

**Р.Т. РІПЕЦЬКИЙ, Я.Д. ХОРКАВЦІВ**

Інститут екології Карпат, відділ екоморфогенезу рослин  
вул. Стефаника, 11, м. Львів, 76000, Україна  
*morphogenesis@mail.lviv.ua*

## **ЕПІГЕНЕТИЧНА АДАПТАЦІЯ МОХІВ І ФЕНОМЕН КЛІТИННОЇ ПАМ'ЯТІ**

*К л ю ч о в і с л о в а: мохи, епігенетика, клітинна пам'ять,  
пластичність фенотипу*

Однією з основних властивостей усього живого є здатність пристосовуватися до умов існування. Фенотипна, фізіологічна адаптація організму до конкретних умов середовища здійснюється з участю різноманітних фізіолого-біохімічних і молекулярних механізмів у межах даного генотипу, причому останній визначає норму реакції — специфічний спосіб реагування на мінливість природного довкілля. Ступінь і напрям припустимої пластичності фенотипу визначаються генетичними факторами. У фенотипі, однак, усі можливості генотипу ніколи не виявляються відразу. Екстремальні ситуації можуть стимулювати реалізацію потенцій, які є прихованими в умовах, близьких до нормальних. На популяційному рівні поняття фізіологічної адаптації, норми реакції, пластичності й оптимальної пристосованості фенотипу розглядаються як залежні від добре інтегрованого генного комплексу, генофонду популяції (Майр, 1974). Генетична адаптація відбувається у популяціях організмів у процесі добору рідкісних випадкових генотипів, генетичних рекомбінантів або мутацій, резистентних до дії того чи іншого стресора.

**Клон із окремої клітини гаметофіту та спорофіту моху як експериментальна модель.** З'ясування механізмів фізіологічної адаптації потребує проведення досліджень на генетично максимально однорідному матеріалі. З огляду на це мохи, безперечно, — дуже зручна модель. Клоном із однієї гаплоїдної клітини у мохів може бути, власне, кожна односпорова дернинка, яка у дводомних видів є чоловічої або жіночої статі (персоніфікація гамет). В односпоровій культурі однодомного виду всі спори будь-якої коробочки дають генетично ідентичні клони. Генетично дуже близькі, або навіть ідентичні дернинки, можна отримати також зі спор окремих коробочок з природи, якщо коробочки брати з невеликих ізольованих дернинок. Через незначні віддалі, на які поширюються антерозоїди по водній плівці на дернинках, перехресне запліднення в них мало ймовірно.

Односпорову лабораторну культуру моху вперше застосували у дослідях А.С. Лазаренка та Є.М. Лесняк (1972). Унаслідок цього двом видам мохів *Desmatodon cernuus* (n = 26) і *D. ucrainicus* (n = 52) надано статус видів-близнят,

© Р.Т. РІПЕЦЬКИЙ, Я.Д. ХОРКАВЦІВ, 2012

які габітуально подібні, але добре розрізняються за кількісними ознаками і біологічними особливостями. Для *D. ucrainicus* як у природному середовищі, так і в культурі характерні більші розміри клітин листкової пластинки та їхніх ядер і нижчий осмотичний тиск клітин. В односпорових дернинках на безперервному світловому дні за незмінної температури цей вид є самофертильним. *D. cernuus* в односпоровій культурі — самостерильний, і для нормального спороношення потребує фотоперіоду та зниження нічних температур.

У мохів практично будь-яка клітина як гаметофіту, так і спорофіту може утворювати регенеративну протонему, яка далі розвивається аналогічно до протонемі зі спор. Завдяки цьому експериментатор завжди має у своєму розпорядженні клони з різнодиференційованих клітин як у гапло-, так і диплофазі. У дослідях з мохом *Pottia intermedia* (за сучасною класифікацією Р. Зандера) (Zander, 1993) до роду *Tortula* належить *Tortula modica* (раніше *Pottia intermedia*), у диплофазі якого яскраво виражена апогамія, клони з окремих клітин гаметофіту та спорофіту виявилися перспективними для експериментального дослідження стабільності клітинної детермінації апогамії, успадкування на клітинному рівні, готовності до специфічних форм диференціювання (Ріпецький, 1983, 1985; Lobachevska et al., 2005).

**Епігенетична адаптація моху.** Щоб з'ясувати, як саме клон із окремої гаплоїдної клітини моху пристосовується до екстремальних умов існування, необхідно було оцінити його реакцію на посилення дії стресора. Ми виходили з того, що у будь-якому випадку стресорна дія дозозалежна. Дистрес настає у разі збільшення дози стресорного чинника вище певного порогу, за межами якого його дія вже не може компенсуватися рослиною (Кордюм і др., 2003).

У *Tortula modica*, як і в більшості мохів, листостебловий пагін (гаметофор) розвивається з окремої клітини протонемі, отже, дернинка, що бере початок з окремого гаметофору, є клоном однієї клітини моху (Shaw, 1990). Об'єктом наших досліджень були зачаткові листки, ізольовані з верхньої третини гаметофорів такого клону. На твердому живильному середовищі 1—3 клітини зачаткових листків у результаті ініціації нерівномірного росту та переходу клітинних ядер до мітозу регенерують протонемою (Хоркавців та ін., 2006). Протонема галузиться й утворює дернинку. Спостерігаючи за мікрорегенерантами на середовищі з поступово зростаючими концентраціями  $\text{HgCl}_2$ , ми несподівано виявили його селективну дію. На концентрації 0,1 і 0,2 мкМ  $\text{HgCl}_2$  виживало, як і в контролі, 80—90 % мікрорегенерантів. За наявності 0,5 мкМ солі ртуті у середовищі регенерувала й дала початок дернинкам близько третина листків; із підвищенням вмісту металу в субстраті кількість регенерантів зменшувалася (Ріпецький та ін., 2008).

Із удосконаленням методів оцінки рівень інтраклональної мінливості часто виявляється значно вищим, аніж вважали раніше, і класична концепція генетичної однорідності клонів зазнає серйозного критичного перегляду (Lushai, Lozdale, 2002). Яким би, однак, широким не був діапазон випадкової інтраклональної мінливості, практично неможливо уявити, як він міг забезпечити у *T. modica* такий

високий рівень виживання (до 38,5%). Отже, приблизно третина мікрорегенерантів якимось чином «запам'ятала» індуктивну дію стресора. Немає сумніву, що в умовах дистресу виживання дернінок на ртуті забезпечила не селекція рідкісних, випадкових резистентних генотипів (генетична адаптація), а добір спрямовано індукованих дією стресора епігенотипів, тобто епігенетична адаптація. Остання стосується не лише металостресу, а й впливу інших абіотичних чинників на проростання спор (Хоркавців, Ріпецький, 2011). Важливо, що дозування стресора дає можливість розмежувати фізіологічну й епігенетичну адаптації. Перша відбувається без селекції мікрорегенерантів клону, друга — зумовлена добром резистентних епігенотипів. У різних видів мохів розмежування двох типів адаптації до ртуті відбувається на різних концентраціях стресора.

Сам факт добору резистентних до ртуті мікрорегенерантів вказує на стійкість індукованих модифікацій. З'ясувалося, що вони пов'язані зі зростанням темпів клітинних поділів у листках гаметофорів, а також із підвищенням активності пероксидази у регенерантів, що вижили на середовищі зі ртуттю. Характерно, що збільшення проліферативної активності, як і активності однієї з молекулярних електрофоретичних форм пероксидази, зберігалось у рослинах другої репродукції на середовищі без ртуті, отже, модифікаційні зміни підтримувалися у клітинних поділах (Хоркавців та ін., 2009).

**Реакційні системи клітинної пам'яті.** Передача нащадкам соматичних клітин з ідентичним генотипом будь-яких змінених ознак фенотипу, причому й тоді, коли стимули, що ініціювали даний фенотип, у подальшому відсутні, має назву клітинної пам'яті (Alberts et al., 1994). Сьогодні дослідження природи цього явища є одним із основних завдань молекулярної біології рослин. Відповідальними за клітинну пам'ять вважають три типи реакційних систем (Jablonka, Lamb, 1998). Перший об'єднує системи стійкого стану (steady-state systems), що забезпечують збереження змін в експресії відповідних генів унаслідок існування саморегулятивних циклів генної активності. Наприклад, відбувається активація гена А, а його продукт блокує роботу гена Б, що виробляє репресор гена А. В результаті цього ген А, який запрацював, постійно залишається в активному стані (Гершензон, 1983). До другого типу належать системи структурного успадкування (structural inheritance systems). У цьому типі клітинного успадкування структурі-попередники, що існують у клітинах, стають матрицями для утворення нових структур. Наприклад, у війчастих найпростіших, таких як тетрагімени та парамеції, специфічний ряд структур на поверхні клітин, які пов'язані з роботою війок, слугує матрицями для побудови таких самих структур у дочірніх клітинах (Grime, Aufderheide, 1991). Протонема мохів росте у результаті поділів верхівкової апікальної клітини. Галуження протонеми розпочинається, зазвичай, на певній віддалі від апікальної клітини. У моху *Funaria hygrometrica*, наприклад, галузиться третя інтеркалярна клітина й надалі галуження відбувається ритмічно (Демків, Улична, 1972). У цього моху вперше встановлено явище ортотропізму протонеми (Лазаренко, Демків, 1968): вибіркоче руйнування апікальної клітини ініціює галуження її прямого нащадка — субапікальної клітини, причому

верхівкова клітина бокового відгалуження різко загинається і продовжує рости у напрямі, властивому зруйнованій апікальній клітині. Характерно, що бокове відгалуження інтеркалярної клітини, як інтактної, так і декапітованої протонеми, росте під гострим кутом до материнського столону. Негативно гравітропна протонема моху *T. modica* (Кит, Рипецкий, 2007), яку орієнтували під прямим кутом до вектора гравітації, за 8 годин такої гравістимуляції згиналася вгору під кутом  $45^{\circ}$  до початкового напрямку росту. В умовах кліностагування такий кут ї надалі зберігався під час росту протонемних столонів. В обох наведених прикладах спрямований ріст протонеми зумовлений, очевидно, збереженням у поділах апікальної клітини або її прямого нащадка, відповідної просторової організації мікрофібрил клітинної стінки чи мікротрубочок цитоскелета. Третій тип реакційних систем об'єднує системи з маркуванням хроматину (chromatin-marking systems). Ці системи є основою епігенетичного успадкування — збереження у клітинних поділах, мітозах, а іноді й у мейозі, змін, які настають в експресії генів унаслідок стійкої модифікації гістонів та ДНК хроматину без змін у первинній послідовності нуклеотидів ДНК. Звідси й походження назви — «епігенетичне» (від грецького «епі» — над) (Jablonka, Lamb, 1998; Holliday, 2005; Imhof, Bonaldi, 2005).

У наших дослідах відбувався добір резистентних до ртуті епігенотипів *T. modica*, що надалі зберігалися в клітинних поділах. Клітинна пам'ять, таким чином, тут тісно пов'язана з добором. Тому вищезгадані механізми стійкого стану та структурного успадкування фактично не прояснюють причини клітинної пам'яті в умовах ртуть-дистресу. Натомість цілковито адекватною є тут система модуляції хроматину внаслідок посттрансляційної модифікації гістонів і ДНК без змін у первинній послідовності її нуклеотидів. Регуляція генної активності на цій основі (епігенетична регуляція) поширена у рослин як в онтогенезі (Chinnusamy et al., 2008; Тищенко, 2009), так і у відповідях на стрес (Chinnusamy, Zhu, 2009), причому такі модифікаційні зміни можуть мати незворотний характер, зберігаючись у клітинних поділах (епігенетичне успадкування).

**Основні механізми епігенетичної регуляції активності генів.** Модифікація хроматину здійснюється двома основними способами — ацетилюванням гістонів та метилюванням ДНК, однак конкретний механізм епігенетичного успадкування запрограмований лише у разі метилювання ДНК. Характерно, що саме на підставі останніх досягнень у дослідженні метилювання ДНК передбачається пріоритетна роль епігенетики в нашому столітті (Ванюшин, 2004; Holliday, 2002; Vanyushin, 2005). Основним ферментом, що відповідає за метилювання ДНК, є ДНК-метилтрансфераза. Вона здійснює передачу метильної групи 5-аденозилметіоніну в молекулу цитозину замість *H* у положенні *C*<sup>5</sup>. Така модифікація основи відбувається, звичайно, перед клітинним поділом, невдовзі після реплікації ДНК. Субстратом метилювання є цитозин у комплементарних дуплетах ЦГ-ГЦ. Під час реплікації повністю метильованої ДНК утворюються дві напівметилювані молекули. Тільки у такому положенні до процесу долучається фермент метилаза підтримування, що спричиняє утворення двох цілковито

метильованих молекул ДНК. Таким чином, у клітинних поділах може зберігатися розподіл метильованих і неметильованих основ ДНК. На сьогодні це поки що єдиний механізм, що пояснює клітинне успадкування стійких змін в експресії генів. Щоразу більше даних вказує на те, що метилювання регуляторних ділянок генів пов'язане з їх інактивацією, а деметилювання — з активацією. Очевидно, 5-метилцитозин блокує приєднання до ДНК активаторів транскрипції або ж сприяє включенню репресорів транскрипції ДНК (Holliday, 2002, 2005; Wada, 2005).

Останнім часом зв'язок між метилюванням генів та їхньою експресією підтверджений експериментально (Холлидей, 1989; Bird, 2002, 2007; Akimoto et al., 2007). Методами генної інженерії отримано метильовані та неметильовані варіанти деяких генів. У культурі тканин зафіксовано активність лише неметильованих генів, причому характерне метилювання зберігалось в численних клітинних поділах. Коли метильований ген потрапляв у клітину, де за норми відбувається його експресія, спостерігалися деметилювання й активація введеного гена. Навпаки, метильовані гени, введені до неспеціалізованих клітин, так і залишалися метильованими й неактивними. Встановлено, що аналог 5-цитозину — 5-азациитидин — діє як інгібітор метилювання ДНК. Інгібуючи метилазу підтримування, 5-азациитидин включається у ДНК замість 5-цитозину, але не метилюється. У результаті численні, у нормі метильовані сайти ДНК, після декількох клітинних циклів деметилюються. Характерно, що в неактивній X-хромосомі деяких ссавців метильовані регуляторні ділянки практично всіх генів, які називають генами внутрішнього використання, оскільки вони діють в усіх клітинах незалежно від рівня диференціювання. Такі гени X-хромосом, як з'ясувалося, можна активувати азацитидином. Цікаво, що тривалість життя людських клітин у культурі залежить не від хронологічного часу, а від запрограмованої кількості клітинних поділів. Так, із зростанням кількості клітинних поділів зменшується кількість метильованих сайтів ДНК, унаслідок чого клітини втрачають здатність до розмноження. Одноразова обробка молодих клітин у культурі 5-азациитидином значно знижувала загальний рівень метилювання ДНК. Спочатку обробка 5-азациитидином не впливала на функціонування клітин і швидкість їхнього розмноження. Проте клітини певним чином запам'ятовували дію азацитидину й відмирили значно швидше, ніж у контролі. З'ясувалося (Steimer et al., 2004; Handerson, Jacobsen, 2007), що важливу роль у метилюванні ДНК відіграють короткі, завдовжки у 20—24 нуклеотидів, нематричні мікроРНК.

Зміни в експресії генів, що іноді успадковуються на клітинному рівні, відбуваються не лише в результаті метилювання ДНК хроматину, а й посттрансляційної модифікації гістонів. Структурною одиницею хроматину є нуклеосома. Це октамер із 8 молекул гістонів, по 2 молекули H2A, H2B, H3 та H4. Кожен такий тетраметр у хромосомі огортає ділянку двоспіральної ДНК завдовжки у 147 нуклеотидних пар. ДНК зв'язує сусідні нуклеосоми вздовж всієї хромосоми, причому окремі нуклеосоми з'єднуються ще й за допомогою

гістону H1, утворюючи більш-менш щільні нуклеосомні комплекси. Оскільки гістонові білки заряджені позитивно, вони мають здатність зв'язуватися з негативно зарядженою ДНК. Такий процес призводить до ущільнення хроматину і, відповідно, до інактивації генної експресії. Унаслідок приєднання до гістонів ацетильних груп (процес ацетилювання) гістони змінюють позитивний заряд на негативний. З цієї причини ДНК і гістони утворюють менш компактні конфігурації, які сприяють генній експресії. Приєднання та вилучення ацетильних груп здійснюється специфічними ферментами — гістон-ацетилтрансферазами і гістон-деацетилазами відповідно. Встановлено, що метилювання ДНК і модифікація гістонів — тісно пов'язані процеси. Так, зміни у метилюванні промоторів відповідних генів можуть ініціювати синтез гістону-деацетилаз. У свою чергу, деацетиляція гістонів активує їхню взаємодію з негативно зарядженою ДНК і таким чином зумовлює інактивацію генів (Luger et al., 1997; Urnov, Wolffe, 2001; Imhof, 2006). Недавно знайдено специфічний інгібітор деацетилаз — тріхостатин А. Застосування його у дослідах зазвичай сприяє активації експресії певних генів (Tóth et al., 2004).

#### **Епігенетичне успадкування в онтогенезі та у відповідях на стрес.**

Основні епігенетичні механізми підпорядковуються загальним закономірностям, які, однак, проявляються специфічно залежно від природи організму, його морфо-функціональної організації. У вищих рослин метилювання ДНК та ацетилювання гістонів, що є найновішими молекулярними методами, причетні до АБК-залежної генетичної регуляції росту і розвитку, зокрема, стану спокою насіння, його проростання, росту проростків, закладки бокових коренів, переходу вегетативного розвитку до репродуктивного (Chinnusamy et al., 2008). У всіх згаданих процесах епігенетичні зміни в експресії генів зазвичай зворотні, їх успадкування на клітинному рівні доведено на сьогодні в онтогенезі лише в разі успадкування детермінації, тобто збереження в клітинних поділах готовності до певних форм диференціювання.

Для озимих форм деяких одно- і дворічних рослин відоме явище яровизації — пришвидшення розвитку в результаті попередньої дії протягом певного періоду низьких позитивних температур. Так, наприклад, озима пшениця, зернівки якої піддали яровизації, може заколоситися того ж року, без перезимівлі рослин. З'ясувалося, що яровизація спричиняє в конусі наростання ініціацію зачатків квіток, причому готовність до цвітіння (детермінований стан) стійко зберігається в клітинних поділах аж до формування квіток. Недавно доведено (Dennis, Peacock, 2007), що в арабідопсису низька температура під час яровизації насіння індукує епігенетичний механізм, який загальмовує в локусі цвітіння відповідний ген (flowering locus C, FLC), а заблокований стан гена супроводжується зміною в структурі хроматину. FLC хроматин зберігається в клітинних поділах аж до зацвітання.

У мохів протонема утворюється не лише під час проростання спор, а й у процесі регенерації різних тканин гаметофіту і спорофіту. На апоспоричному, отриманому регенерацією спорофіту, гаметофіті деяких мохів спорофітні

структури утворюються апогамно, оминаючи процес запліднення. У *T. modica*, наприклад, апогамні структури і коробочки рясно формуються на верхівках листків. Однак структури не з'являються у  $\kappa$ -поліплоїдів *T. modica* та соматичних гібридів гаплоїдних клітин її протонеми. Здатність до апогамії (детермінований стан) стійко зберігається в апоспоричних диплоїдів під час вегетативного розмноження в різних, зокрема екстремальних, умовах вирощування, і в клонів, отриманих із окремих ізольованих клітин та протопластів. Це дає підстави розглядати апогамію в диплофазі мохів як результат збереження у клітинних поділах стійких морфо-функціональних змін, пов'язаних із детермінацією спорофітного розвитку, що настає до утворення зиготи, найімовірніше, в оогенезі (Ріпецький, 1985). Л. Бауер (Bauer, 1959) та А.С. Лазаренко (Лазаренко, 1965) уперше запропонували гіпотезу, за якою здатність до апогамії зумовлена наявністю в клітинах специфічного авторепродуктивного фактора апогамії, що в клітинах, які діляться, може розподілятися нерівномірно. Наші спостереження вказують на епісомну природу фактора апогамії, який, очевидно, може включатися в хромосому або існувати автономно, а також еліминуватися з клітин, коли клітинні поділи відбуваються швидше, ніж реплікація їх епісомного фактора в цитоплазмі. Відзначимо, що у бактерій справді вдається звільнити клітини від плазмідного фактора, інгібуючи його автономну реплікацію акридиновими барвниками (Гершензон, 1983). Характерно, що різні тканини спорофіту започатковують як апогамні, так і неапогамні клони. Останні у *T. modica* найчастіше регенерують із тканин стінки спорового мішка коробочки (Ріпецький, 1980; Ripetsky, Kit, 1998). З мікрорегенерантів апогамного клону зрідка утворюються неапогамні клони (Lobachevska et al., 2005). Їхня кількість зростає до 10 % у разі отримання дернинок моху з окремих ізольованих протопластів апоспоричної протонеми (Лобачевская и др., 2008). За хронічного стресу, під час вирощування апоспоричних мікрорегенерантів *P. intermedia* на органічному середовищі з кінетином та АБК, майже 30% мікрорегенерантів втрачали здатність до апогамії. Характерно, що в цих умовах вирощування зростала кількість клітинних поділів протонеми (Lobachevska et al., 2005).

Епігенетичний контроль експресії генів, завдяки метилуванню ДНК та ацетилюванню-деацетилюванню гістонів, діє не лише в індивідуальному розвитку рослин, а й у їхніх реакціях-відповідях на різні абіотичні та біотичні стреси, такі як нестача вологи, засолення, УФ-опромінення, вплив знижених або підвищених температур, важких металів, ураження збудниками хвороб та ін. (Chinnusamy, Zhu, 2009). У листках тютюну, наприклад, внаслідок дії метало-, сольового і температурного стресів, виявлено деметилування гена гліцерофосфатдиестерази і подальше зростання її активності (Choi, Sano, 2007). Стрес, зумовлений водним дефіцитом, індукував гіперметилування специфічних ГЦ-сайтів у геномі гороху (Labra et al., 2002). У проростків рису під час занурення у воду спостерігали модифікацію гістону H-3, що корелювало з активацією експресії генів алкоголь-дегідрогенази та піруват-декарбоксілази (Tsuji et al., 2006). У наведених й численних інших випадках індуковані стресом

модифікації генів після припинення дії стресора поверталися до базового рівня, тобто були швидкоплинними, зворотними. В окремих випадках, однак, констатовано успадкування змін в експресії генів на клітинному рівні. Такі випадки в літературі іноді об'єднують терміном «запам'ятовування стресу» — stress memory (Chinnusamy, Zhu, 2009). Слід мати на увазі: короткочасне запам'ятовування стресу може бути результатом індукції у клітинах певних протеїнів, РНК або метаболітів, що не супроводжується стійкими структурно-функціональними змінами в геномі. В цьому разі тривалість збереження пам'яті про стрес залежатиме від часу напіврозпаду таких сполук і буде більшою, якщо метаболічні зміни вже встигли спричинити у рослинах відповідні фенологічні або морфологічні реакції. Проте відомі також випадки тривалого запам'ятовування стресів у результаті епігенетичного успадкування на клітинному рівні модифікацій генів, ініційованих метилюванням-деметилюванням ДНК. Висновок про запам'ятовування стресу тут, як і про успадкування клітинної детермінації в онтогенезі, можна зробити лише на основі спостереження за нащадками клітин або особин. В арабідопсису, наприклад, УФ-опромінення стимулювало підвищення частоти гомологічної соматичної рекомбінації, і цей стан передавався нащадкам опромінених рослин як домінантна ознака (Molinier et al., 2006). У тютюну такий самий ефект спричиняло зараження вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ). Характерно, що в цьому випадку в нащадків інфікованих рослин констатовано гіпометилювання окремих локусів геному, зокрема гена резистентності до ВТМ (Войко et al., 2007). На особливу увагу заслуговують дослідження, які розкривають механізми запам'ятовування стресу в рису (Akimoto et al., 2007). Якщо у наших дослідах з мікрорегенерантами клону *T. modica* в умовах дистресу виявлена селективна дія ртуті, то в дослідах з рисом селективний вплив знайдено для інгібітора метилювання ДНК 5-азадеоксицитидину. Із 1000 зернівок, одноразово оброблених інгібітором, вижили і започаткували нові лінії лише 35. У геномі всіх ліній стійко зберігався стан гіпометилювання окремих сайтів. Однак фенотипно такі рослини нічим не відрізнялися від контролю. Лише в однієї з ліній на підставі молекулярного аналізу виявлено повне деметилювання промоторної ділянки гена резистентності до *Xanthomonas oryzae*, що зумовлювало стійкість рослин до збудника. У рослинах контролю, які не зазнавали дії 5-азадеоксицитидину, регуляторна ділянка такого гена під час клітинних поділів залишалася цілковито метильованою, зумовлюючи мовчазність гена, повне блокування резистентності і, відповідно, чутливість до ураження. На відміну від наведених вище випадків, у клону *T. modica* дозування стресора уможливило розмежування фізіологічної та епігенетичної адаптацій. Про участь метилювання ДНК у цьому процесі сьогодні можемо лише здогадуватися. Висока частота епігенетичної адаптації, найімовірніше, зумовлена збагаченням ДНК організмів, зокрема регуляторних ділянок генів, субстратом метилювання — цитозином. За останніми даними, майже 40% регуляторних ділянок різних генів збагачені ЦГ-ГЦ нуклеотидами, тоді як у геномі організмів метильовані 70—80 % комплементарних дуплетів ЦГ-ГЦ (Bird, 2002).



Цитофотометрія ядерної ДНК-АО, поєднана з використанням ДНК-ази I, виявила у ртуть-резистентних епігенотипів *T. modica* певне збільшення некодуючої ДНК (Ріпецький та ін., 2008). Відомо, що під впливом різноманітних стресів унаслідок ампліфікацій і транспозицій часто відбуваються істотні зміни в кількості та якості нуклеотидних повторів некодуючої ДНК. Остання зосереджена переважно у компактнішому хроматині, де переважають ЦГ-ГЦ динуклеотиди, і функціонує як медіатор між стрес-факторами й експресією генів (Bassi, 1999). Цитохімічно встановлено, що у моху *F. hygrometrica* свинець стимулює значне збільшення кількості та розмірів нуклеотидних повторів ДНК, збагачених комплементарними дуплетами ЦГ-ГЦ (Bassi et al., 1995; Kingham et al., 1998). Про участь метилювання ДНК в епігенетичній адаптації свідчать наші, ще неопубліковані, дані, за якими зміни в електрофоретичному спектрі пероксидази рослин моху під впливом азацитидину нагадують зміни у спектрі ферменту епігенотипів, стійких до ртуті.

Хоча молекулярні механізми запам'ятовування стресу ще далекі від повного розуміння, саме виявлення цього явища може вказувати на його важливість у житті виду. Наочним прикладом тут можуть бути спостереження за біотичним стресом у тлі (Shaposhnikov, 1966). На атипovому господарі окремі особини тлі переходили до партеногенетичного розмноження, започатковуючи лінії особин, які втрачали здатність схрещуватися з особинами вихідної популяції. Відомо, що репродуктивна ізоляція є одним із основних факторів видоутворення, і важливість спостереження не викликає сумніву, хоча надалі дослідження слід доповнювати молекулярним аналізом метилювання ДНК. Успіх наукового пізнання, зрештою, зумовлюється постійною взаємодією теорії й експерименту, формулюванням і перевіркою гіпотез (Холлидей, 1989). Як свідчать наші дослідження (Хоркавців та ін., 2009), різниця між фізіологічною та епігенетичною адаптаціями у клону *T. modica*, власне, умовна. Так, уже на низьких концентраціях ртуті, де ще не проявлялася селективна дія (фізіологічна адаптація), констатовано певне підвищення активності пероксидази. У стійких до ртуті епігенотипів різниця в активності ферменту значно зростала, розширювався його електрофоретичний спектр, а одна з молекулярних форм була інтенсивніше вираженою у вегетативних нащадків резистентного епігенотипу на середовищі без ртуті (Хоркавців та ін., 2009). У генетиці відоме таке явище, як генокопія модифікації (Инге-Вечтомов, 1989). Епігенетичну адаптацію моху до стресу можна розглядати, очевидно, як епігенокопію модифікації. Різниця між фізіологічною та епігенетичною адаптаціями зумовлена, ймовірно, лише ступенем метильованості та стійкістю метильованого стану в регуляторній ділянці відповідних генів. Оскільки у різних видів мохів два типи адаптації розмежовуються на різних концентраціях стресора, можна стверджувати, що його дозування під час порівняльного мікроклонального аналізу дернин моху, які виникли в стресових умовах, і дернин із сусідніх фонових локалітетів, дасть змогу не лише виявити епігенетичну адаптацію у природі, а й, до певної міри, передбачити видовий склад мохів у процесі заселення девастованих територій.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ванюшин Б.Ф. Материализация эпигенетики, или небольшие изменения в ДНК с большими последствиями // Химия и жизнь. — 2004. — № 2. — С. 32—37.
2. Гершензон С.М. Основы современной генетики. — Киев: Наук. думка, 1983. — 558 с.
3. Демків О.Т., Улична К.О. Спроба математичного аналізу росту молоді протонеми фунарії вологомірної (*Funaria hygrometrica* Hedw.) // Шляхи експериментального дослідження морфогенезу вищих рослин. — К.: Наук. думка, 1972. — С. 116—123.
4. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. — М.: Высш. шк., 1989. — 592 с.
5. Kim H.A., Рипецький Р.Т. Направленный рост протонеми в условиях клиностатирования // Межд. конф. «Современная физиология растений — от молекул до экосистем» (18—24 июня, 2007 г.). — Республика Коми: Сыктывкар, 2007. Мат.-лы. докл. — Ч. 2. — С. 185—187.
6. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. Концепция стресса // Клеточные механизмы адаптации растений. — Киев: Наук. думка, 2003. — 277 с.
7. Лазаренко А.С. Явление амфоморфизма у мхов // Докл. АН СССР. — 1965. — № 4. — С. 962—964.
8. Лазаренко А.С., Демків О.Т. Корелятивне гальмування росту протонеми *Funaria hygrometrica* Hedw. // ДАН України. — 1968. — Сер. Б, № 8. — С. 763—765.
9. Лазаренко А.С., Лесняк Е.Н. Сравнительное исследование видов-двойников мхов — *Desmatodon certuus* — *D. ucrainicus* (К проблеме инфраструктуры вида у мхов) // Журн. общ. биол. — 1972. — 33, № 6. — С. 657—667.
10. Лобачевская О.В., Рипецький Р.Т., Kim H.A. Изоляция протопластов клеток апоспорической протонеми *Pottia intermedia* (Turn.) Fühng. // Межд. конф. «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (8—12 сентября 2008 г.). Тез. докл. — М., 2008. — С. 432—433.
11. Майр Е. Популяция, виды, эволюция. — М.: Мир, 1974. — 460 с.
12. Рипецький Р.Т. Онтогенетична різноякісність апоспоричного гаметофіту листяних мохів // Укр. ботан. журн. — 1980. — 37, № 3. — С. 30—32.
13. Рипецький Р.Т. Експериментальний апоміксис у мохів // Укр. ботан. журн. — 1983. — 39, № 6. — С. 43—50.
14. Рипецький Р.Т. Експериментальний апоміксис у мхов и проблема устойчивости детерминированного состояния // Онтогенез. — 1985. — 16, № 3. — С. 229—241.
15. Рипецький Р.Т., Хоркавіців Я.Д., Лобачевська О.В., Kim H.A. Адаптація клону моху *Pottia intermedia* до ртуті // ДАН України. — 2008. — № 2. — С. 165—166.
16. Тищенко О.М. Біотехнологія рослин та епігенетика // Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку / За ред. акад. НАН України М.М. Моргуна. — К.: Логос, 2009. — 693 с.
17. Хоркавіців Я.Д., Демків О.Т., Рипецький Р.Т. Гормональна регуляція розвитку апоспоричного гаметофіту *Pottia intermedia* (Fühng.) Turn. // Укр. ботан. журн. — 2006. — 63, № 1. — С. 71—80.
18. Хоркавіців Я.Д., Рипецький Р.Т., Байк О.Л. Фенотипічна та епігенетична адаптація клону моху до ртуті // Цитология и генетика. — 2009. — № 5. — С. 22—27.
19. Холлидей Р. Эпигенетическая наследственность // В мире науки. — 1989. — № 8. — С. 30—38.
20. Akimoto K., Katakami H., Kim H.-J. et al. Epigenetic inheritance in rice plants // Ann. Bot. — 2007. — 100. — P. 205—217.
21. Alberts B., Bray D., Lewis J. et al. Molecular biology of the cell. — New York and London: Garland Publishing Mc., 1994. — 1294 p.

22. Bassi P., Basile A., Stefanini A. et al. Effects of Pb on nuclear repetitive DNA of the moss *F. hygrometrica* (Bryophyta) // *Protoplasma*. — 1995. — **188**. — P. 104—108.
23. Bassi P. The effect of environmental stress on repetitive DNA behavior in plants // *Plant Response to Environmental Stresses* / Ed. H.R. Lerner. — New York: Marcel Dekker, 1999. — P. 161—170.
24. Bauer L. Auslösung apogamer Sporogonbildung am Regerations-Protonema von Laubmoosen durch einen vom Muttersporogon abgegebenen Factor // *Naturwissenschaften*. — 1959. — **46**. — S. 154—155.
25. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // *Genes & Dev*. — 2002. — **16**. — P. 6—21.
26. Bird A. Perceptions of epigenetics // *Nature*. — 2007. — **447**. — P. 396—398.
27. Boyko A., Kathiria P., Zemp F.J. et al. Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants // *Nucleic Acids Res*. — 2007. — **35**. — P. 1714—1725.
28. Chinnusamy V., Gong Z., Zhu J-K. Abscisic acid—mediated epigenetic processes in plant development and stress response // *J. Integr. Plant Biol*. — 2008. — **50** (10). — P. 1187—1195.
29. Chinnusamy V., Zhu J-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants // *Plant Biol*. — **12**. — 2009. — P. 1—7.
30. Choi C.S., Sano H. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants // *Mol. Genet. Genome*. — 2007. — **277**. — P. 589—600.
31. Dennis E.S., Peacock W.J. Epigenetic regulation of flowering // *Curr. Opin. Plant Biol*. — 2007. — **10**. — P. 1—8.
32. Grimes G.W., Aufderheide K.J. Cellular aspects of pattern formation: the problem of assembly / *Monographs in developmental biology*. — Karger. Basel, 1991. — **22**. — P. 1—94.
33. Henderson I.K., Jacobsen S.C. Epigenetic inheritance in plants // *Nature*. — 2007. — **447**. — P. 418—424.
34. Holliday R. Epigenetics comes of age in the twenty—first century // *J. Genetics*. — 2002. — **81**. — P. 1—4.
35. Holliday R. DNA Methylation and epigenotypes // *Biochemistry (Moscow)*. Translated from *Biokhimiya*. — 2005. — **70**. — P. 500—504.
36. Imhof A. Epigenetic regulation and histone modification // *Oxford Journ*. — 2006. — **5**. — P. 222—227.
37. Imhof A., Bonaldi T. “Chromatomics” the analysis of the chromatome // *J. Molecular BioSystems*. — 2005. — **1**. — P. 112—116.
38. Jablonka E., Lamb M.J. Epigenetic Inheritance and Evolution / *J. Evol. Biol*. — **11** (2). — 1998. — P. 159—183.
39. Kingham K. I., Duckett J. G., Gazdova B. et al. The role of DNA methylation on nuclear and cell differentiation in the filamentous caulonema of the moss *Funaria hygrometrica* // *New Phytol*. — 1998. — **138**. — P. 567—577.
40. Labra M., Ghiana A., Atterio S. et al. Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips // *Plant Biol. (Stuttgart)*. — 2002. — **4**. — P. 694 — 699.
41. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. — 1997. — **389**. — P. 251—260.
42. Lushai G., Lozdale H. The biological improbability of a clone // *Genet. Res.*—2002. — **79**. — P. 1—9.

43. Lobachevska O., Kyjak N., Khorkavtsiv O. et al. Influence of metabolic stress on the inheritance of cell determination in the moss, *Pottia intermedia* // Cell Biol. Int. — 2005. — **29**. — P. 181—186.
44. Molinier J., Ries G., Ziptel C. et al. Transgeneration memory of stress in plants // Nature. — 2006. — **442**. — P. 1046—1049.
45. Ripetsky R.T., Kit N.A. Stability of cell determination in moss development // Міжн. конф. «Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі» (1—4 липня 1998 р.). — Львів. — 1998. — С. 100—101.
46. Shaposhnikov G.K. Origin and breakdown of reproductive isolation and the criterion of the species // Entomol. Rev. — 1966. — **45**. — P. 1—18.
47. Shaw A.J. Interclonal variation in morphology, growth rate and copper tolerance in the moss *Funaria hygrometrica* // Evolution. — 1990. — **44**. — P. 441—447.
48. Steimer A., Schöb H., Grossniklaus U. Epigenetic control of plant development: new layers of complexity // Curr Opin. Plant Biol. — 2004. — **7**. — P. 11—19.
49. Toth K.F., Knoch T.A., Wachsmuth M. et al. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin // J. Cell Sci. — 2004. — **117**. — P. 4277—4288.
50. Tsuji H., Saika H., Tsutsumi N. et al. Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice // Plant Cell Physiol. — 2006. — **437**. — P. 995—1003.
51. Urnov F.D., Wolffe A.P. Above and within the genome: epigenetics past and present // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. — 2001. — **6**. — P. 153—167.
52. Vanyushin B.F. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell // Biochemistry (Moscow). Translated from Biokhimiya. — 2005. — **70**. — P. 488—499.
53. Wada Y. Physiological functions of plant DNA methyltransferases // Plant Biotechn. — 2005. — **22** (2). — P. 71—80.
54. Zander R.H. Genera of the Pottiaceae: Mosses of Harsh Environments // Bull. Buffalo Soc. Nat. Sci. — 1993. — **32**. — 379 p.

Рекомендує до друку

Надійшла 24.06.2011 р.

Є.Л. Кордюм

Р.Т. Рупецкий, Я.Д. Хоркавцив

Институт экологии Карпат НАН Украины, г. Львов

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ МХОВ И ФЕНОМЕН КЛЕТОЧНОЙ ПАМЯТИ

В условиях постепенного возрастания содержания ртути в субстрате обнаружено селективное действие стрессора на выживание микрорегенерантов клона из отдельной клетки гаметофита мха *Tortula modica*. Высокий процент выживания (приблизительно треть) свидетельствует об отборе не редкостных, случайных генотипов, а направленных индуцированных эпигенотипов, ”запомнивших“ действие стрессора. Дозирование стрессора дало возможность размежевать физиологическую и эпигенетическую адаптации. У резистентных эпигенотипов активность пероксидазы значительно увеличивалась и расширялся ее электрофоретический спектр, причем одна из молекулярных форм фермента оставалась интенсивнее выраженной у вегетативных потомков на среде без ртути. Различие между физиологической

и эпигенетической адаптациями обусловлено, по-видимому, лишь степенью метилированности ДНК и устойчивостью метилированного состояния в регуляторных участках соответствующих генов. Можно предположить, что дозирование стрессора в сравнительном микроклональном анализе дерновинок, сформированных в стрессовых условиях, и дерновинок фоновых локалитетов даст возможность не только обнаружить эпигенетическую адаптацию в природе, но, в известной мере, и предсказать видовой состав мхов при заселении девастированных территорий.

*К л ю ч е в ы е с л о в а: мхи, эпигенетика, клеточная память, пластичность фенотипа*

*R. T. Ripetskyj, Ya. D. Khorkavtsiv*

Institute of Ecology of the Carpathians, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

#### EPIGENETIC ADAPTION IN MOSSES AND THE PHENOMEN OF CELL MEMORY

Moss clones from individual variably differentiated cells both in the haplo- and diplophase are rather easy to obtain. Under conditions of gradually increased stressor content in the substrate, selective action of mercury on survival of microregenerants of the clone from an individual gametophyte cell of *Tortula modica* was found. High survival percentage of microregenerants (about one third) could result from selection of the directionally induced, «memorized» stress action epigenotypes, rather than from selection of rare random genotypes. High frequency of epigenetic adaptation is most probably caused by enrichment of DNA, in particular of regulatory regions of many genes, with a substrate of methylation Ì cytosine. Dosing of the stressor enabled to identify the boundary between physiological and epigenetic adaptation. Some increase of peroxidase activity was noted during physiological adaptation of microregenerants to low concentrations of mercury while its selective action has not been yet expressed. In resistant epigenotypes, the activity of peroxidase increased significantly and the electrophoretic spectrum of the enzyme widened, only one molecular form being more clearly expressed in vegetative progenies of epigenotypes on the stressor-free medium. Physiological and epigenetic adaptation types apparently differ only in the overall level of DNA methylation and stability of the methylated state in regulatory regions of certain genes. Since the delimitation of the two types of adaptation occurs in different mosses under various concentrations of the stressor, its dosing in comparative microclonal analysis of moss turfs under stress conditions and turfs in unstressed localities is supposed not only to reveal epigenetic adaptation in nature but also to predict, to a certain extent, the species composition of mosses populating devastated territories.

*Key words: mosses, epigenetics, cell memory, phenotypic plasticity.*