

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ *FLC* И *VIN3* В ПРОЦЕССЕ ЯРОВИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ *Arabidopsis thaliana* СЕВЕРНЫХ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

© 2019 г. О. М. Федоренко¹, *, Л. В. Топчиева¹, М. В. Зарецкая¹, О. Н. Лебедева¹

¹Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Петрозаводск, 185910 Россия

*e-mail: fedorenko_om@mail.ru

Поступила в редакцию 14.11.2018 г.

После доработки 06.12.2018 г.

Принята к публикации 11.02.2019 г.

Выявлены особенности экспрессии генов *FLC* и *VIN3*, играющих ведущую роль в яровизационно-опосредованном переходе к цветению у растений *A. thaliana* северных природных популяций (Карелия). Отмечены различия в динамике транскрипционной активности *FLC* и *VIN3* при яровизации для популяций, представленных поздноцветущими формами, с одной стороны, и смешанной по времени зацветания растений популяции, с другой. Установлен низкий уровень экспрессии *FLC* и *VIN3* у растений исследованных популяций до холодного воздействия. В процессе яровизации происходит увеличение уровня транскриптов мРНК *FLC* на 10-й и 20-й день с последующим снижением его к 30-му дню. Длительное воздействие холода вызывает усиление экспрессии *VIN3* с пиком в популяциях, представленных поздноцветущими формами растений, на 30-й день яровизации, а в смешанной по времени зацветания растений популяции – на 40-й день. Особенным образом представлена динамика экспрессии генов *FLC* и *VIN3* в процессе яровизации у S1 потомства одного раннецветущего растения, при этом экспрессия *FLC* у него изменяется согласно классическим представлениям: первоначально высокий уровень транскриптов *FLC* в процессе яровизации снижается. Предполагается, что генетические и эпигенетические механизмы, участвующие в контроле темпов зацветания, и гены, вовлеченные в этот процесс, могут различаться у растений популяций разных географических регионов.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, природные популяции, время начала цветения, яровизация, экспрессия генов *FLC* и *VIN3*, эпигенетические механизмы.

DOI: 10.1134/S0016675819060031

Переход от вегетативной к репродуктивной фазе является наиболее важным событием в жизненном цикле растения, и оно должно происходить строго в определенное время, чтобы обеспечить максимальный репродуктивный успех. Таким образом, время начала цветения – это адаптивно значимый признак для растений. У *Arabidopsis thaliana* – классического модельного объекта переход к цветению контролируется несколькими генетическими путями, включая автономный путь, фотопериодический, яровизационный и путь с участием гиббереллиновой кислоты [1]. В результате формируется регуляторная сеть, которая интегрирует эндогенное состояние развития растения с сигналами окружающей среды (длительной дня, температурой и т.д.), чтобы строго контролировать время перехода к цветению [2].

Ключевым компонентом в этой регуляторной цепи у арабидопсиса является ген *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) – центральный ингибитор инициации цветения у *A. thaliana*, кодирующий MADS-домен-содержащий фактор транскрипции [3, 4].

Экспрессия *FLC* контролируется различными активаторами и репрессорами. Автономный путь, включающий гены *FVE*, *FCA* (*FLOWERING CONTROL LOCUS A*) и *FLD* (*FLOWERING LOCUS D*), конститутивно контролирует подавление экспрессии *FLC* для стимуляции цветения [5, 6]. Ген *FRI* (*FRIGIDA*) кодирует белок FRI, являющийся основным активатором *FLC* [7]. Мутации в гене *FRI*, вызывающие потерю или снижение функции, широко распространены и отвечают за большую часть вариаций по времени начала цветения среди природных популяций арабидопсиса [8–10]. Эффект активации *FLC* под действием FRI доминирует над супрессирующим эффектом генов-регуляторов автономного пути, однако может быть преодолен влиянием низких температур (яровизацией) [4].

В природе растения арабидопсиса представлены озимыми и яровыми формами, отличия которых определяются аллелями генов *FRI* и *FLC*. Для озимых растений характерны доминантные аллели, в то время как у яровых форм присутствуют

нефункциональный аллель *fri* и/или слабый аллель *flc* [7]. Переход к цветению озимых форм арабидопсиса начинается при низком уровне экспрессии *FLC*, снижение которого наблюдается во время яровизации [3, 11]. Под воздействием холода запускаются механизмы эпигенетического контроля, переводящие ген *FLC* в репрессивное состояние [12]. Холодовой стресс индуцирует экспрессию гена *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) [13], кодирующего транскрипционный фактор. *VIN3* относится к группе PHD (Plant Homeo Domain finger) и отвечает за сайт-специфическое связывание с хроматином [14, 15]. *VIN3* необходим для запуска молекулярных механизмов модификации хроматина *FLC* [16, 17]. Пролонгированное воздействие холода приводит к усилению экспрессии *VIN3*, при этом транскрипционный фактор *VIN3* связывается с эволюционно-консервативным мультибелковым комплексом PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) [18]. Этот комплекс способен блокировать транскрипцию генов-мишеней путем метилирования гистонов и формирования плотной структуры хроматина. PRC2 опосредует метилирование гистона H3 по Lys²⁷ (H3K27me3) через его коровый компонент – гистонметилтрансферазу [19]. Исследования Jiang с коллегами [20] показали, что PRC2 у *A. thaliana*, включающий белки CLF, EMF2 и FIE, принимает участие в репрессии генной экспрессии *FLC*. В частности, CLF, кодируемый геном *CLF* (*CURLY LEAF*), имеет домен SET и, как все подобные белки, обладает H3K27 метилтрансферазной активностью (т.е. образует НКМТs – гистоновые метки метилтрансферазы). Таким образом, в процессе яровизации увеличивается уровень метилированных гистонов H3 Lys(27) хроматина *FLC* [16]. Эти гистоновые метки (H3K27me3) ассоциируются с транскрипционно “молчащим” состоянием гена [21]. Согласно *FLC–VIN3* – регуляторной модели [22], предложенной в последнее время, именно эти два гена играют ведущую роль в яровизационно-опосредованном переходе к цветению. К тому же предполагается, что *FLC*- и *VIN3*-семейства генов совместно эволюционировали [23].

Эпигенетический механизм перехода к цветению под воздействием низких температур раскрыт на лабораторных линиях *A. thaliana* [21], которые в большинстве своем являются раннецветущими. Однако природные популяции в этом отношении до сих пор не изучены. Карельские популяции *A. thaliana* представлены в основном поздноцветущими формами [24]. Известно, что самые поздние экотипы арабидопсиса произрастают в самых северных странах [25]. Вероятно, такие растения имеют селективное преимущество в условиях короткого и холодного лета. Однако в некоторых карельских популяциях встречаются и раннецветущие (яровые) формы этого вида, к тому же сроки начала цветения растений в популя-

циях существенно варьируют [24, 26]. Нами было показано с помощью анализа нуклеотидной последовательности генов *FRI* и *FLC*, что раннее цветение растений в карельских популяциях арабидопсиса не связано с мутациями, характерными для раннецветущих линий *Col* и *Ler* [26].

Поскольку по данным литературы переход к цветению у *A. thaliana* регулируется посредством репрессии и активации экспрессии генов *VIN3* и *FLC*, мы предположили, что разнообразие признака “время начала цветения” в карельских популяциях данного вида может быть обусловлено особенностями транскрипционной активности этих генов. Для проверки данного предположения нами была проведена оценка уровня мРНК генов *FLC* и *VIN3* у растений северных природных популяций *A. thaliana* до холодного воздействия и в процессе яровизации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования 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 отдельную группу выделены потомки (или S1-поколение) одного раннецветущего растения из популяции Царевичи.

Выращивание растений в лабораторных условиях

Выращивание растений в лабораторных условиях проводили по общепринятым методикам культивирования арабидопсиса [27]. Семена, собранные во время экспедиции 2015 г., высевали в чашки Петри и прорастивали на простой среде по Гихнеру–Велеминскому, которая готовилась на основе 8%-ного агар-агара с добавлением растворов макроэлементов (KNO₃, MgSO₄ · 7H₂O, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, K₂HPO₄), FeSO₄ · 7H₂O, ЭДТА (натриевая соль) и микроэлементов. Для яровизации чашки Петри с семенами переносили на холод (2–4°C) на 10, 20, 30 или 40 дней. Чашки Петри с неяровизированными семенами и после яровизации переносили на свет и выращивали при температуре 23–25°C и круглосуточном освещении (10000 лк) под люминесцентными лампами. Листья 10–11-дневных растений использовали в анализе. Для определения времени начала цветения молодые растения пересаживали из чашек Петри в почву (смесь земли и песка 1 : 1).

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. Депротенинизацию проводили с помощью хлороформа. 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). Содержание мРНК генов *FLC* и *VIN3* оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с интеркалирующим красителем SYBR Green на приборе iCycler iQ5 (Bio-Rad) с набором для ПЦР-РВ (Евроген). Для определения уровня экспрессии генов каждую ПЦР проводили 3 раза, на трех независимых образцах кДНК. Последовательности праймеров для анализа экспрессии: *FLC* F: 5'-GCCAAGAAGACCGAAGCTCATGTTGA-3', R: 5'-CAACCGCCGATTTAAGGTGGCTA-3'; *VIN3* F: 5'-AGAAGCTGTGTTCTCAGGCAATGG-3', R: 5'-TCTTCGTCCTTCGACTTTCGACAAA-3'. Анализ относительного содержания транскриптов проводили с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [28], основанного на нормализации данных по экспрессии относительно двух референсных генов. В качестве референсных использованы гены *18sRNA* и *UBQ10* [29]. Последовательности праймеров референсных генов: *18sRNA* F: 5'-TGCCCGTTGCTCTGATGA-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

Изучение времени начала цветения и реакции на яровизацию растений карельских популяций *A. thaliana*

В предыдущем нашем исследовании [24] показано, что растения *A. thaliana* в популяциях Кончезеро и Шуйская являются поздноцветущими,

зацветающими без предварительной холодной обработки через 4–6 мес. Популяция Царевичи оказалась полиморфной по этому признаку: в ее состав входят как раннецветущие, так и поздноцветущие формы растений.

В настоящей работе оценка влияния яровизации на время начала цветения растений карельских популяций показала, что увеличение длительности холодового воздействия приводит к сокращению доли поздно зацветающих растений. При этом реакция на яровизацию различной продолжительности у растений отдельных популяций оказалась неодинаковой (рис. 1). Так, слабый ответ на холодовое воздействие проявили растения из популяции Шуйская: 14- и 30-дневная яровизация не привела к сокращению периода до начала цветения у 75–78% растений. Время до начала цветения при 40-дневной яровизации у растений этой популяции сократилось до 35–75 дней. Растения из популяции Царевичи активно реагировали на яровизацию: даже непродолжительное холодовое воздействие (14 дней) сократило долю поздноцветущих растений до 14%, а при 40-дневной яровизации все растения зацвели на 20–35-й день. Реакция на яровизацию растений из популяции Кончезеро оказалась промежуточной: время начала цветения при максимально длительной яровизации сократилось до 35–60 дней. Выявленный неодинаковый ответ на яровизацию растений отдельных популяций может, по-видимому, свидетельствовать о различиях в эпигенетических процессах и/или полиморфизме по генам, контролирующим потребность в яровизации, – *VIN3*, *VRN1*, *VRN2*. В частности, на зерновых культурах показано увеличение активирующих гистонов H3K9me3 и снижение репрессирующих меток H3K27me3 в хроматине *VRN1* в течение яровизации [30]. Как полагают Banerjee и Roychoudhury [31], такие вариации в статусе H3K9-метиляции свидетельствуют о яровизационной памяти растений.

Анализ экспрессии генов, контролирующих эпигенетический механизм перехода к цветению в карельских популяциях *A. thaliana*

Анализ экспрессии генов *FLC* и *VIN3* проводили на неяровизированных растениях и растениях после холодового воздействия разной продолжительности: 10, 20, 30 и 40 дней. Уровень транскриптов мРНК *FLC* у растений изученных популяций оказался низким в оптимальных условиях до холодового воздействия (рис. 2). Это отличается от данных литературы, которые были получены на линиях и других экотипах арабидопсиса [3, 11, 12, 21, 32].

Как было продемонстрировано Neo и Sung [21], первоначально высокий уровень транскриптов *FLC* в процессе яровизации снижается за счет модификации хроматина. Авторы установили,

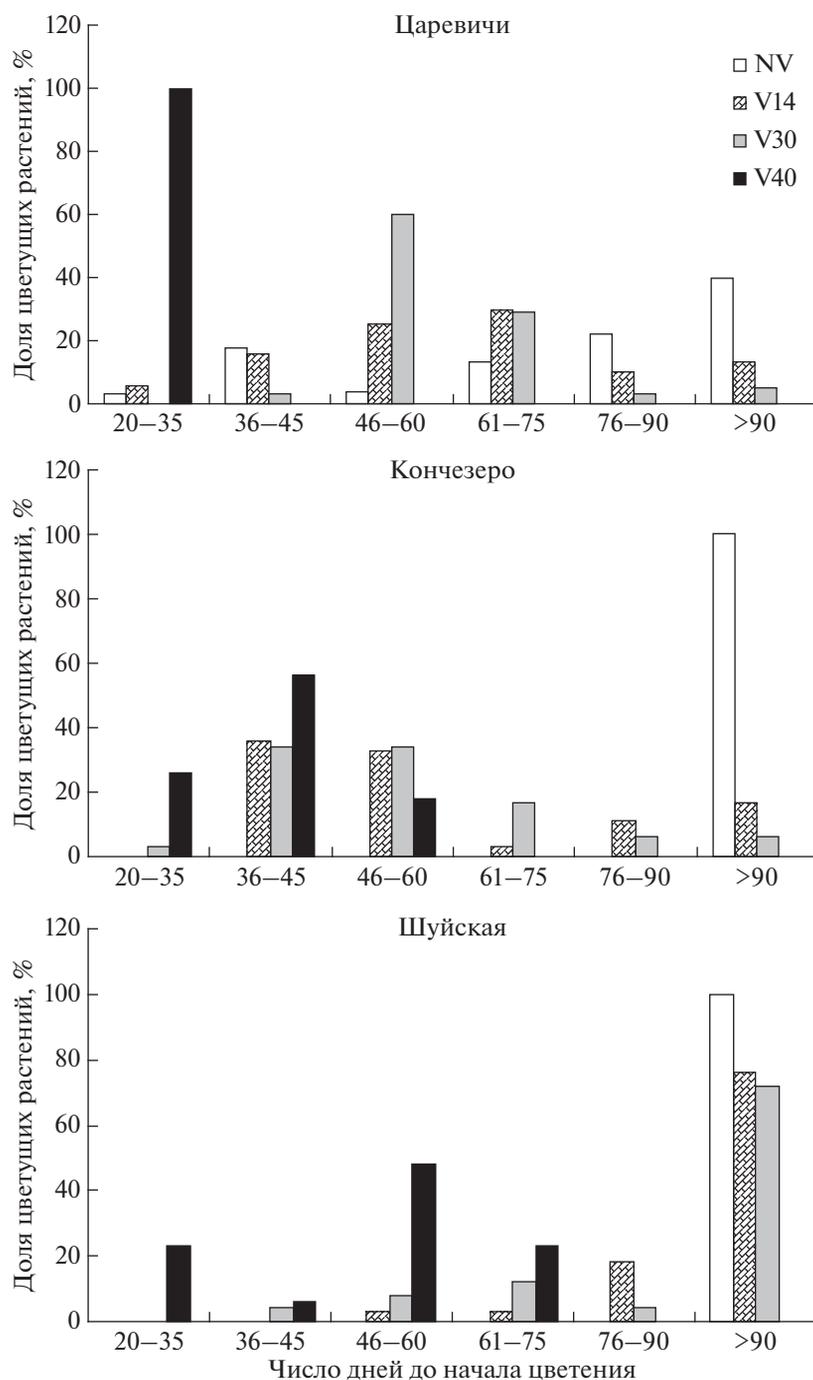


Рис. 1. Влияние длительности яровизации на время начала цветения растений *A. thaliana* карельских популяций. NV – без яровизации; V14, V30, V40 – длительность яровизации в сутках.

что в метилировании гистонов хроматина *FLC* участвуют длинные интронные некодирующие РНК (long intronic non-coding RNA, lincRNA), которые транскрибируются с самого локуса *FLC*. Количество их увеличивается в ответ на холодовое воздействие. При этом в ранней фазе действия низких температур транскрибируется COOLAIR (COOL ASSISTED INTRONIC NONCODING

RNA), закодированный в 3'-некодируемой области на антисмысловой цепи гена, а в поздней фазе – COLDAIR (COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA) – транскрипт, закодированный на смысловой цепи в первом интроне *FLC*. COLDAIR выполняет свою роль, физически связываясь с PRC2 через взаимодействие с CLF, и перемещает этот комплекс вместе с гистоновыми

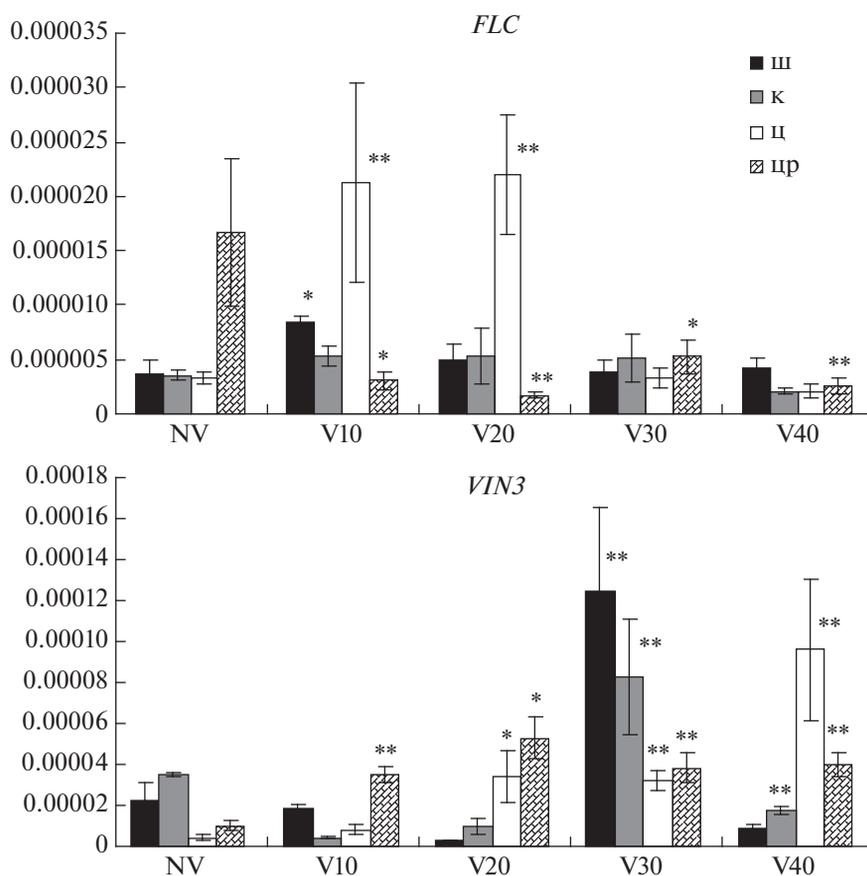


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов *FLC* и *VIN3*. По оси *X* – продолжительность яровизации: NV – без яровизации; V10, V20, V30, V40 – длительность яровизации в сутках; по оси *Y* – уровень транскриптов генов в отн. ед. Растения из популяций: ш – Шуйская, к – Кончезеро, ц – Царевичи, цр – потомство раннецветущего растения из популяции Царевичи. Значимость различий неяровизированных растений (NV) с яровизированными: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$.

репрессивными метками (H3K27me3) в *FLC*-хроматин (рис. 3).

Низкий уровень транскриптов мРНК *FLC* у растений карельских популяций может быть связан с чрезмерной активностью генов-регуляторов автономного пути, оказывающих супрессирующий эффект на экспрессию *FLC* – *FCA*, *FY*, *PCFS4* [33]; *REF6* [34]; *FLD*, *FVE* [6]. Далее, как показано в настоящем исследовании, неожиданно происходит подъем транскрипционного уровня *FLC* на 10-й и 20-й день яровизации в популяциях Шуйская и Царевичи. Причины этого явления неясны. Возможно, такой неожиданный подъем связан с генетическими особенностями поздноцветущих растений карельских популяций. При этом у растений смешанной по времени цветения популяции Царевичи отмеченный подъем значительно по сравнению с растениями из популяции поздно зацветающих растений – Шуйская. Далее при продолжении холодового воздействия преодолевается эффект активации *FLC* под действием *FRI*, и изменение транскрипционного уровня *FLC*

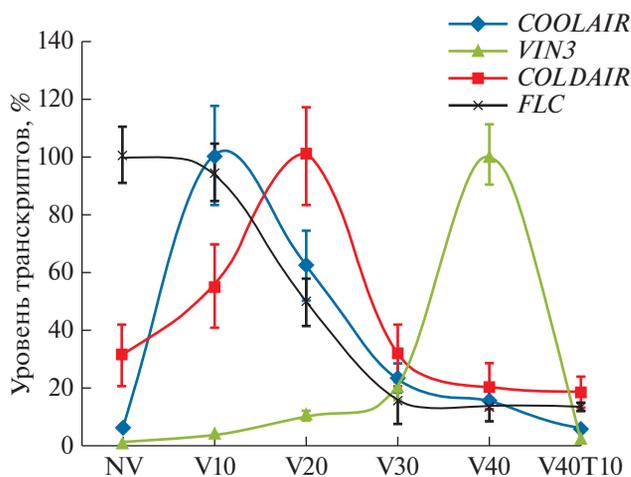


Рис. 3. Изменение уровня транскриптов генов (*FLC*, *VIN3*) и lincRNAs (*COOLAIR*, *COLDAIR*) в процессе яровизации. По оси *X* – условия выращивания растений: NV – без яровизации, V10 – 10 дней яровизации, V20 – 20 дней, V30 – 30 дней, V40 – 40 дней, V40 T10 – 10 дней в обычных условиях после 40 дней яровизации (цит. по [21]).

идет согласно представлениям Нео и Sung [21], т.е. он снижается к 30-му дню яровизации. В популяции Кончезеро достоверных различий в изменении уровня экспрессии *FLC* в процессе яровизации не выявлено. В отличие от популяций в группе растений S1 транскрипционный уровень *FLC* до яровизации оказался намного выше. Затем, как видно на рис. 2, в процессе яровизации он снижается. Таким образом, динамика экспрессии *FLC* в процессе яровизации растений S1 не противоречит классическим представлениям [3, 11, 12, 21, 32].

Анализ уровня экспрессии *VIN3* показал, что у всех неяровизированных растений он оказался низким (рис. 2). Далее в процессе холодового воздействия наблюдается достоверный рост уровня транскриптов мРНК *VIN3*. Полученные данные подтверждают вывод Sung и Amasino [13] о том, что холодовой стресс индуцирует экспрессию *VIN3* – инициатора процесса яровизации, а пролонгированное воздействие холода приводит к усилению его экспрессии. Нео и Sung [21] показали, что только после 40-дневной яровизации экспрессия *VIN3* достигает своего пика, и *FLC*-хроматин становится максимально метилированным. Это приводит, в конечном счете, к необратимой митотически стабильной репрессии *FLC* (рис. 3) и инициации цветения. Однако в отличие от данных, полученных Нео и Sung [21], в популяциях поздноцветущих растений (Шуйская и Кончезеро) пик экспрессии *VIN3* приходится на 30-й день яровизации, а в смешанной по времени зацветания популяции (Царевичи) согласно литературным данным [21] – на 40-й день. Динамика экспрессии *VIN3* у S1 растений оказалась отличной от таковой у растений изученных популяций: небольшое достоверное повышение содержания мРНК происходит на 10-й день яровизации и далее, в процессе яровизации, оно сохраняется приблизительно на одном уровне, без существенного повышения. Возможно, такая особенность экспрессии *VIN3* у этих растений является следствием каких-то нарушений или особенностей функций гена. Тем не менее *VIN3* является членом небольшого семейства генов *VIL* (*VIN3-LIKE*) и, как полагают Turck и Coupland [35], другие члены этого семейства могут компенсировать отсутствие или снижение функции *VIN3* на ранних стадиях яровизации.

Полученные нами результаты могут свидетельствовать о своеобразии генетических процессов и эпигенетических механизмов, участвующих в регуляции темпов зацветания поздноцветущих форм растений *A. thaliana* из северных природных популяций. Данное заключение подтверждается результатами недавних исследований, показавших, что для некоторых экотипов *A. thaliana* северных широт 40 дней яровизации недостаточно и требуется более длительная (12 нед.) яровиза-

ция [36, 37]. Так, Duncan с коллегами [37] изучали популяции *A. thaliana*, находящиеся в Северной Швеции, приблизительно в тех же широтах, что и карельские популяции (самые северные популяции ~62°30' N). Они показали, что у поздноцветущего образца Lov-1 эпигенетическое замолкание экспрессии *FLC* с помощью накопления триметилированных гистонов H3K27me3 идет более медленно по сравнению с линией Col FRI^{sr2}. Шестинедельная яровизация (42 дня) не приводит к стабильной репрессии *FLC*-экспрессии и после 10 дней роста при 22°C уровень экспрессии гена повышается. Авторы объясняют этот факт процессами реактивации *FLC* в условиях оптимальной температуры.

Таким образом, в настоящем исследовании нами показаны различия карельских популяций *A. thaliana* по времени начала цветения и реакции на яровизацию входящих в их состав растений. Согласно предложенной в последнее время модели [22] о ведущей роли генов *FLC* и *VIN3* в яровизационно-опосредованном переходе к цветению, нами было оценено содержание транскриптов мРНК этих генов у растений разных популяций до холодового воздействия и в процессе яровизации. Отмечены различия в динамике транскрипционной активности *FLC* и *VIN3* для популяций, представленных поздноцветущими формами, с одной стороны, и популяции, смешанной по времени зацветания растений, с другой. Выявлены особенности экспрессии *FLC* и *VIN3* у растений карельских популяций в отличие от данных литературы [3, 11, 21]. Возможно, эти особенности связаны с эпигенетическими причинами, т.е. с различиями в степени метилирования хроматина *FLC* у растений отдельных популяций до и в процессе яровизации, что и планируется нами проанализировать в дальнейшем. Результаты исследования позволяют предположить, что генетические и эпигенетические механизмы контроля темпов зацветания и гены, вовлеченные в этот процесс, могут различаться у растений популяций разных географических регионов и отличаться от механизма, представленного Нео и Sung [21].

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (№ темы 0218-2019-0077).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A.J.M., Soppe W. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis* // Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. P. 345–370.
2. Boss P.K., Bastow R.M., Mylne J.S., Dean C. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting and resetting // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 18–31. doi 10.1105/tpc.015958
3. Michaels S.D., Amasino R.M. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering // The Plant Cell. 1999. V. 11. P. 949–956.
4. Schmitz R.J., Amasino R.M. Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants // Biochim. Biophys. Acta. 2007. № 1769. P. 269–275. doi 10.1016/j.bbaexp.2007.02.003
5. He Y., Michaels S.D., Amasino R.M. Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis* // Science. 2003. V. 302. P. 1751–1754. doi 10.1126/science.1091109
6. Ausin L., Alonso-Blanco C., Martinez-Zapater J.M. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein // Nat. Genet. 2004. V. 36. P. 162–166.
7. Johanson U., West J., Lister C. et al. Molecular analysis of FRIGIDA, major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time // Science. 2000. V. 290. P. 344–347. doi 10.1126/science.290.5490.344
8. Le Corre V., Roux F., Reboud X. DNA polymorphism at the FRIGIDA gene in *Arabidopsis thaliana*: extensive non-synonymous variation is consistent with local selection for flowering time // Mol. Biol. Evol. 2002. V. 19(8). P. 1261–1271. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004187
9. Gazzani S., Gendall A.R., Lister C., Dean C. Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions // Plant Physiology. 2003. V. 132. P. 1107–1114. doi 10.1104/pp.103.021212
10. Shindo Ch., Aranzana M.J., Lister C. et al. Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in determining variation in flowering time of *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2005. V. 138. P. 1163–1173. doi 10.1104/pp.105.061309
11. Sheldon C.C., Rouse D.T., Finnegan E.J. et al. The molecular basis of vernalization: The central role of FLOWERING LOCUS C (*FLC*) // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 3753–3758. doi 10.1073/pnas.060023597
12. Saleh A., Alvarez-Venegas R., Avramova Z. Dynamic and stable histone H3 methylation patterns at the *Arabidopsis* *FLC* and *API* loci // Gene. 2008. V. 423. P. 43–47. doi 10.1016/j.gene.2008.06.022
13. Sung S., Amasino R.M. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3 // Nature. 2004. V. 427. P. 159–164. doi 10.1038/nature02195
14. Li H., Ilin S., Wang W. et al. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF // Nature. 2006. V. 442. P. 91–95. doi 10.1038/nature04802
15. Jung C., Muller A.F. Flowering time control and applications in plant breeding // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 563–573. doi 10.1016/j.tplants.2009.07.005
16. Adrian J., Torti S., Turck F. From decision to commitment: the molecular memory of flowering // Mol. Plant. 2009. V. 2. P. 628–642.
17. Andrés F., Coupland G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. P. 627–639. doi 10.1038/nrg3291
18. De Lucia F., Crevillen P., Jones A.M. et al. A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 44. P. 16831–16836. doi 10.1073/pnas.0808687105
19. Kim D.H., Doyle M.R., Sung S., Amasino R.M. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants // Annu. Rev. Cell Devel. Biol. 2009. V. 25. P. 277–299. doi 10.1146/annurev.cellbio.042308.113411
20. 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. V. 3(10):e3404. doi 10.1371/journal.pone.0003404
21. Heo J.B., Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA // Science. 2011. V. 331. P. 76–79. doi 10.1126/science.1197349
22. Lee J., Yun J.Y., Zhao W. et al. A methyltransferase required for proper timing of the vernalization response in *Arabidopsis* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 2269–2274. doi 10.1073/pnas.1423585112
23. Kim D.H., Sung S. Coordination of the vernalization response through a *VIN3* and *FLC* gene family regulatory network in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2013. V. 25. P. 454–469. doi 10.1105/tpc.112.104760
24. Федоренко О.М., Грицких М.В., Николаевская Т.С. Полиморфизм по времени начала цветения у *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунг. на северной границе его ареала // Тр. КарНЦ РАН. Серия эксперим. биология. 2012. № 2. С. 139–146.
25. Kranz A.R., Kirckheim B. Genetic resources in *Arabidopsis* // AIS. 1987. № 24.
26. Курбидяева А.С., Зарецкая М.В., Солтабаева А.Д. и др. Генетические механизмы адаптации растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунг. к экстремальным условиям северной границы ареала // Генетика. 2013. Т. 49. № 8. С. 943–953. doi 10.7868/S0016675813080092
27. Иванов В.И., Касьяненко А.Г., Санина А.В., Тимофеева-Ресовская Е.А. Опыты по радиационной генетике *Arabidopsis thaliana* (L.) Неунг. // Генетика. 1966. № 8. С. 55–70.
28. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408. doi 10.1006/meth.2001.1262
29. Eickelberg G.J., Fisher A.J. Environmental regulation of plant gene expression: an RT-PCR laboratory project for an upper-level undergraduate biochemistry or molecular biology course // Biochem. Mol. Biol. Educa-

- tion. 2013. V. 41. № 5. P. 325–333. doi 10.1002/bmb.20722
30. Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S. et al. Vernalization induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the *VERNALIZATION 1* gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 8386–8391. doi 10.1073/pnas.0903566106
 31. Banerjee A., Roychoudhury A. The gymnastics of epigenomics in rice // Plant Cell Rep. 2017. V. 37. № 1. P. 25–49. doi 10.1007/s00299-017-2192-2
 32. Choi J., Hyun Y., Kang M.J. et al. Resetting and regulation of flowering locus C expression during *Arabidopsis* reproductive development // Plant J. 2009. V. 57. P. 918–931. doi 10.1111/j.1365-313X.2008.03776.x
 33. Xing D., Zhao H., Xu R., Li Q.Q. *Arabidopsis* PCFS4, a homologue of yeast polyadenylation factor Pcf1p, regulates FCA alternative processing and promotes flowering time // Plant J. 2008. V. 54. P. 899–910. doi 10.1111/j.1365-313X.2008.03455.x
 34. Klose R.J., Yamane K., Bae Y. et al. The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36 // Nature. 2006. V. 442. P. 312–316. doi 10.1038/nature04853
 35. Turck F., Coupland G. When vernalization makes sense // Science. 2011. V. 331. P. 36–37. doi 10.1126/science.1200786
 36. Coustham V., Li P., Strange A. et al. Quantitative modulation of Polycomb silencing underlies natural variation in vernalization // Science. 2012. V. 337. P. 584–587. doi 10.1126/science.1221881
 37. Duncan S., Holm S., Questa J. et al. Seasonal shift in timing of vernalization as an adaptation to extreme winter // ELIFE. 2015. V. 23. 4:e06620. doi 10.7554/eLife.06620

Changes of *FLC* and *VIN3* Expression during the Vernalization of the Plant *Arabidopsis thaliana* of Northern Natural Populations

O. M. Fedorenko^{a,*}, L. V. Topchieva^a, M. V. Zaretskaya^a, and O. N. Lebedeva^a

^a*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910 Russia*

*e-mail: fedorenko_om@mail.ru

The specific features of the expression of *FLC* and *VIN3* genes that play a leading role in the vernalization-mediated transition to flowering in *A. thaliana* plants of northern natural populations (Karelia) were revealed. Differences in these genes expression changes during vernalization were noted between the populations represented by the late-flowering plants on the one hand, and the population mixed by the flowering time of the plants on the other hand. A low level of *FLC* and *VIN3* genes expression in plants of the studied populations before cold exposure was established. During the vernalization there is an increase in the level of *FLC* mRNA transcripts was observed with the maximum expression at 10 and 20 days of cold, followed by a decrease by the 30 days. Prolonged exposure to cold induces an increase of *VIN3* expression with the maximum in the late-flowering plant populations on the 30th day of vernalization and in the mixed on time-flowering plant population on the 40th day. The change in the expression of *FLC* and *VIN3* in the process of vernalization in S1 of the offspring of one early-flowering plant is presented in a special way while the expression of *FLC* in them changes according to the classical ideas: the high level of *FLC* transcripts before vernalization during cold exposure is reduced. It is suggested that the genetic and epigenetic mechanisms which control flowering time and the genes involved in this process may differ in plant populations from different geographic regions.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, natural populations, flowering time, vernalization, expression of *FLC* and *VIN3* genes, epigenetic mechanisms.