



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



МИНИОБЗОР

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В ЗАРОДЫШАХ И ПРОРОСТКАХ РАСТЕНИЙ

Ступак Е.Э*, Вафина Г.Х.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

*E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

Рост и развитие растений контролируется сложной системой генетических и эпигенетических сетей. Метилирование ДНК один из эпигенетических механизмов, участвующий в подавлении активности транспозонов, реорганизации хроматина, геномном импринтинге и регуляции экспрессии генов. Модулирование степени метилирования генома наблюдаются в процессе развертывания морфогенетических программ развития и при ответе на внешние воздействия. В данном миниобзоре мы рассматриваем изменение степени и паттерна метилирования на этапе семя-проросток. Затрагиваются вопросы молекулярных механизмов метилирования и его роли в процессах формирования зародыша, прорастания и развития проростка

Ключевые слова: метилирование ДНК ♦ экспрессия генов ♦ хроматин ♦ зародыш ♦ проросток

DNA METHYLATION IN EMBRYOS AND SEEDLINGS OF PLANTS

Stupak E.E. *, Vafina G.Kh.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

*E-mail: evgenia_stupak@mail.ru

A complex system of genetic and epigenetic networks controls growth and development of plants. DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms involved in suppression of transposon activity, chromatin reorganization, genomic imprinting, and regulation of gene expression. Modulation of the degree of genome methylation is observed during the implementation of morphogenetic development programs and in response to external influences. The change in the degree and pattern of methylation at the embryo-seedling stage in this mini-review is considered. The issues of molecular mechanisms of methylation and its role in the processes of embryo formation, germination and seedling development are discussed.

Keywords: DNA methylation ♦ gene expression ♦ chromatin ♦ embryo ♦ seedling

Поступила в редакцию: 22.12.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2021-4-1-1-5](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2021-4-1-1-5)

Метилирование является одним из эпигенетических механизмов, обеспечивающих стабильность генома и регулирующих экспрессию генов [Bartels et al., 2018]. У высших растений метилирование ДНК с образованием 5-метилцитозина (m^5C) происходит преимущественно в динуклеотиде CG, реже в тринуклеотидах CHG и CHH (где H- A, T или C) [Kawakatsu et al., 2017; Ashapkin et al., 2020]. В меньших количествах в ДНК растений присутствует N6-метиладенин (m^6A) [Ванюшин, 2013; Karanthamalai et al., 2020].

Уровень метилирования каждой из последовательностей видоспецифичен. Например, в листьях *Arabidopsis thaliana* (L.) на сайты CG, CHG, CHH приходится 30,5%, 10,0%, 3,9% метилирования соответственно, в то время, как в листьях *Beta vulgaris* (L.) эти сайты прометилированы на 92,6%, 81,2% и 18,9% [Niederhuth et al., 2016]. Частота метилирования данных последовательностей неодинакова и для разных областей генома, так в транскрибируемых областях *Triticum aestivum* (L.) m^5C обнаруживается в 71,4% сайтов CG, 10,5% сайтов CHG и 18,1% сайтов CHH; в нетранскрибируемых – в 46,3% CG, 32,0% CHG и 21,7% CHH [Gardiner et al., 2015].

Метилирование ДНК может регулировать экспрессию генов посредством изменения взаимодействия ДНК с белками, что влияет на скорость транскрипции непосредственно или

в результате изменения конформации хроматина, также регуляция может быть обусловлена расположенными рядом с геном гиперметилированными областями [Vaissière et al., 2008, Wang et al., 2013]. Гены с кодирующей последовательностью метилированной по CG, как правило, конституционно экспрессируются на более высоком уровне, чем неметилированные гены, в то время как метилирование кодирующей последовательности по CHG и CHH приводит к снижению уровня экспрессии [Niederhuth et al., 2016, Rajkumar et al., 2020]. Снижение метилирования перед сайтом начала транскрипции и вокруг сайтов терминации транскрипции наблюдается у активно экспрессирующихся генов [Bartels et al., 2018], у *A. thaliana* к генам с высоким уровнем метилирования промоторной области относятся тканеспецифичные гены [Zhang et al., 2006]. Предполагают, что в случае метилирования промоторной области снижение экспрессии генов происходит в результате нарушения связывания факторов транскрипции [Gardner et al., 2015]. Повторяющиеся последовательности и мобильные генетические элементы (МГЭ) в большинстве растений метилированы [Bräutigam, Cronk, 2018; Wambui Mbichi et al., 2020], также обнаружено, что метилирование принимает участие в подавлении экспрессии при дупликациях генов или всего генома [Keller, Yi, 2014]

Уровень метилирования цитозина определяется взаимодействием следующих процессов: метилирование de novo, поддержание метилирования и деметилирование. За метилирование у растений отвечают цитозин-ДНК-метилтрансферазы, деметилирование может происходить как пассивно при репликации, так и при участии ДНК-гликозилаз [Asharkin et al., 2020; Rajkumar et al., 2020]. Метилирование цитозина de novo в растениях во всех трех контекстах осуществляет цитозин-ДНК-метилтрансфераза DRM2. Стабильность и передачу из поколения в поколение паттерна метилирования CG поддерживают ДНК-метилтрансферазы класса MET1, паттерн метилирования CHG в гетерохроматине обеспечивается преимущественно хромометилазой CMT3, CHH - хромометилазой CMT2, в эухроматине метилирование последовательностей CHG и CHH в большей степени поддерживается РНК-направленным метилированием ДНК (RdDM), при котором метилаза DRM2 направляется малыми интерферирующими РНК (siРНК) [Erdmann, Picard, 2020]. Активное деметилирование цитозина катализируется ДНК-гликозилазами, у *A. thaliana* они представлены гликозилазами DME, ROS1, DML2 и DML3 [Parrilla-Doblas et al., 2019; Kong et al., 2020].

Метилирования является важным регулирующим фактором в онтогенезе растений. Причем метилирование цитозина в разных последовательностях и регионах генома может иметь разное значение для развития растения. Так деметилирование CG при нарушении работы метилазы MET1 приводит к аномальному развитию эмбриона *A. thaliana* [Xiao et al., 2006]. Деметилирование цитозина в последовательностях CHG и CHH не приводит к аномалиям. В тоже время, в ряде работ было показано, что значительная часть важных для развития семян генов расположена в неметилированных областях, кроме того, для большинства генов не наблюдается значимой корреляции между сменой паттерна метилирования/деметилирования и динамикой экспрессии во время развития семян [Lin et al., 2017]. Созревание семян сопровождается ростом метилирования ДНК эмбриона [Bartels et al., 2018; Meng et al., 2012], что обеспечивает конденсацию хроматина и, соответственно, подавление транскрипции генов при созревании семян [Boucher et al., 2017]. Рост степени метилирования обеспечивается ферментативными системами [Kawakatsu et al., 2017] и, как показано для ряда растений, цитозин метилируется в последовательности CHH, в то время как общий уровень m⁵C в CG и CHG не меняется [Bartels et al., 2018; Chakraborty et al., 2020].

Однако, при анализе степени метилирования отдельных генов *Cicer arietinum* (L.) обнаружено, что на поздних стадиях созревания семян для части генов зародыша наблюдается разнонаправленное динамическое изменение степени метилирования CG и CHG [Rajkumar et al., 2020]. Рост частоты метилирования последовательности СНН в процессе развития семян коррелирует с повышением степени метилирования МГЭ [Kawakatsu et. al, 2017; Vouyer et. al, 2017]. Гиперметилирование эмбриона в контексте СНН обеспечивается в большей мере RdDM–метилированием [Erdmann, Picard, 2020]. Предполагают, что это связано с гипометилированием ДНК эндосперма [Lu et. al, 2015; Chakraborty et. al, 2020] с участием ДНК-гликозилаз [Parrilla-Doblas et al., 2019]. Гипометилирование транспозонов в эндосперме приводит к активации продукции siРНК, необходимых для восстановления уровня m⁵C путем RdDM–метилирования, при этом часть siРНК мигрирует в эмбрион, запуская гиперметилирование [Lafon-Placette, 2014; Wambui Mbichi et. al, 2020]. В противоположность этой теории, исследования, проведенные на *Brassica rapa* (L) показали, что гиперметилирование эмбриона автономно и не зависит от siРНК, продуцируемых в эндосперме [Chakraborty et. al, 2020]. Длительное хранение семян приводит к изменению уровня и профиля метилирования, предположительно в результате действия активных форм кислорода [Kurek et. al, 2019; Pirredda et. al, 2020].

Проращение семян сопровождается пассивным гипометилированием, не зависящим от гликозилаз, одновременно наблюдается деконденсация хроматина [Bartels et al., 2018; Kawakatsu et. al, 2017]. Анализ динамики деметилирования ДНК при проращении показал, что содержание m⁵C в ДНК *A. thaliana* снижается с 7,65% у эмбриона до 4,48% у двухдневных проростков, с последующим восстановлением до 5,6% у четырехдневных [Vouyer et. al, 2017]. Показано, что у *A. thaliana* сильнее всего гипометилируются последовательности СНН [Vouyer et. al, 2017]. Нарушения в проращении семян коррелирует с сохранением высокой степени метилирования этой последовательности [Koch 2017]. Предполагают, что гипометилирование связано с активным делением клеток на фоне более низкого, по сравнению с созреванием семян, уровня RdDM-метилирования [Narsai et. al, 2017]. С другой стороны релаксация хроматина, вызванная деметилированием приводит к появлению новых сайтов связывания транскрипционных факторов, которые в свою очередь могут экранировать ДНК от компонентов системы RdDM-метилирования [Narsai et. al, 2017; Héberlé, Bardet 2019]. Несмотря на преобладание процессов деметилирования, при проращении происходит и метилирование de novo, для пшеницы эти события соотносятся как 3 к 1 [Meng et. al, 2012]. Условия и длительность хранения семян влияют на степень метилирования полученных из них проростков. Для *Pyrus communis* L. было показано, что проростки из сильно высушенных семян отличаются пониженной степенью метилирования, в то время, как в самих семенах степень метилирования в этом случае повышалась [Michalak et. al, 2013]. Также изменения в профиле метилирования цитозина наблюдались в проростках полученных из старых семян *Mentha aquatica* L. *Secale cereale* L. [Mira et. al, 2020; Pirredda et. al, 2020]. Клеточное деление и дифференцировка клеток развивающихся проростков сопровождается изменением метилирования ДНК. Изучение метилирования ДНК в клетках корней проростков *A. thaliana* выявило, что разные клетки корня отличаются по содержанию m⁵C, причем, профили транскрипции больше зависели от ткани, а паттерны метилирования ДНК от пространственного расположения клеток [Kawakatsu et. al, 2016]. Самым высоким уровнем метилирования обладали клетки колумеллы, в основном за счет последовательности СНН. Переход клеток листа проростка *Zea mays* (L.) от деления к росту растяжением и дифференцировке также сопровождался изменением паттерна метилирования, причем

большая часть дифференциально метилированных последовательностей были связаны с 3' и 5' концевыми областями кодирующих последовательностей [Candaele et. al, 2014].

Несмотря на то, что корреляция между паттерном экспрессии генов и паттерном метилирования/деметиления кодирующих последовательностей в процессе прохождения онтогенетических программ, а также программ дифференцировки клеток, в настоящее время далеко не всегда очевидна, известно, что метилирование влияет на экспрессию отдельных генов и меняется в процессе развития растения. Динамическое изменение паттерна метилирования ДНК начинается с момента выхода зародыша из состояния покоя и, вероятно, является одним из механизмов глобальной системы регуляции, обеспечивающей координированное развитие проростка.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме АААА-А18-118022190104-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17 (4/2). С. 805-832.
2. Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Aleksandrushkina N.I. et al. Epigenetic mechanisms of plant adaptation to biotic and abiotic stresses // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21 (20). Article 7457. DOI: [10.3390/ijms21207457](https://doi.org/10.3390/ijms21207457)
3. Bartels A., Han Q., Nair P. et al. Dynamic DNA methylation in plant growth and development // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19 (7). Article 2144. DOI: [10.3390/ijms19072144](https://doi.org/10.3390/ijms19072144)
4. Bräutigam K., Cronk Q. DNA methylation and the evolution of developmental complexity in plants // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. Article 1447. DOI: [10.3389/fpls.2018.01447](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01447)
5. Bouyer D., Kramdi A., Kassam M. et al. DNA methylation dynamics during early plant life // Genome Biol. 2017. V. 18. Article 179. DOI: [10.1186/s13059-017-1313-0](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1313-0)
6. Candaele J., Demuynck K., Mosoti D., et al. Differential methylation during maize leaf growth targets developmentally regulated genes // Plant Physiol. 2014. V. 164 (3). P. 1350-1364. DOI: [10.1104/pp.113.233312](https://doi.org/10.1104/pp.113.233312)
7. Chakraborty T., Kendall T., Grover J. W. et al. Embryo CHH hypermethylation is mediated by RdDM and is autonomously directed in *Brassica rapa* // bioRxiv. 2020. 08.26.268573. DOI: [10.1101/2020.08.26.268573](https://doi.org/10.1101/2020.08.26.268573)
8. Erdmann R.M., Picard C.L. RNA-directed DNA methylation // PLoS Genet. 2020. V. 16. Article e1009034. DOI: [10.1371/journal.pgen.1009034](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009034)
9. Gardiner L.J., Quinton-Tulloch M., Olohan L. et al. A genome-wide survey of DNA methylation in hexaploid wheat // Genome Biol. 2015. V. 16. Article 273. DOI: [10.1186/s13059-015-0838-3](https://doi.org/10.1186/s13059-015-0838-3)
10. Héberlé É., Bardet A.F. Sensitivity of transcription factors to DNA methylation // Essays Biochem. 2019. V.63 (6). P. 727-741. DOI: [10.1042/EBC20190033](https://doi.org/10.1042/EBC20190033)
11. Karanthamalai J., Chodon A., Chauhan S. et al. DNA N6-Methyladenine modification in plant genomes-A glimpse into emerging epigenetic code // Plants (Basel). 2020. V. 9 (2). Article 247. DOI: [10.3390/plants9020247](https://doi.org/10.3390/plants9020247)
12. Kawakatsu T, Nery J.R., Castanon R, et al. Dynamic DNA methylation reconfiguration during seed development and germination // Genome Biol. 2017. V. 18 (1). Article 171. DOI: [10.1186/s13059-017-1251-x](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1251-x)
13. Kawakatsu T., Stuart T., Valdes M. et al. Unique cell-type-specific patterns of DNA methylation in the root meristem // Nat. Plants. 2016. 2:16058. DOI: [10.1038/nplants.2016.58](https://doi.org/10.1038/nplants.2016.58)
14. Keller T.E., Yi S.V. DNA methylation and evolution of duplicate genes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014. V. 111 (16). P.5932-5937. DOI: [10.1073/pnas.1321420111](https://doi.org/10.1073/pnas.1321420111)
15. Koch L. Epigenome dynamics from seed to seedling // Nat. Rev. Genet. 2017. V. 18. Article 637. DOI: [10.1038/nrg.2017.78](https://doi.org/10.1038/nrg.2017.78)

16. Kong W., Xia X., Wang Q. et al. Impact of DNA demethylases on the DNA methylation and transcription of arabidopsis NLR genes // *Front. Genet.* 2020. V. 11. Article 460. DOI: [10.3389/fgene.2020.00460](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00460)
17. Kurek K., Plitta-Michalak B., Ratajczak E. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process // *Plants (Basel)*. 2019. V. 8 (6). Article 174. DOI: [10.3390/plants8060174](https://doi.org/10.3390/plants8060174)
18. Lafon-Placette C., Kohler C. Embryo and endosperm, partners in seed development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2014. V.17. P. 64-69. DOI: [10.1016/j.pbi.2013.11.008](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.008)
19. Lin J.Y., Le B.H., Chen M. et al. Similarity between soybean and Arabidopsis seed methylomes and loss of non-CG methylation does not affect seed development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V.114 (45). P. E9730-E9739. DOI: [10.1073/pnas.1716758114](https://doi.org/10.1073/pnas.1716758114)
20. Lu X., Chen D., Shu D. et al. The Differential transcription network between embryo and endosperm in the early developing maize seed // *Plant Physiology.* 2013. V. 162 (1). P. 440-445. DOI: [10.1104/pp.113.214874](https://doi.org/10.1104/pp.113.214874)
21. Meng F.R., Li Y.C., Yin J. et al. Analysis of DNA methylation during the germination of wheat seeds // *Biologia plantarum.* 2012. V. 56 (2). P. 269-75. DOI: [10.1007/s10535-012-0086-2](https://doi.org/10.1007/s10535-012-0086-2)
22. Michalak M., Barciszewska M.Z., Barciszewski J. et al. Global changes in DNA methylation in seeds and seedlings of *Pyrus communis* after seed desiccation and storage // *PLoS One.* 2013. V. 8 (8). Article E70693. DOI: [10.1371/journal.pone.0070693](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070693)
23. Mira S., Pirredda M., Martín-Sánchez M. et al. DNA methylation and integrity in aged seeds and regenerated plants // *Seed Science Research.* 2020. V. 30 (2). P. 92-100. DOI: [10.1017/S0960258520000021](https://doi.org/10.1017/S0960258520000021)
24. Narsai R., Gouil Q, Secco D. et al. Extensive transcriptomic and epigenomic remodelling occurs during *Arabidopsis thaliana* germination // *Genome Biol.* 2017. V. 18 (1). Article 172. DOI: [10.1186/s13059-017-1302-3](https://doi.org/10.1186/s13059-017-1302-3)
25. Niederhuth C.E., Bewick A.J., Ji L. et al. Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms // *Genome Biol.* 2016. V. 17. Article 194. DOI: [10.1186/s13059-016-1059-0](https://doi.org/10.1186/s13059-016-1059-0)
26. Parrilla-Doblas J.T., Roldán-Arjona T., Ariza R.R. et al. Active DNA demethylation in plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20 (19). Article 4683. DOI: [10.3390/ijms20194683](https://doi.org/10.3390/ijms20194683)
27. Pirredda M., González-Benito M.E., Martín C. et al. Genetic and epigenetic stability in rye seeds under different storage conditions: ageing and oxygen effect // *Plants (Basel)*. 2020. V. 9 (3). Article 393. DOI: [10.3390/plants9030393](https://doi.org/10.3390/plants9030393)
28. Rajkumar M.S., Gupta K., Khemka N.K. et al. DNA methylation reprogramming during seed development and its functional relevance in seed size/weight determination in chickpea // *Commun. Biol.* 2020. V. 3. Article 340. DOI: [10.1038/s42003-020-1059-1](https://doi.org/10.1038/s42003-020-1059-1)
29. Vaissière T., Sawan C., Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing // *Mutat. Res.* 2008. V. 659 (1-2). Article 40-8. DOI: [10.1016/j.mrrev.2008.02.004](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.02.004)
30. Wambui Mbichi R., Wang Q.F., Wan T. RNA directed DNA methylation and seed plant genome evolution // *Plant Cell Rep.* 2020. V.39 (8). P. 983-996. DOI: [10.1007/s00299-020-02558-4](https://doi.org/10.1007/s00299-020-02558-4)
31. Wang X., Weigel D., Smith L.M. Transposon variants and their effects on gene expression in Arabidopsis // *PLoS Genet.* 2013. V. 9 (2). Article E1003255. DOI: [10.1371/journal.pgen.1003255](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003255)
32. Xiao W., Custard K.D., Brown R.C. et al. DNA methylation is critical for Arabidopsis embryogenesis and seed viability // *Plant Cell.* 2006. V. 18. P. 805–814. DOI: [10.1105/tpc.105.038836](https://doi.org/10.1105/tpc.105.038836)
33. Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A. et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in Arabidopsis // *Cell.* 2006. V.126 (6). P. 1189-1201. DOI: [10.1016/j.cell.2006.08.003](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.003)