феноменом, при котором определенные гены подлежат экспрессии особым образом: фенотипическое проявление отдельных отцовских и материнских генов, передаваемых потомству, может нести специфический «отпечаток» одного из родителей. В этом случае для экспрессии гена важно, от кого из родителей он унаследован. Теоретически любой ген может быть затронут геномным импринтингом и оба родителя могут передавать потомкам совершенно идентичные гены. Однако при разном импринтинге (материнском или отцовском) действие идентичных генов будет неодинаковым. Важно и то, что эти отличия носят временный характер, т. е. проявляются на протяжении одного или нескольких поколений и постепенно могут исчезать [Сапиенца, 1990]. Таким образом, геномный импринтинг – эпигенетически обусловленная избирательная экспрессия только одного из аллельных генов, наследуемых от родителей.

Молекулярные механизмы геномного импринтинга у растений изучают на модельных объектах (чаще других используя *Arabidopsis thaliana* L.), проводя скрининг мутантов с измененными морфологическими признаками и физиолого-биохимическими

особенностями [Chaudhury et al., 1997; Grosniklaus et al., 1998; Luo et al., 1999; Vielle-Calzada et al., 1999]. Наряду с изучением молекулярных механизмов оценка фенотипического проявления отдельных признаков у потомств, полученных от реципрокных скрещиваний растений с хлорофиллдефектностью, также представляется продуктивным подходом в изучении геномного импринтинга.

Целью настоящего исследования явилось изучение у *Festuca pratensis* L. фенотипического проявления мутантного гена и гена-супрессора, контролирующего температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность (генетическая модель), и роли в ней генов, получаемых от матери и от отца, на основе анализа частоты хлорофиллдефектных проростков при де- и ресупрессии у F_1 -гибридных потомств, полученных в результате реципрокных скрещиваний растений различных фенотипов (дикого типа и депигментированных).

Материалы и методы

Материалом для проведения настоящего исследования послужило семенное потомство (F_1 -гибриды) овсяницы луговой (*Festuca pratensis* L., $2n = 14$), полученное в реципрокных скрещиваниях растений-ревертантов, маркированных в ювенильной фазе развития по степени хлорофилльного дефекта и механизму и скорости восстановления пигментации проростка – функциональные ревертанты. В дальнейшем растения высаживали в поле и культивировали в течение шести лет в виде клонов (всего 110). Каждый клон состоял из восьми растений, полученных методом деления материнских двухлетних особей. В полевом эксперименте проводили принудительные скрещивания растений-ревертантов: одно из растений каждого фенотипа помещали под изолятор вместе с растением другого фенотипа, всего 105 вариантов скрещиваний.

В дальнейшем в лабораторных условиях на проростках, выращенных из семян F_1 -потомств, полученных от реципрокных скрещиваний,

Таблица 1. Частота хлорофиллдефектных проростков у F_1 -гибридных потомств *F. pratensis*, сформированных в реципрокных скрещиваниях, при де- и ресупрессии

Тип скрещивания ♀ × ♂	Фенотип и количество проростков		Соотношение фактически полученных фенотипов	Значение χ^2 при $p < 0,05$	Частота хлорофиллдефектных проростков	
	зеленый	хлорофиллдефектный			десупрессия	ресупрессия
N (1) × f	212	768	1:3	5,93	0,64	0,67
f × N (1)	163	643	1:3	9,81	0,80	0,62
V (2) × f	139	815	1:6	0,06	0,85	0,60
f × V (2)	203	618	1:3	0,03	0,75	0,56
VN (5) × f	314	356	1:1	2,76	0,53	0,40
f × VN (5)	220	146	2:1	7,08	0,40	0,30
XV (3) × f	203	293	1:2	12,9	0,59	0,49
f × XV (3)	164	580	1:3	3,47	0,78	0,68
X (8) × f	187	465	1:3	4,71	0,71	0,53
f × X (8)	207	581	1:3	0,68	0,74	0,58
A (4) × f	115	280	1:3	3,57	0,71	0,60
f × A (4)	239	518	1:2	1,06	0,68	0,51
XN (7) × f	178	462	1:3	2,70	0,72	0,65
f × XN (7)	129	354	1:3	0,75	0,73	0,56
VX (6) × f	242	487	1:2	0,01	0,66	0,47
f × VX (6)	265	487	1:2	1,23	0,65	0,42

Примечание. Различия в частотах зеленый/хлорофиллдефектный фенотип значимы при $p < 0,05$ $\chi^2 < 3,34$. Здесь и далее различия в частотах хлорофиллдефектных проростков F_1 -гибридных потомств, сформированных в реципрокных скрещиваниях, значимы при $p < 0,05$ (маркированы полужирным шрифтом); f – растения различных фенотипов, участвующих в скрещиваниях.

анализировали вклад отцовских и материнских генов (мутантного гена и гена-супрессора) в частоту появления хлорофиллдефектных проростков в условиях де- и ресупрессии.

Генетическая оценка де- и ресупрессии проростков овсяницы луговой проводилась при проращивании семян в условиях фитотрона в течение 10 сут при непрерывном освещении ($96-120 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) и температуре $35 \text{ }^\circ\text{C}$. В массиве проростков регистрировали зеленые (*w-type* или *norma*, N) и депигментированные растения (V – виридис; X – ксанта; A – альбина; VN – виридо-норма; VX – виридо-ксанта; XN – ксанта-норма; XV – ксанта-виридис). Депигментированные проростки восстанавливали полностью или частично зеленую окраску листа через 4 сут при снижении температуры до $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (функциональная реверсия). Подсчитывали количество зеленых и депигментированных проростков при $35 \text{ }^\circ\text{C}$ (десупрессия) и $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (частично или полностью восстановивших окраску листа до зеленой – ресупрессия). Обозначения фенотипов образовывались из начальных латинских букв соответствующего типа депигментации, знака «>» и начальных букв соответствующего типа восстановления (например, V > N, V > VX).

Депигментированные проростки восстанавливали зеленую окраску листа (ресупрессия)

с различной скоростью и двумя путями: через реверсию и репопуляцию. Быстрое восстановление путем реверсии происходило при культивировании проростков в течение последующих 4 сут или медленно – более 4 сут, и только при $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Восстановление окраски проростка до *w-type* происходило также через репопуляцию клеток базальной части проростка. При этом быстрое восстановление наблюдалось уже на 7-е сут при температуре $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Медленная репопуляция, так же как и медленная реверсия, происходила при $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Зафиксированы различные сочетания скорости и механизмов восстановления (быстрая реверсия – медленная реверсия и быстрая репопуляция – медленная репопуляция), что позволило выделить несколько фенотипических групп проростков.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что генетическая основа температурозависимой хлорофиллдефектности представлена системой, включающей мутантный ген и ген-супрессор и проявляющейся фенотипически как при подавленной функции гена-супрессора, так при ее восстановлении [Лебедева и др., 2012].

Генетический анализ хлорофиллдефектности F_1 -гибридных потомств, сформированных

Таблица 2. Частота 14-дневных проростков F_1 -гибридных потомств *F. pratensis* при восстановлении пигментации (ресупрессия) с разным импринтингом при десупрессии

Тип и механизм восстановления	Фенотипы гибридных потомств								Среднее по показателю
	N (1) × f	f × N (1)	V (2) × f	f × V (2)	VN (5) × f	f × VN (5)	XV (3) × f	f × XV (3)	
Полное восстановление до <i>w-type</i>	0,24	0,22	0,30	0,26	0,25	0,26	0,17	0,13	0,22
Частичное восстановление	0,41	0,49	0,40	0,49	0,54	0,49	0,53	0,46	0,48
Отсутствие восстановления	0,35	0,29	0,30	0,25	0,21	0,25	0,30	0,41	0,30
Всего	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Реверсия быстрая (V>N, X>N, X>V, A>N, A>V)	0,22	0,13	0,36	0,31	0,28	0,21	0,20	0,22	0,24
Реверсия медленная (V>V>N, X>X>N, A>A>N)	0,60	0,67	0,51	0,63	0,35	0,63	0,75	0,76	0,61
Репопуляция быстрая (VN>VN, XN>XN, XV>XV)	0,16	0,17	0,07	0,03	0,34	0,14	0,04	0,01	0,13
Репопуляция медленная (V>VN, X>XN, X>XV, A>AN, A>AV)	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,02	0,01	0	0,02

Таблица 3. Частота 14-дневных проростков F_1 -гибридных потомств *F. pratensis* при восстановлении пигментации (ресупрессия) с одинаковым импринтингом при десупрессии

Тип и механизм восстановления	Фенотипы гибридных потомств								Среднее по показателю
	X (8) × f	f × X (8)	A (4) × f	f × A (4)	XN (7) × f	f × XN (7)	VX (6) × f	f × VX (6)	
Полное восстановление до <i>w-type</i>	0,26	0,22	0,15	0,25	0,10	0,23	0,29	0,34	0,23
Частичное восстановление	0,44	0,50	0,57	0,46	0,60	0,41	0,41	0,40	0,47
Отсутствие восстановления	0,30	0,28	0,28	0,29	0,30	0,36	0,30	0,26	0,30
Всего	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Реверсия быстрая (V>N, X>N, X>V, A>N, A>V)	0,25	0,09	0,18	0,21	0,06	0,19	0,27	0,35	0,20
Реверсия медленная (V>V>N, X>X>N, A>A>N)	0,56	0,66	0,78	0,58	0,85	0,48	0,53	0,52	0,62
Репопуляция быстрая (VN>VN, XN>XN, XV>XV)	0,11	0,21	0,03	0,15	0,09	0,17	0,14	0,11	0,13
Репопуляция медленная (V>VN, X>XN, X>XV, A>AN, A>AV)	0,08	0,04	0,01	0,06	0	0,16	0,06	0,02	0,05

в реципрокных скрещиваниях, показал, что доля депигментированных проростков в экспериментальном пуле составляет у отдельных потомств $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{6}$. Ген-супрессор проявляет нестойкое доминирование, и, как следствие, у отдельных гибридных потомств наблюдается различное соотношение частот фенотипов

с зеленой и хлорофиллдефектной окраской листа проростков (табл. 1).

Изучение эпигенетической составляющей температурозависимой супрессированной хлорофиллдефектности при десупрессии показало следующее. Частоты хлорофиллдефектных проростков у F_1 -гибридных потомств

в одних парах реципрокных скрещиваний близки по значению (для фенотипов X, A, XN, VX), а в других отличаются на 10–20% (для фенотипов N, V, VN, XV). Полученные данные позволили заключить, что мутантный ген, контролирующий более глубокие типы депигментации X, A и их комбинированные фенотипы, не несет специфического «отпечатка» пола родителя, т. е. отцовские и материнские гены передают потомкам совершенно идентичные гены и проявляют одинаковый геномный импринтинг.

Для другой группы F_1 -гибридных потомств с менее выраженной депигментацией (V, VN, XV) и *w-type* проявляется материнский или отцовский эффекты: у них величина пула депигментированных проростков при десупрессии у потомств от реципрокных скрещиваний различна. В этом случае для экспрессии мутантного гена важно, от которого из родителей он унаследован. Для F_1 -гибридных потомств с мутантными фенотипами (V, VN) проявляется материнский эффект (увеличение частоты депигментированных проростков), а у *w-type* и XV – отцовский эффект. При разном импринтинге (материнском или отцовском) действие идентичных генов неодинаково, и величина пула депигментированных проростков у них различна (табл. 1).

В условиях ресупрессии, когда функциональная активность гена-супрессора восстановлена, у F_1 -гибридных потомств, для которых проявляется одинаковый импринтинг – отсутствие специфического «отпечатка» пола родителя, расширился спектр фенотипов: X, A, XN, VX, V и *w-type*. Эффект различного геномного импринтинга мутантного гена, выявленный при десупрессии, сохраняется при ресупрессии лишь для F_1 -гибридных потомств с комбинированными фенотипами (ранние ревертанты): VN, XV (табл. 1).

Выявлены также и особенности действия гена-супрессора в отношении механизмов и скорости восстановления пигментации F_1 -гибридных потомств при ресупрессии (табл. 2, 3). Средние значения показателей, характеризующих восстановление пигментации (полное и частичное) в двух группах F_1 -гибридных потомств с одинаковым и разным импринтингом при десупрессии, не отличаются друг от друга. Отмечены различия в частотах при восстановлении пигментации проростков: при полном и частичном восстановлении для фенотипов A (медленная реверсия) и XN (быстрая и медленная реверсия; медленная репопуляция); для фенотипов X (быстрая и медленная реверсия,

быстрая репопуляция) (табл. 3). Фенотипы этих F_1 -гибридных потомств характеризуются различным импринтингом (материнским или отцовским).

Заключение

Результаты проведенного исследования позволили выявить сложную картину регуляции экспрессии мутантного гена и гена-супрессора, контролирующих температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность у *Festuca pratensis*. У F_1 -гибридных потомств, сформированных в реципрокных скрещиваниях, мутантный ген, контролирующий температурозависимую супрессированную хлорофиллдефектность, может проявлять как одинаковый, так и разный геномный импринтинг (т. е. зависимость экспрессии мутантного гена от пола родителей). Различия в эффекте (одинаковый или разный геномный импринтинг) зависели от глубины хлорофилльного дефекта проростков при десупрессии и модифицирующего действия гена-супрессора при ресупрессии в отношении как частоты депигментированных проростков, так и механизмов восстановления их пигментации. При этом ген-супрессор обладает мультипликативным действием, не только подавляя фенотипическое проявление мутантного гена, контролирующего температурозависимую хлорофиллдефектность, но и маскируя разный геномный импринтинг у отдельных F_1 -гибридных фенотипов. Используемая в данной работе генетическая модель «супрессированной хлорофиллдефектности» позволила получить новые сведения для понимания сложных механизмов эпигенетической изменчивости у растительных организмов, в частности геномного импринтинга, и роли в ней генов-супрессоров.

Литература

- Лебедева О. Н., Николаевская Т. С., Титов А. Ф., Федоренко О. М. Биологические особенности северных популяций многолетних злаков. Генетический груз и выживаемость / Под общ. ред. А. Ф. Титова. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2012. 261 с.
- Сапиенца К. Геномный импринтинг // В мире науки. 1990. № 12. С. 14–20.
- Chaudhury A. M., Ming L., Miller C. et al. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. Vol. 94. P. 4223–4228.
- Grossniklaus U., Vielle-Calzada J. P., Hoepfner M. A., Gagliano W. B. Maternal control of embryogenesis by *meade* a polycomb group gene in *Arabidopsis* // Science. 1998. Vol. 280. P. 446–450.

Luo M., Bilodeau P., Koltunow A. et al. Genes controlling fertilization-in-dependent seed development in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 296–301.

Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden // Verhandlung des naturforschenden Vereines Brunn. 1866. Vol. IV. P. 67–112.

Vielle-Calzada J. P., Thomas J., Spillane C. et al. Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis medea locus requires zygotic ddml activity // Genes Dev. 1999. Vol. 13, no. 22. P. 2971–2982.

Поступила в редакцию 11.02.2016

References

Lebedeva O. N., Nikolaevskaya T. S., Titov A. F., Fedorenko O. M. Biologicheskie osobennosti severnykh populyatsii mnogoletnikh zlkov. Geneticheskii gruz i vyzhivaemost' [Biological peculiarities of northern populations of perennial cereals. Genetic load and survival]. Ed. A. F. Titov. Petrozavodsk: KarRC of RAS, 2012. 261 p.

Sapientsa K. Genomnyi imprinting [Genomic imprinting]. *V mire nauki* [In the World of Science]. 1990. No. 12. P. 14–20.

Chaudhury A. M., Ming L., Miller C., Craig S., Dennis E. S., Peacock W. J. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997. Vol. 94. P. 4223–4228.

Grossniklaus U., Vielle-Calzada J. P., Hoepfner M. A., Gagliano W. B. Maternal control of embryogenesis by medea a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science*. 1998. Vol. 280. P. 446–450.

Luo M., Bilodeau P., Koltunow A., Dennis E. S., Peacock W. J., Chaudhury A. M. Genes controlling fertilization-in-dependent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 296–301.

Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verhandlung des naturforschenden Vereines Brunn*. 1866. Vol. IV. P. 67–112.

Vielle-Calzada J. P., Thomas J., Spillane C., Coluccio A., Hoepfner M. A., Grossniklaus U. Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis medea locus requires zygotic ddml activity. *Genes Dev*. 1999. Vol. 13, no. 22. P. 2971–2982.

Received February 11, 2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Лебедева Ольга Николаевна

зам. директора по научной работе, руководитель лаборатории генетики, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: lebedeva@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 774682

Николаевская Татьяна Сергеевна

старший научный сотрудник лаб. генетики, к. б. н.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск,
Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: nicoltn@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Титов Александр Федорович

председатель КарНЦ РАН, руководитель лаб. экологической физиологии растений, чл.-корр. РАН, д. б. н., проф.
Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

CONTRIBUTORS:

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) 774682

Nikolaevskaya, Tatiana

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

Titov, Alexandr

Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru