



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ВЛИЯНИЕ 5-АЗАЦИТИДИНА НА РАЗВИТИЕ ПРОРОСТКОВ И ПРОДУКТИВНОСТЬ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Ступак Е.Э.¹, Ступак С.И.²,
Никонов В.И.³, Вафина Г.Х.¹

¹Уфимский институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа

²Башкирский государственный университет, Уфа

³Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа

E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Метилирование ДНК у растений участвует в дифференцировке клеток, реализации программ онтогенеза, реакции на биотические и абиотические стрессовые факторы, а также в подавлении активности мобильных генетических элементов посредством воздействия на транскрипцию генов и структуру хроматина. Неметилируемый аналог цитозина, 5-азациитидин, встраивается в молекулу ДНК при репликации и ковалентно связывает метилтрансферазы. Как показано в ряде работ, у растений фенотипические проявления гипометилирования, вызванного азациитидином, могут наследоваться в последующих поколениях.

В работе исследовалось влияние кратковременной (15 часов) обработки 5-азациитидином семян яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на скорость роста корневой системы, вес зерна, а также развитие проростков из семян следующей генерации. Обнаружено, что в концентрации 1 мМ азациитидин снижает, а в концентрации 0,01 – 0,1 мМ увеличивает скорость роста корневой системы проростков. Полевые эксперименты с посевом семян, обработанных 5-азациитидином в концентрации 0,1 мМ, показали увеличение общего веса собранного зерна по сравнению с контролем на 9%. Результат был обусловлен повышением полевой всхожести и увеличением средней массы одного зерна. Повышенная скорость роста зародышевой корневой системы не наследовалась, напротив часть проростков из полученных семян отставала в темпах своего развития.

Ключевые слова: 5-азациитидин, метилирование ДНК, проростки, мягкая пшеница, *Triticum aestivum*

THE EFFECT OF 5-AZACYTIDINE ON THE DEVELOPMENT OF SEEDLINGS AND THE PRODUCTIVITY OF SPRING BREAD WHEAT

Stupak E.E.¹, Stupak S.I.²,
Nikonov V.I.³, Vafina G.H.¹

¹Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa

²Bashkir State University, Ufa

³Bashkirian Research Institute of Agriculture of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa

E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

DNA methylation in plants is involved in cell differentiation, realization of ontogenesis programs, reactions to biotic and abiotic stress factors, as well as in suppressing the activity of mobile genetic elements through influencing gene transcription and chromatin structure. The non-methylated cytosine analog, 5-azacytidine, is inserted into the DNA molecule during replication and covalently binds the methyltransferases. As shown in a number of works, in plants, the phenotypic manifestations of hypomethylation caused by azacytidine can be inherited through successive generations.

The work investigated the effect of short-term (15 hours) 5-azacytidine influence at the stages of water uptake in spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) on the growth rate of the root system, the weight of grain and the development of seedlings from the next generation of seeds. Azacytidine at a concentration of 1 mM decreases, and at a concentration of 0,01-0,1 increases the growth rate of the root system of seedlings was detected. Field sowing seeds experiment treated with 5-azacytidine at a concentration of 0,1 mM showed an increase in the total weight of the harvested grain by 9% compared with the control. The result was due to increased field germination and an increase in the average mass of one grain. The increased growth rate of the germinal root system was not inherited; conversely, some of the seedlings from the obtained seeds lagged behind in their development rates.

Keywords: 5-azacytidine, DNA methylation, seedlings, bread wheat, *Triticum aestivum*

Поступила в редакцию: 4.12.2018

ВВЕДЕНИЕ

Метилирование цитозина в молекуле ДНК является одним из эпигенетических механизмов, участвующих в управлении онтогенезом и экологической пластичностью растений (Gallusci et al., 2017; Bartels et al., 2018; Chatterjee et al., 2018). Более 50% метилированного цитозина у покрытосеменных приходится на последовательность CG, реже метилируется цитозин в CHG и CHH (где H = A, C или T) (Bartels et al., 2018). Как правило, метилирование промоторной области снижает экспрессию гена, предположительно, в результате нарушения связывания факторов транскрипции (Gardner et al., 2015; Narsai et al., 2017). В транскрибируемых областях наблюдается как положительная, так и отрицательная корреляция метилирования с уровнем транскрипции (Gardner et al., 2015; Gardner et al., 2018).

Степень метилирования хроматина динамически изменяется в процессе онтогенеза. Так при созревании семян степень метилирования ДНК эмбриона возрастает, а прорастание, напротив, приводит к гипометилированию (Bartels et al., 2018). Предполагают, что метилирование обеспечивает конденсацию хроматина и, соответственно, подавление транскрипции генов при созревании семян и деконденсацию хроматина при прорастании (Vozyer et al., 2017). При этом гиперметилирование обусловлено работой ферментативных систем, в то время, как гипометилирование происходит пассивно (Kawakatsu et al., 2017). Эндосперм семян гипометилирован (Lu et al., 2015).

Неметилируемый аналог цитозина, 5-азациитидин, широко используется в исследованиях метилирования ДНК. Неизбирательный гипометилирующий эффект, связан как со встраиванием 5-азациитидина в ДНК, так и с последующим ковалентным взаимодействием с метилазами, что объясняет эффективность низких концентраций данного вещества (Griffin et al., 2016; Santi et al., 1984). Обработка 5-азациитидином стимулирует цветение растений длинного (*Silene armeria*) и короткого (*Perilla frutescens*) дня в несоответствующий световой период, ускоряет созревание томатов, изменяет уровень накопления антоцианов в кожце яблок и груш, уменьшает число цветков в соцветии свеклы, повышает содержание белка в зерновках пшеницы, активизирует устойчивость риса к бактериальному патогену *Xanthomonas oryzae* (Ванюшин, 2013; Юданова и др., 2012; Espinas et al., 2016; Xu et al., 2017). В высоких дозах 5-азациитидин проявляет токсичность, не связанную напрямую с гипометилированием (Betekhtin et al., 2018). Также показана индукция азациитидином окислительного стресса в каллусных тканях (Xu et al., 2017).

В данной работе исследовалось влияние кратковременного (15 часов) воздействия 5-азациитидина на стадии набухания семян яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на скорость роста корневой системы, вес зерна и развитие проростков из семян следующей генерации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на мягкой яровой пшенице сорта Омская 35. Посевной материал обрабатывали 96%-ным этанолом в течение 3 мин, затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Затем семена замачивали в дистиллированной воде или растворах 5-азациитидина (Sigma) с концентрацией 0,01; 0,1 или 1 мМ и через 15 часов

промывали и переносили в чашки Петри с дистиллированной водой при 25°C или высаживали в почву.

Полевые эксперименты проводили на базе Чишминского селекционного центра Башкирского НИИСХ УФИЦ РАН в 2017 году в трех повторностях.

Статистическая обработка проводилась в программе MS Excel. Результаты представляли в виде средней арифметической \pm ошибка средней.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 показана зависимость длины главного корня и coleoptily от концентрации азациитидина при обработке семян на стадии набухания.

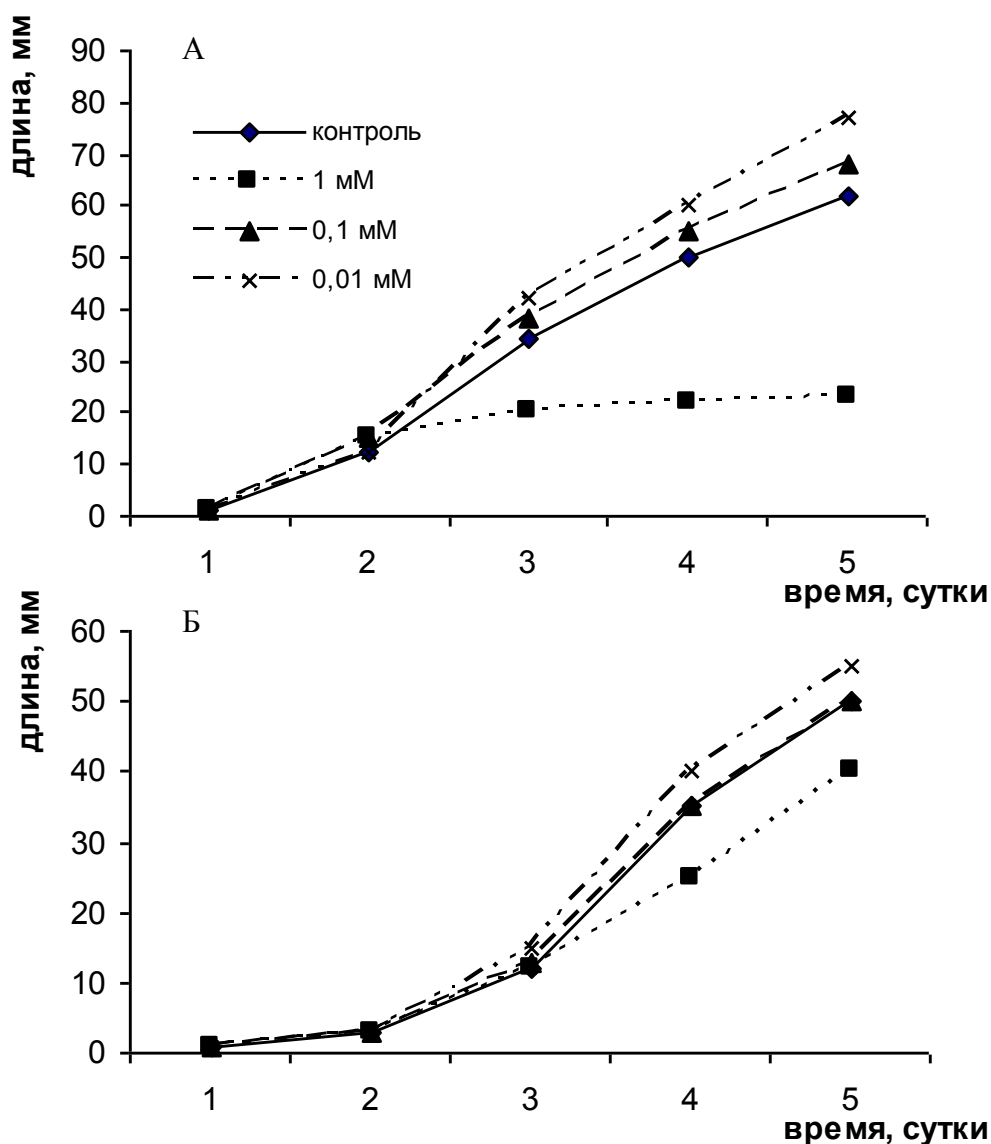


Рис. 1. Влияние 5-азациитидина на развитие проростков *T. aestivum*.
А – корень, Б – coleoptиль

В концентрации 1 мМ азациитидин снижал скорость роста проростков, в большей степени эффект проявлялся на корневой системе. Стимуляция роста корневой системы проростков наблюдалась в интервале концентраций 0,01 – 0,1 мМ, coleoptily при

концентрации 0,01 мМ. Разница в скорости роста (наклон кривой на графике) в этом случае наиболее заметна на третьи-четвертые сутки, в последующем проростки выравниваются в темпах своего развития. Можно предположить, что увеличение скорости роста связано с достижением оптимального уровня гипометилирования, характерного для проростков.

При проведении полевых экспериментов семена обрабатывали 5-азацитидином в концентрации 0,1 мМ. Полученные растения показали увеличение общего веса собранного зерна по сравнению с контролем на $9 \pm 4\%$. При этом средний вес одного зерна вырос на $7 \pm 3\%$. Анализ результатов показал увеличение полевой всхожести обработанных зерен и изменение соотношения колосьев разной длины (Рис. 2).

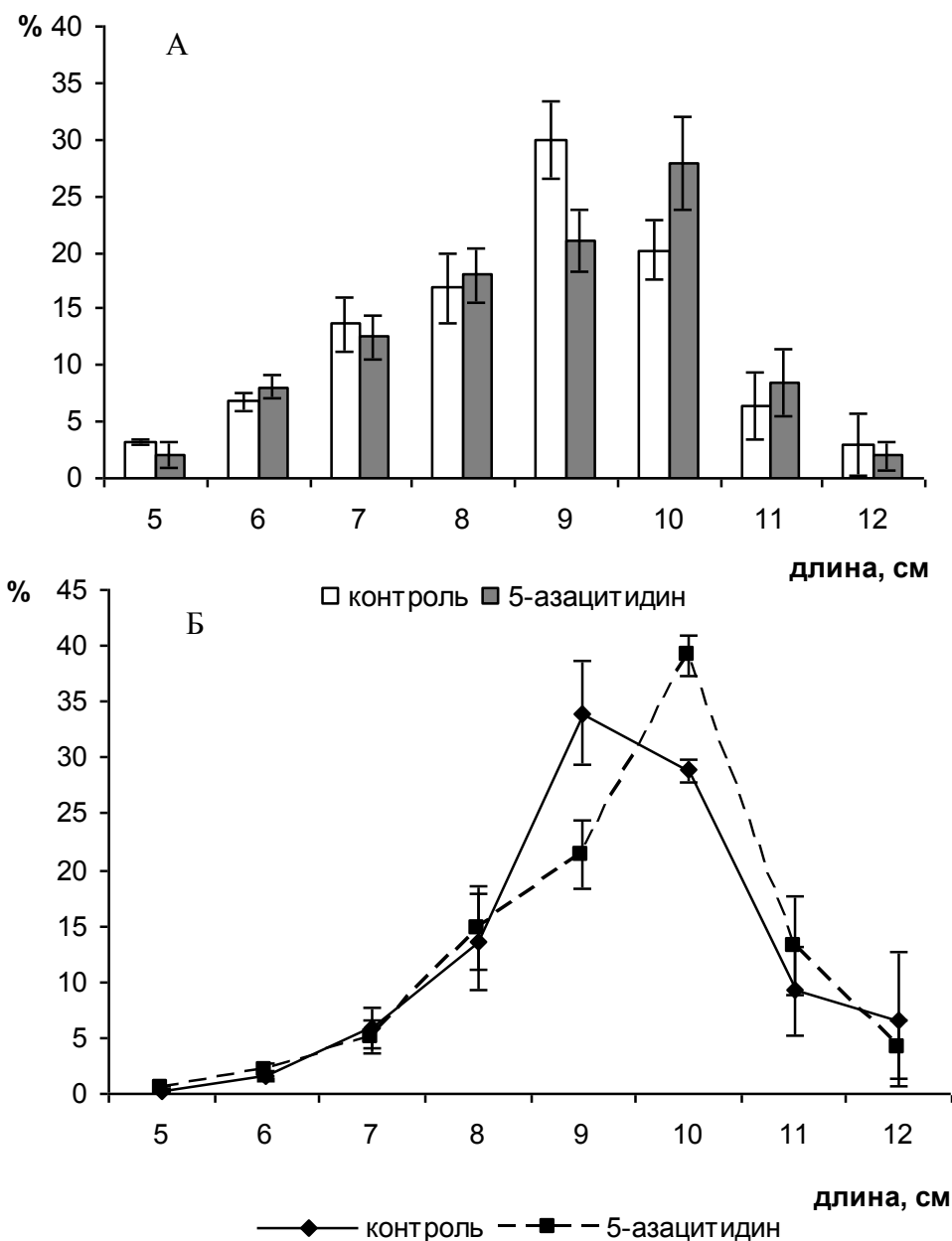


Рис. 2. Частота встречаемости колосьев разной длины в посевах мягкой яровой пшеницы Омская 35 (А) и их вклад в общий вес полученного зерна (Б).

Семена высевали после 15 часов замачивания в дистиллированной воде или растворе 5-азацитидина (0,1 мМ)

Если в контроле с наибольшей частотой встречались колосья длиной 9 см, то среди растений, подвергшихся воздействию азациитидина – колосья длиной 10 см. В результате произошло смещение вклада продуктивности колосьев разной длины в общий вес собранного зерна. Увеличение числа колосьев длиной 10 см отчасти объясняет и рост среднего веса одного зерна, поскольку масса зерна положительно коррелирует с длиной колоса. В тоже время, в наших экспериментах, наблюдался и рост среднего веса одного зерна в колосьях одинаковой длины на 2-10%.

Собранные зерна высевались весной следующего года в лабораторных условиях. Для посева использовали семена с массой 20 и 30 мг. Наследования повышенной скорости роста проростков обнаружено не было, более того, часть проростков из семян, собранных с обработанных растений, отставала в скорости роста, что особенно было заметно при посеве мелких семян (Рис. 3).

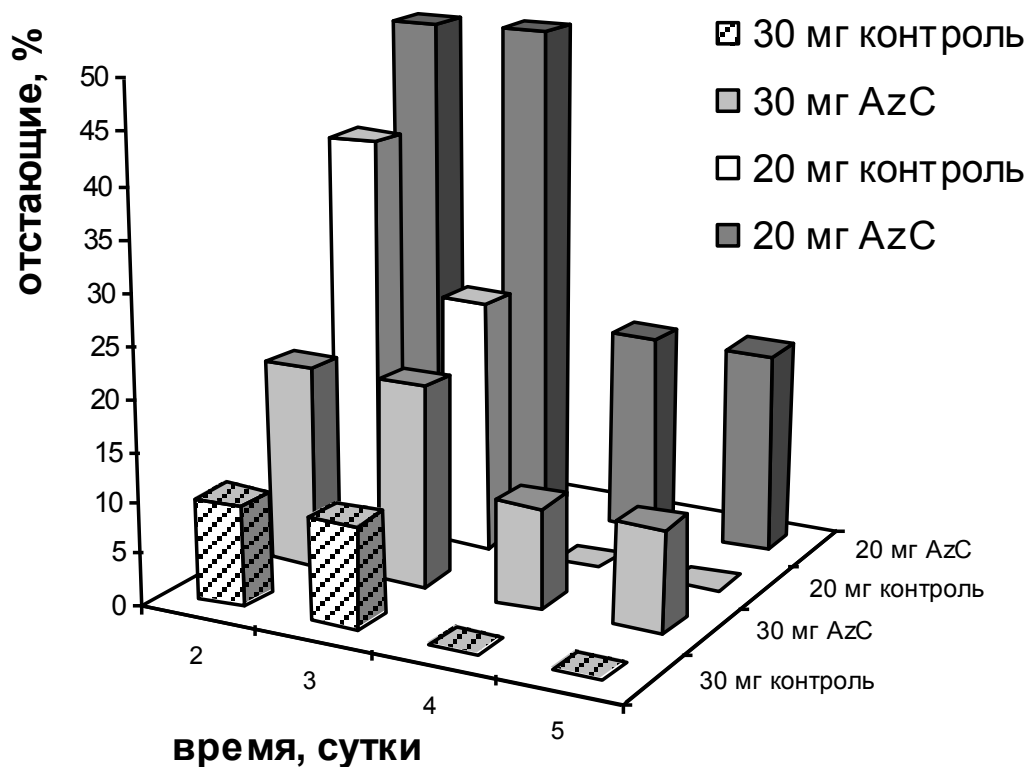


Рис. 3. Количество отстающих в развитии проростков из семян контрольных растений и из семян, собранных с растений, обработанных азациитидином на стадии прорастания. Для каждой группы высевали семена массой 30 и 20 мг.

Среди проростков, как контрольной, так и опытной группы начиная со вторых суток можно выделить две субпопуляции, различающиеся по скорости развития: сильные проростки и проростки с отставанием по совокупной длине корней более чем на 50%. В контрольной группе на четвертые сутки отстающие проростки выравнивались по параметрам с сильными проростками. В противоположность этому в популяции проростков, полученных из семян, обработанных азациитидином растений, субпопуляция отстающих проростков

сохранялась. Данное различие между популяциями было особенно заметно при посеве семян массой 20 мг.

Таким образом, кратковременная обработка семян на стадии набухания 5-азациитидином стимулирует рост зародышевой корневой системы и продуктивность пшеницы. В последующем поколении часть семян с обработанных растений дает ослабленные проростки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванюшин Б. Ф. Эпигенетика сегодня и завтра // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 805-832.
2. Юданова С. С., Малецкая Е. И., Малецкий С. И. Эпигенетическая изменчивость РЦ-СЦ-признака у сростноцветковой линии сахарной свеклы Соан-14 // Генетика. 2012. Т. 48. № 7. С. 827-834.
3. Bartels A., Han Q., Nair P., Stacey L., Gaynier H., Mosley M., Huang Q.Q., Pearson J.K., Hsieh T.F. Xiao W. Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development. // Int J Mol Sci. 2018. V. 19 (7): 2144. DOI: [10.3390/ijms19072144](https://doi.org/10.3390/ijms19072144)
4. Betekhtin A., Milewska-Hendel A., Chajec L., Rojek M., Nowak K., Kwasniewska J., Wolny E., Kurczynska E., Hasterok R. 5-Azacytidine Induces Cell Death in a Tissue Culture of *Brachypodium distachyon*. // Int J Mol Sci. 2018. V. 19 (6): 1806. DOI: [10.3390/ijms19061806](https://doi.org/10.3390/ijms19061806)
5. Bouyer D., Kramdi A., Kassam M., Heese M., Schnittger A., Roudier F., Colot V. DNA methylation dynamics during early plant life. // Genome Biol. 2017. V. 18 (1): 179. DOI: [10.1186/s13059-017-1313-0](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1313-0)
6. Chatterjee N., Gim J., Choi J. Epigenetic profiling to environmental stressors in model and non-model organisms: Ecotoxicology perspective // Environ Health Toxicol. 2018. V. 33 (3): e2018015-0. DOI: [10.5620/eh.t.e2018015](https://doi.org/10.5620/eh.t.e2018015)
7. Espinas N. A, Saze H., Saijo Y.. Epigenetic Control of Defense Signaling and Priming in Plants // Front Plant Sci. 2016. V. 7: 1201. DOI: [10.3389/fpls.2016.01201](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01201)
8. Gallusci Ph., Dai Zh., Génard M., Gauffretau A., Leblanc-Fournier N., Richard-Molard C., Vile D., Brunel-Muguet S. Epigenetics for plant improvement: current knowledge and modeling avenues // Trends in Plant Sciences. 2017. V. 22. P. 610-623. DOI: [10.1016/j.tplants.2017.04.009](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.009)
9. Gardiner L.J., Quinton-Tulloch M., Olohan L., Price J., Hall N., Hall A. A genome-wide survey of DNA methylation in hexaploid wheat // Genome Biol. 2015. V. 16: 273. DOI: [10.1186/s13059-015-0838-3](https://doi.org/10.1186/s13059-015-0838-3)
10. Gardiner L.J., Joynson R., Omony J., Rusholme-Pilcher R., Olohan L., Lang D., Bai C., Hawkesford M., Spannagl M., Mayer K.F.X., Kenny J., Bevan M., Hall N., Hall A. Hidden variation in polyploid wheat drives local adaptation // Genome Res. 2018. V. 28 (9). P. 1319-1332. DOI: [10.1101/gr.233551.117](https://doi.org/10.1101/gr.233551.117)

11. Griffin P.T., Niederhuth C.E., Schmitz R.J. A comparative analysis of 5-azacytidine- and zebularine-induced DNA demethylation // *G3 (Bethesda)*. 2016. V. 6 (9). P. 2773-2780. DOI: [10.1534/g3.116.030262](https://doi.org/10.1534/g3.116.030262)
12. Kawakatsu T., Nery J.R., Castanon R., Ecker J.R. Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination // *Genome Biol.* 2017. V. 18 (1): 171. DOI: [10.1186/s13059-017-1251-x](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1251-x)
13. Lu X., Wang W., Ren W., Chai Z., Guo W., Chen R., Wang L., Zhao J., Lang Z., Fan Y., Zhao J., Zhang C. Genome-Wide Epigenetic Regulation of Gene Transcription in Maize Seeds // *PLoS One*. 2015. V. 10 (10): e0139582. DOI: [10.1371/journal.pone.0139582](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139582)
14. Narsai R., Gouil Q., Secco D., Srivastava A., Karpievitch Y.V., Liew L.C., Lister R., Lewsey M.G., Whelan J. Extensive transcriptomic and epigenomic remodelling occurs during *Arabidopsis thaliana* germination // *Genome Biol.* 2017. V. 18(1): 172. DOI: [10.1186/s13059-017-1302-3](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1302-3)
15. Santi D.V., Norment A., Garrett C.E. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984. V. 81 (22). P. 6993-6997.
16. Xu J., Wang X., Cao H., Xu H., Xu Q., Deng X. Dynamic changes in methylome and transcriptome patterns in response to methyltransferase inhibitor 5-azacytidine treatment in citrus. // *DNA Res.* 2017. V. 24 (5). P. 509-522. DOI: [10.1093/dnares/dsx021](https://doi.org/10.1093/dnares/dsx021)