DOI 10.21178/2079–6080.2021.4.4
УДК 630.165

Апробация MS-ISSR-метода для оценки профилей метилирования ДНК ели европейской в зоне антропогенного загрязнения

© А.Б. Пекедова¹, Г.В. Калько²

Approbation of the MS-ISSR method for assessing the DNA methylation profiles of Norway spruce
A.B. Pekedova, G.V. Kalko (Saint Petersburg State Forest Technical University; Saint Petersburg Forestry Research Institute)

The article is devoted to the approbation of the MS-ISSR (methylation-sensitive inter simple sequence repeats) method for determining variations in the DNA methylation profiles of Norway spruce trees growing at 5 km from the metallurgical enterprise LLC Orion-Spetsplav-Gatchina, located in the city of Gatchina and in background planting of the Leningrad region. Earlier, the content of the metals Mn, Zn, Cu, Fe, Pb, Cr, Ni, Cd and sulfur was determined in the needles of the spruce trees used to test the method. The aim of the work was to determine the possibility of using the MS-ISSR method to assess the genetic stability of Norway spruce in the zone of anthropogenic emissions, namely, the stability of DNA methylation profiles. We used DNA isolated from fir needles by a modified method with CTAB. DNA restriction was performed using isoschizomer restriction enzymes Msp I or Hpa II (SibEnzyme, Russia) under conditions recommended by the enzyme manufacturer. The efficiency of using seven ISSR primers was evaluated. The amplification results were detected by electrophoresis in 1.5 % agarose gel in the presence of ethidium bromide. The four primers M 2, M 4, M 9 and M 14 have been shown to be useful in detecting changes in DNA methylation profiles. Primer M 9 showed the highest efficiency in detecting DNA methylation – 75 %, primers M 2 and M 4 had an efficiency of 50 %, primer M 14 – 25 %. It was concluded that the use of the MS-ISSR method is promising for the analysis of DNA methylation profiles of Norway spruce.

Keywords: Norway spruce, DNA methylation profiles, restriction, Msp I, Hpa II, ISSR

Апробация MS-ISSR-метода для оценки профилей метилирования ДНК ели европейской в зоне антропогенного загрязнения

А.Б. Пекедова, Г.В. Калько

Статья посвящена апробации MS-ISSR (methylation-sensitive inter simple sequence repeats) метода для определения вариаций в профилях метилирования ДНК деревьев ели европейской, растущих в 5 км от металлургического предприятия ООО «Орион-Спецсплав-Гатчина», расположенного в г. Гатчине и в фоновом насаждении Ленинградской области. Ранее в хвое елей, использованных для тестирования метода, было определено содержание элементов Mn, Zn, Cu, Fe, Pb, Cr, Ni, Cd и S. Целью работы было определение возможности использования метода MS-ISSR для оценки генетической стабильности ели европейской в зоне антропогенных выбросов, а именно стабильности профилей метилирования ДНК. В работе использовали ДНК, выделенную из хвои елей модифицированным методом со СТАВ. Рестрикцию ДНК осуществляли с помощью рестриктаз-изошизомеров Msp I или Hpa II (СибЭнзим, Россия) в условиях, рекомендованных производителем ферментов. Оценена эффективность использования семи ISSR-праймеров. Детекцию результатов амплификации проводили с помощью электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Четыре праймера (М 2, М 4, М 9 и М 14) показали свою пригодность к выявлению изменений профилей метилирования ДНК. Наибольшую эффективность в оценке уровня метилирования ДНК ели показал праймер М 9 – 75 %, праймеры М 2 и М 4 имели эффективность 50 %, праймер М 14 – 25 %. Сделан вывод о перспективности использования метода MS-ISSR для анализа профилей метилирования ДНК ели европейской.

Ключевые слова: ель европейская, рестрикция, Msp I, Hpa II, ISSR, профили метилирования ДНК

Пекедова Анастасия Борисовна – студент Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета им. С.М. Кирова

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией

E-mail: gkalko@spb-niilh.ru; kagava0720@gmail.com

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., 5

Телефон: +7 (812) 670-92-46

²ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Телефон: (812) 552-80-21

Факс: (812) 552-80-42

Введение

Известно, что экспрессия генов является основным механизмом, который преобразует закодированную геномом информацию в фенотипы, а также, что метилирование ДНК служит одним из основных способов эпигенетической регуляции экспрессии генов.

Наиболее изученными эпигенетическими метками у эукариотов являются метилирование ДНК [16, 18, 19, 21, 29, 31] и модификации гистонов, включая ацетилирование [26, 37], метилирование [38], убиквитинирование [17, 38], фосфорилирование [22, 36], гликозилирование, ADP-рибозилирование, карбонилирование и сумоилирование [20]. Модификации гистонов вместе с метилированием ДНК контролируют складывание нуклеосомного массива в структуры более высокого порядка и обеспечивают передачу сигналов для клеточных процессов. Третьим компонентом эпигенетической регуляции функционирования генов являются малые РНК. Они представляют собой группу небольших некодирующих РНК, обнаруживаемых как у животных, так и у растений. В настоящее время различают малые (sRNA) и микро (miRNA) [24, 25, 30, 32].

Метилирование ДНК контролирует все генетические процессы (репликация ДНК, репарация, рекомбинация, транскрипция и др.) [2].

Представляет интерес изучение изменений в профилях метилирования ДНК, происходящих под влиянием загрязнения, связанного с деятельностью промышленных предприятий. Особое место среди поллютантов занимают тяжелые металлы. Они относятся к самым распространенным загрязнителям окружающей среды [13], в частности, они содержатся в выбросах большинства стационарных источников загрязнений и автотранспорта.

При отсутствии внешних признаков угнетения индикацию состояния растительных объектов можно проводить по содержанию тяжелых элементов в фотосинтезирующих ор-

ганах [3]. Кроме того, концентрации этих загрязнителей в растениях указывают на уровень загрязнения окружающей среды [10].

Некоторые тяжелые металлы (кадмий, никель) вызывают повреждение ядра [23], нарушают синтез РНК и изменяют количество протеолитических ферментов в клетках [35]. Они способны ингибировать поступление одних элементов и увеличивать поглощение других, что ведет к разбалансировке метаболизма растений. Взаимодействие тяжелых металлов и элементов минерального питания фотосинтезирующих организмов отражается на их основных функциях, в том числе на дыхании, росте и развитии [13].

На рисе было показано, что металлы влияют на метилирование ДНК. Изменение паттернов метилирования было установлено для четырех из 6 исследованных мобильных элементов и для 11 из 12 тестируемых низкокопийных генов, кодирующих белки [31]. Во всех случаях было выявлено только гипометилирование по сайтам CHG [31, 36].

Для исследования метилирования ДНК или европейской возможно использование разных подходов и сочетание различных методов, разработанных для других живых объектов [5, 14]. Одним из широко распространенных и малозатратных является подход, основанный на использовании ферментов рестрикции. Применение этой группы методов позволяет оценить профили метилирования ДНК на геномном уровне в сайтах рестрикции конкретных рестриктаз. Детекция результатов метил-зависимой рестрикции может проводиться с применением разных методик, в том числе с помощью ПЦР.

Нами был апробирован метод MS-ISSR (methylation-sensitive ISSR), который представляет собой один из вариантов рестрикционного анализа с последующей детекцией его результатов с помощью ПЦР с межмикросателлитными праймерами (ISSR) [4]. Были использованы 2 рестриктазы-изошизомера — Msp I и Hpa II, распознающие в качестве «мишени» последовательность 5'-CCGG

и различающиеся по своей чувствительности к метилированию этого сайта рестрикции [27]. В зависимости от профиля метилирования геномной ДНК изучаемые образцы могут разделяться на четыре группы: 1) ДНК разрезается обеими рестриктазами (Msp I+/Hpa II+); 2) ДНК не разрезается ни одной из рестриктаз (Msp I–/Hpa II–); 3) ДНК разрезается Msp I, но не Hpa II (Msp I+/Hpa II–); 4) ДНК разрезается Hpa II, но не Msp I (Msp I–/Hpa II+).

Для создания ISSR-маркеров используют праймеры, комплементарные микросателлитным повторам, многочисленным и относительно равномерно распределенным по геному. Праймер содержит 4–12 единиц повтора (мотива) и имеет на одном из концов последовательность из 1–4 произволь-

ных нуклеотидов (так называемый «якорь»). Полученные ПЦР-продукты относятся к маркерам доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию/отсутствию полосы. При проведении ISSR-ПЦР между близко расположенными и инвертированными SSR-участками генерируется огромное количество ампликонов. Если геномная ДНК перед проведением ISSR-анализа будет обработана рестриктазами, разрезающими или не разрезающими один и тот же участок цепи ДНК в зависимости от его метилирования, то полученные в результате ПЦР спектры амплифицированных фрагментов отразят различия в уровне метилирования ДНК у изучаемых образцов. Принцип MS-ISSR представлен на рисунке 1.

Рис. 1. Принцип MS-ISSR (methylation-sensitive ISSR) [4]: а – метилированный сайт рестрикции 5'-mCmCGG не разрезается Msp I или Hpa II – фрагмент амплифицируется; б – деметилированный сайт 5'-CCGG служит мишенью для Msp I или Hpa II, ДНК матрица разрезается, ПЦР-фрагмент не амплифицируется

Наличие «лишнего» продукта ПЦР в трек с ДНК, предварительно обработанной Msp I, свидетельствует о метилировании внешнего цитозина в сайте рестрикции; наличие продукта ПЦР в лунке с ДНК, предварительно обработанной Hra II указывает на метилирование внутреннего цитозина. Одинаковые паттерны ДНК-фрагментов указывают на то, что в сайте рестрикции использованных эндонуклеаз метилирование отсутствует и обе рестриктазы одинаково разрезают ДНК. На синтезированных полуметилированных олигонуклеотидах было показано, что оба фермента разрезают двуцепочечную ДНК в сайте рестрикции, если метилирован третий внешний цитозин [12].

ISSR-анализ используется рядом авторов для паспортизации клоновых плантаций, идентификации ценных генотипов и естественных популяций хвойных пород [9, 11, 15, 28, 34]. Основными преимуществами ISSR-маркеров считают воспроизводимость результатов, дешевизну и простоту. К недостаткам относят трудоемкость подбора праймеров, доминантный тип наследования и наличие эффекта реамплификации.

Целью выполненной нами работы была оценка возможности использования метода MS-ISSR для характеристики профилей метилирования ДНК ели европейской в условиях антропогенного загрязнения, связанного с деятельностью металлургического предприятия, и в фоновых насаждениях.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись древостои ели европейской, находящиеся в 5 и 31 км от стационарного источника загрязнения — металлургического предприятия в г. Гатчина Ленинградской области, где ранее нами были заложены пробные площади. Контролем служили насаждения, расположенные в 31 км от г. Гатчины и в Тосненском районе.

В работе использовано 2 образца хвои (генотипы № 1 и № 2 возрастных елей) с пробных площадей на опытном объекте в 5 км от ста-

ционарного источника загрязнения и по 1 образцу (генотипы № 3 и № 4) с опытных площадей в 31 км от г. Гатчины и вблизи г. Тосно.

В хвое опытных елей ранее нами было определено содержание металлов Mn, Zn, Cu, Fe, Pb, Cr, Ni, Cd и серы (неопубликованные данные). Элементный анализ проводили по общепринятым методикам [6, 7] по аутсорсингу в ФБУ «Рослесозащита».

Известно, что комплексное влияние техногенных факторов вызывает трансформацию соотношений биофильных и техногенных элементов в органах растений [8]. Отношение концентраций Pb/Mn в хвое Н.А. Бородина предложила использовать в качестве показателя устойчивости растений к техногенному загрязнению [1]. По ее данным, на фоновой территории величина Pb/Mn у сосны составляет 0,002 и увеличивается в загрязненных насаждениях в 1,5–5 раз.

В нашем случае отношение Pb/Mn в хвое генотипов 1 и 2 составляло 0,006 и 0,009, что в 3 и 4,5 раза, соответственно, что превышало этот показатель в референсных фоновых насаждениях хвойных пород. В генотипах 3 и 4 это соотношение было равно 0,004 и 0,001. То есть у генотипа 3 показатель был в 2 раза выше референсного, у генотипа 4 — в 2 раза ниже. Хвоя ели у всех изученных деревьев не имела визуальных признаков повреждения. Поскольку для хвои ели нет установленных ПДК, повышение значения отношения Pb/Mn в хвое выше 0,002 считается маркером негативного влияния загрязнений на ели.

ДНК выделяли из хвои, хранящейся при -80°C модифицированным методом со СТАВ [33]. Измельчение хвои проводили в ступках с использованием жидкого азота. Качество выделенной ДНК проверяли с помощью спектрофотометра и электрофореза в агарозном геле. Для работы использовали образцы высокомолекулярной ДНК с соотношением поглощения A_{260}/A_{280} 1,8–1,9.

Рестрикцию 3 мкл геномной ДНК (приблизительно 300 нг) проводили в общем объеме 15 мкл, содержащем 10,25 мкл H_2O ,

1,5 мкл 10х буфера В и 0,25 мкл (1 ед.) рестриктазы (Msp I или Hpa II, ООО «СибЭнзим», Россия). Инкубирование осуществляли в течение 3 ч при 37 °С.

ПЦР-смесь объемом 15 мкл содержала 1х ПЦР-буфер, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, 0,5 мкМ праймера, 1 единицу Taq ДНК-полимеразы и 2 мкл инкубированной рестрикционной смеси, содержащей фрагменты ДНК, разрезанные одной из рестриктаз-изошизомеров (Msp I или Hpa II).

ПЦР-реакцию проводили в следующем режиме: 5 мин при 95 °С, 39 циклов (30 секунд – 95 °С, 45 секунд – Ta °С и 1 мин при 72 °С), заключительная элонгация – 10 мин при 72 °С перед охлаждением пробы до 4 °С.

Аmplифицированные фрагменты ДНК разделяли в 1,5 %-ном агарозном геле, содержащем 0,5хTBE и 0,5 мг/л этидиум бромид.

Было протестировано 7 ISSR праймеров, характеристика которых представлена в таблице 1.

Таблица 1

Последовательности ISSR-праймеров, использованных в работе

ISSR-праймер	Последовательность, 5'→3'	Температура отжига (T _a), °С*
М 2	(AC) ₈ (C/T)G	60
М 3	(GA) ₈ (C/T)C	60
М 4	(AG) ₈ (C/T)C	58
М 5	(AT) ₈	34
М 9	(GACAC) ₄	52
М 11	(CA) ₆ (A/G)	43
М 14	(GACA) ₄	54

Примечание. * – температуры отжига конкретных праймеров

Результаты исследований

Результаты ПЦР с праймером М 2 в 1,5 %-ном агарозном геле показаны на рисунке 2. Как видим, разные спектры фрагментов ДНК отмечены в генотипах 1 (пробная площадь в 5 км от предприятия) и 3 (контроль, 31 км от г. Гатчины). Стрелками отмечен продукт длиной около 450 п. н. (пар нуклеотидов), синтезированный при амплификации ДНК (генотип 1), разрезанной рестриктазой Hpa II. То есть в этом фрагменте ДНК метилирован внутренний цитозин сайта рестрикции ферментов Msp I и Hpa II: 5'-CCGG. При переваривании нативной ДНК рестриктазой Msp I этого продукта нет. При амплификации ДНК генотипа 3, напротив, продукт ПЦР длиной около 490 п.н. присутствует только в случае переваривания ДНК рестриктазой Msp I, что

указывает на метилирование внешнего цитозина в сайте рестрикции.

На рисунке 3 показаны результаты детекции рестрикционного анализа ферментами-изошизомерами Msp I и Hpa II с помощью ПЦР с ISSR-праймером М 4. Как видим, измененные паттерны фрагментов ДНК при ISSR-анализе выявлены в генотипах 1 и 2.

Результаты детекции ПЦР-продуктов с использованием праймера М 9 представлены на рисунке 4. Как видим, метилирование ДНК выявлено в генотипах 2, 3 и 4.

Визуализация результатов переваривания ДНК ферментами-изошизомерами Msp I и Hpa II с помощью ISSR-праймера М 14 показана на рисунке 5. На геле видно, что различия в спектрах фрагментов ДНК выявлены в генотипе 4.

Рис. 2. Визуализация ПЦР-продуктов при использовании праймера ISSR М 2 (1 и 14 – молекулярный стандарт 100bp; 2, 3, 8, 9 – ДНК разрезаны рестриктазой Msp I перед проведением ПЦР; 4, 5, 10, 11 – ДНК разрезаны рестриктазой Hpa II перед проведением ПЦР; 6, 7, 12, 13 – ДНК-контроль; М 2 – ISSR-маркер; (1), (2) – образцы ДНК из загрязненного насаждения; (3), (4) – образцы ДНК из контрольных насаждений)

Рис. 3. Визуализация ПЦР-продуктов при использовании праймера ISSR М 4 (1 и 14 – молекулярный стандарт 100bp; 2, 3, 8, 9 – ДНК разрезаны рестриктазой Msp I перед проведением ПЦР; 4, 5, 10, 11 – ДНК разрезаны рестриктазой Hpa II перед проведением ПЦР; 6, 7, 12, 13 – ДНК-контроль; М 4 – ISSR-маркер; (1), (2) – образцы ДНК из загрязненного насаждения; (3), (4) – образцы ДНК из контрольных насаждений)

Рис. 4. Визуализация ПЦР-продуктов при использовании праймера ISSR М 9 (1 и 14 – молекулярный стандарт 100bp; 2, 3, 8, 9 – ДНК разрезаны рестриктазой Msp I перед проведением ПЦР; 4, 5, 10, 11 – ДНК разрезаны рестриктазой Hpa II перед проведением ПЦР; 6, 7, 12, 13 – ДНК-контроль; М 9 – ISSR-маркер; (1), (2) – образцы ДНК из загрязненного насаждения; (3), (4) – образцы ДНК из контрольных насаждений)

Рис. 5. Визуализация ПЦР-продуктов при использовании праймера ISSR М 14 (1 и 14 – молекулярный стандарт 100bp; 2, 3, 8, 9 – ДНК разрезаны рестриктазой Msp I перед проведением ПЦР; 4, 5, 10, 11 – ДНК разрезаны рестриктазой Hpa II перед проведением ПЦР; 6, 7, 12, 13 – ДНК-контроль; М 14 – ISSR-маркер; (1), (2) – образцы ДНК из загрязненного насаждения; (3), (4) – образцы ДНК из контрольных насаждений)

Проанализировав полученные электрофореграммы, можно обобщить различия в использовании ISSR-праймеров для выявления профилей метилирования ДНК елей и оценить результаты их использования по следующим параметрам:

– эффективность применения – показывает для скольких генотипов ели из общего числа изученных удалось выявить факт метилирования ДНК в процентном выражении (100 % – на всех 4-х образцах, 75 % – в 3-х из 4-х образцов, 50 % – в по-

ловине образцов, 25 % – в 1-м из 4-х образцов);

– полиморфизм – выраженность обнаруженных различий полученного изображения, в баллах: 3 балла – ярко выраженные, 2 балла – выраженные, 1 балл – слабо выраженные;

– чёткость визуализации изображения (чёткое – Ч, нечёткое – Н).

В таблице 2 обобщены свойства праймеров, характеризующие их способность к выявлению различий в спектрах метилирования ДНК, на основе полученных электрофореграмм.

Таблица 2

Характеристика ISSR-праймеров по их пригодности к выявлению паттернов метилирования ДНК ели

Праймеры	Полиморфизм генотипов ели европейской				Эффективность применения, %	Чёткость визуализации
	1	2	3	4		
М 2	+/1	-	+/2	-	50	Н
М 3	-	-	-	-	0	-
М 4	+/2	+/3	-	-	50	Ч
М 5	-	-	-	-	0	-
М 9	-	+/3	+/3	+/1	75	Ч
М 11	-	-	-	-	0	-
М 14	-	-	-	+/3	25	Ч

Примечание. «+» – эффективное выявление различий, «-» – отсутствие различий.

Заключение

Таким образом, было показано, что выбранный для апробации MS-ISSR-метод пригоден для обнаружения профилей метилирования ДНК *Picea abies*. Из тестированных ISSR-праймеров наиболее эффективным оказался М 9, который выявил результат в 75 % исследований на 3-х из 4-х генотипов ели. Меньшую эффективность (50 %) имели праймеры М 2 и М 4, наиболее низкую эффективность (25 %) – праймер М 14. Не выявили различий в уровнях метилирования ДНК праймеры М 3, М 5 и

М 11. В будущих исследованиях планируется оценить эффективность отобранных праймеров на большем числе генотипов ели, и при необходимости – подобрать другие праймеры, отличающиеся высокими полиморфизмом, эффективностью применения и чёткостью визуализации изображений.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания ФБУ «СПбНИИЛХ» (№ 053-00012-21-00).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бородина, М.А. Аккумуляция тяжелых металлов хвоей сосны в урбоэкосистеме города Благовещенска / М.А. Бородина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 1 (8). – С. 1958–1962.
2. Ванюшин, Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра / Б.Ф. Ванюшин // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Том 17, № 4/2. – С. 805–832. – ISSN 2500-0462 (Print). – ISSN 2500-3259 (Online)
3. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош, Ю.В. Перуанский, Г.А. Луковникова, М.И. Иконникова; под ред. А.И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – 430 с.
4. Киселева, А.А. Методы мониторинга генетической стабильности плодовых культур в условиях криоконсервации / А.А. Киселева, В.Г. Вержук, Н.Н. Савельев, Д.С. Дорохов, Ю.В. Желтиков, О.В. Еремина, Е.К. Потокина, Н.И. Дзюбенко // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2012. – Т. 169. – СПб.: ВИР, 2012. – С. 280–288.
5. Максимова, В.П. Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков / В.П. Максимова, П.Е. Бугаева, Е.М. Жидкова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии. – 2019. – Том 6 (3). – С. 8–27.
6. Методика измерения массовых долей металлов в осадках сточных вод, донных отложениях, образцах растительного происхождения спектральными методами. ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011 / Федеральная служба по надзору в сфере природопользования. – М., 2011. – URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293793/4293793107.htm> (дата обращения: 23.07.2020)
7. Методические указания по определению серы в растениях и кормах растительного происхождения / Министерство сельского хоз-ва Рос. Федерации; [разраб.: к. с.-х. н. В.Г. Прижуковой и др.]. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004. – 8 с.
8. Неверова, О.А. Опыт использования биоиндикаторов в оценке загрязнения окружающей среды / О.А. Неверова, Н.И. Еремеева // Экология. Серия аналитических обзоров мировой литературы. – 2006. – № 80. – С. 1–88.
9. Нечаева, Ю.С. Анализ полиморфизма ISSR-PCR маркеров и генетической структуры некоторых популяций лиственницы сибирской на Урале / Ю.С. Нечаева, С.В. Боронникова, Я.В. Пришневская, Е.И. Чумак, Р.Р. Юсупов // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – С. 1385–1385.
10. Никонов, М.В. Устойчивость лесов к воздействию природных и антропогенных факторов (на примере Новгородской области) / М.В. Никонов. – Великий Новгород: НовГУ им. Ярослава Мудрого, 2003. – 296 с. – ISBN 5-900605-57-4.
11. Пришневская, Я.В. Молекулярно-генетическая идентификация популяций *Pinus sylvestris* L. на востоке Русской равнины на основании полиморфизма ISSR-маркеров / Я.В. Пришневская, В.П. Красильников, С.В. Боронникова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2016. – № 2. – С. 171–176.
12. Пятраускене, Л.Ю. Изучение взаимодействия эндонуклеаз рестрикции Msp I, Hpa II, Sma I, Xma I и Cfr9 I с синтетическими олигодезоксирибонуклеотидами, содержащими N4-метил- и 5-метилцитозин: автореф. дис. ... канд. хим. наук / Лорета Юозо Пятраускене. – М., 1992. – 18 с.
13. Титов, А.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казина [и др.]; отв. ред. Н.Н. Немова; Ин-т биологии КарНЦ. – Электрон. дан. – Петрозаводск, 2007. – 172 с. – URL: http://resources.krc.karelia.ru/ib/doc/publikacii_sotrudnikov_stojchivost_rastenij_k_tjzhelym_metallam_titov_a.f._talanova_v.v._i_dr_2007.pdf (дата обращения: 17.01.2020).
14. Филина, Ю.В. Методы анализа метилирования ДНК / Ю.В. Филина, А.Г. Габдулхакова, М.И. Арлеевская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 8. – С. 15–18. – ISSN 0869-2084.

15. Шейкина, О.В. Разработка методики идентификации клонов плюсовых деревьев ели обыкновенной (*Picea abies* L.) с использованием ISSR маркеров / О.В. Шейкина, А.А. Прохорова, П.С. Новиков, Т.Н. Криворотова // Научный журнал КубГАУ. – 2012. – № 83. – С. 1–14. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodiki-identifikatsii-klonov-plyusov-uh-dereviev-eli-obyknovennoy-picea-abies-l-s-ispolzovaniem-issr-markero> (дата обращения: 24.09.2021)
16. Alakarppa, E. Natural variation of DNA methylation and gene expression may determine local adaptations of Scots pine populations / E. Alakarppa, H.M. Salo, L. Valledor [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2018. – Vol. 69 (21). – P. 5293–5305.
17. Alatzas, A. Distribution of ubiquitinated histone H2A during plant cell differentiation in maize root and dedifferentiation in callus culture / A. Alatzas, A. Foundouli // Plant Science. – 2006. – Vol. 171 (4). – P. 481–487.
18. Asselman, J. Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction / J. Asselman, D.I.M. De Coninck, M.B. Vandegheuchte [et al.] // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2015. – Vol. 34 (5). – P. 1056–1061.
19. Erturk, F.A. Effects of Lead Sulfate on Genetic and Epigenetic Changes, and Endogenous Hormone Levels in Corn (*Zea mays* L.) / F.A. Erturk, G. Agar, E. Arslan [et al.] // Polish Journal of Environmental Studies. – 2014. – Vol. 23 (6). – P. 1925–1932.
20. Fuchs, J. Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity / J. Fuchs, D. Demidov, A. Houben [et al.] // Trends in Plant Science. – 2006. – Vol. 11 (4). – P. 199–208.
21. Heer, K. Detection of somatic epigenetic variation in Norway spruce via targeted bisulfite sequencing / K. Heer, K.K. Ullrich, M. Hiss [et al.] // Ecology and Evolution. – 2018. – Vol. 8 (19). – P. 9672–9682.
22. Houben, A. Phosphorylation of histone H3 in plants – A dynamic affair / A. Houben, D. Demidov, A.D. Caperta [et al.] // Biochimica Et Biophysica. – 2007. – Vol. 1769 (5–6). – P. 308–315.
23. Liu, D. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic / D. Liu, W. Jiang, X. Gao // Biol. Plant. – 2003/4. – Vol. 47, No. 1. – P. 79–83.
24. Liu, Y. Global Analysis of Small RNA Dynamics during Seed Development of *Picea glauca* and *Arabidopsis thaliana* Populations Reveals Insights on their Evolutionary Trajectories / Y. Liu, Y.A. El-Kassaby. – DOI: 10.3389/fpls.2017.01719 // Frontiers in Plant Science. – Электрон. дан. – 2017. – Vol. 8. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29046688/> (дата обращения: 23.03.2020).
25. Liu, Y. Techniques for Small Non-Coding RNA Analysis in Seeds of Forest Tree Species / Y. Liu, Y.A. El-Kassaby // Methods in molecular biology. – 2020. – Vol. 2093. – P. 217–225.
26. Mahrez, W. H3K36ac Is an Evolutionary Conserved Plant Histone Modification That Marks Active Genes / W. Mahrez, M.S.T. Arellano, J. Moreno-Romero [et al.] // Plant Physiology. – 2016. – Vol. 170 (3). – P. 1566–1577. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26764380/> (дата обращения: 03.03.2020).
27. McClelland, M. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases / M. McClelland, M. Nelson, E. Raschke // Nucleic acids research. – 1994. – Vol. 22, № 17. – P. 3640–3659.
28. Nkongolo, K.K. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids / K.K. Nkongolo, P. Michael, T. Demers // Genome. – 2005. – T. 48, № 2. – C. 302–311.
29. Ohlsson, A.B. UV-B Exposure of Indoor-Grown *Picea abies* Seedlings Causes an Epigenetic Effect and Selective Emission of Terpenes / A.B. Ohlsson, P. Segerfeldt, A. Lindstrom [et al.] // Z. Naturforsch C. J. Biosci. – 2013. – Vol. 68, No. 3–4. – P. 139–147. – URL: <https://www.pubfacts.com/detail/23819310/UV-B-exposure-of-indoor-grown-Picea-abies-seedlings-causes-an-epigenetic-effect-and-selective-emissi> (дата обращения: 03.03.2020).

30. Ossowski, S. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs / S. Ossowski, R. Schwab, D. Weigel // *Plant Journal*. – 2008. – Vol. 53 (4). – P. 674–690.
31. Ou, X. Transgenerational Inheritance of Modified DNA Methylation Patterns and Enhanced Tolerance Induced by Heavy Metal Stress in Rice (*Oryza sativa* L.) / X. Ou, Y. Zhang, C. Xu [et al.]. – DOI: 10.1371/journal.pone.0041143 // *Plos One*. – Электрон. журн. – 2012. – Vol. 7 (9). – URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041143>. – Дата публикации: 11.09.2012.
32. Patel, P. Plant miRNAome: Cross Talk in Abiotic Stressful Times / P. Patel, K. Yadav, T.R. Ganapathi [et al.]. – DOI: 10.1007/978-3-319-91956-0_2 // *Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches* / V.R. Rajpal, D. Sehgal, A. Kumar, S.N. Raina (Eds.). – Электрон. дан. – 2019. – Vol. I. – P. 25–52. – URL: https://www.researchgate.net/publication/332595630_Plant_miRNAome_Cross_Talk_in_Abiotic_Stressful_Times (дата обращения: 23.03.2020). – Загл. с экрана. – Яз. англ.
33. Rahimah, A.R. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA / A.R. Rahimah, S.C. Cheah, S. Rajinder // *J. Oil Palm Res.* – 2006. – Vol. 18. – P. 296–304. – ISSN 1511-2780.
34. Ramya, N. Genetic variation in *Picea mariana* × *P. rubens* hybrid populations assessed with ISSR and RAPD markers / N. Ramya, N. Kabwe // *American Journal of Plant Sciences*. – 2012. – Vol. 3 (6). – P. 731–737.
35. Shah, K. Cadmium elevates level of protein, amino acids and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds / K. Shah, R.S. Dubey // *Acta Physiol. Plant.* – 1998. – Vol. 20, No. 2. – P. 189–196.
36. Vandegehuchte, M.B. Epigenetics and its implications for ecotoxicology / M.B. Vandegehuchte, C.R. Janssen // *Ecotoxicology*. – 2011. – Vol. 20 (3). – P. 607–624.
37. Xia, Y. Global Lysine Acetylome Analysis of Desiccated Somatic Embryos of *Picea asperata* / Y. Xia, D.L. Jing, L.S. Kong [et al.]. – doi.org/10.3389/fpls.2016.01927 // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01927/full> (дата обращения: 03.03.2020).
38. Yakovlev, I.A. Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce / I.A. Yakovlev, E. Carneros, Y. Lee [et al.] // *Planta*. – 2016. – Vol. 243 (5). – P. 1237–1249.

REFERENCES

1. Borodina, M.A. Akkumulyaciya tyazhelych metallov khvoe' sosny' v urboe'kosisteme goroda Blagoveshhenska. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*, 2012, T. 14, no. 1(8), pp. 1958–1962. (In Russian)
2. Vanyushin B.F. Ehpigenetika segodnya i zavtra. *Vavilovskij zhurnal genetiki i seleksii*, 2013, tom 17, no. 4/2, pp. 805–832, ISSN 2500-0462 (Print). – ISSN 2500-3259 (Online). (In Russian)
3. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Yarosh N.P., Peruanskij Yu.V., Lukovnikova G.A., Ikonnikova M.I. Metody' bioximicheskogo issledovaniya rastenij, pod red. A.I. Ermakova, 3-e izd., pererab. i dop. Leningrad; 1987, 430 p. (In Russian)
4. Kiseleva A.A., Verzhuk V.G., Savel'ev N.N., Doroxov D.S., Zheltikov Yu.V., Eremina O.V., Potokina E.K., Dzyubenko N.I. Metody' monitoringa geneticheskoy stabil'nosti plodovykh kul'tur v usloviyakh kriokonservacii. *Trudy po prikladnoj botanike, genetike i selekcii*, 2012, tom 169, Saint Petersburg, 2012, pp. 280–288. (In Russian)
5. Maksimova V.P., Bugaeva P.E., Zhidkova E.M., Usalka O.G., Lesovaya E.A., Belitskij G.A., Yakubovskaya M.G., Kirsanov K.I. Sovremennyy'e podkchody' k vy'yavleniyu i izucheniyu e'pigeneticheskii aktivny'kh ksenobiotikov. *Uspexi molekulyarnoj onkologii*, 2019, tom 6 (3), pp. 8–27. (In Russian)

6. Metodika izmereniya massovykh dolej metallov v osadkach stochnykh vod, donnykh otlozheniyakh, obrazczakh rastitel'nogo proiskhozhdeniya spektral'ny'mi metodami. PND F 16.2.2:2.3.71-2011, Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere prirodopol'zovaniya, Moscow, 2011, URL: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293793/4293793107.htm> (In Russian)
7. Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu sery' v rasteniyakh i kormakh rastitel'nogo proiskhozhdeniya. M-vo sel. khoz-va Ros. Federacii, [razrab.: k. s.-kch. n. V.G. Prizhukovoj i dr.]. Moscow, 2004, 8 p. (In Russian)
8. Neverova O.A., Eremeeva N.I. Opyt ispol'zovaniya bioindikatorov v ocenke zagryazneniya okruzhayushchej sredy. *Ekologiya. Seriya analiticheskikh obzorov mirovoj literatury*, 2006, no. 80, pp. 1–88. (In Russian)
9. Nechaeva Yu.S., Boronnikova S.V., Prishnivskaya Ya.V., Chumak E.I., Yusupov R.R. Analiz polimorfizma ISSR-PCR markerov i geneticheskoy struktury' nekotorykh populyacij listvennicy sibirskoj na Urale. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*, 2014, no. 6, pp. 1385–1385. (In Russian)
10. Nikonov M.V. Ustojchivost' lesov k vozdejstviyu prirodnykh i antropogennykh faktorov (na primere Novgorodskoj oblasti). Velikij Novgorod, 2003, 296 p., ISBN 5-900605-57-4. (In Russian)
11. Prishnivskaya Ya.V., Krasil'nikov V.P., Boronnikova S.V. Molekulyarno-geneticheskaya identifikaciya populyacij *Pinus sylvestris* L. na vostoке Russkoj ravniny' na osnovanii polimorfizma ISSR-markerov. *Vestnik Permskogo universiteta. Seriya Biologiya*, 2016, no. 2, pp. 171–176. (In Russian)
12. Pyatrauskene L.Yu. Izuchenie vzaimodejstviya e'ndonukleaz restrikcii Msp I, Hpa II, Sma I, Xma I i Cfr9 I s sinteticheskimi oligodezoksiribonukleotidami, sodержashhimi N4-metil- i 5metilcitozin, avtoref. dis. ... kand. khim. nauk, Moscow, 1992, 18 p. (In Russian)
13. Titov A.F., Talanova V.V., Kazina N.M., Lajdinen G.F. Ustojchivost' rastenij k tyazhely'm metallam, otv. red. N.N. Nemova, In-t biologii KarNCz, Petrozavodsk, 2007, 172 p., URL: http://resources.krc.karelia.ru/ib/doc/publikacii_sotrudnikov/stojchivost_rastenij_k_tjazhelym_metallam_titov_a.f._talanova_v.v._i_dr._2007.pdf (In Russian)
14. Filina Yu.V., Gabdulxakova A.G., Arleevskaya M.I. Metody' analiza metilirovaniya. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2012, no. 8, pp. 15–18, ISSN 0869-2084. (In Russian)
15. Shejkina O.V., Proxorova A.A., Novikov P.S., Krivorotova T.N. Razrabotka metodiki identifikacii klonov plyusovykh derev'ev eli oby'knovennoj (*Picea abies* L.) s ispol'zovaniem ISSR markerov. *Nauchnyj zhurnal KubGAU*, 2012, no. 83, pp. 1–14. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodiki-identifikatsii-klonov-plyusov-yh-dereviev-eli-obyknovennoj-picea-abies-l-s-ispolzovaniem-issr-markerov> (In Russian)
16. Alakarppa E., Salo H.M., Valledor L., Cañal M.J., Häggman H., Vuosku J. [Natural variation of DNA methylation and gene expression may determine local adaptations of Scots pine populations. *Journal of Experimental Botany*, 2018, vol. 69 (21), pp. 5293–5305.
17. Alatzas A., Foundouli A. Distribution of ubiquitinated histone H2A during plant cell differentiation in maize root and dedifferentiation in callus culture. *Plant Science*, 2006, vol. 171 (4), pp. 481–487.
18. Asselman J., De Coninck D.I.M., Vandegehuchte M.B., Jansen M., Decaestecker E., De Meester L., Vanden Bussche J., Vanhaecke L., Janssen C.R., De Schamphelaere K.A.C. Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2015, vol. 34 (5), pp. 1056–1061.
19. Erturk, F.A. Agar G., Arslan E., Nardemir G., Aydin M., Taspinar M.S. Effects of Lead Sulfate on Genetic and Epigenetic Changes, and Endogenous Hormone Levels in Corn (*Zea mays* L.). *Polish Journal of Environmental Studies*, 2014, vol. 23 (6), pp. 1925–1932.

20. Fuchs J., Demidov D., Houben A., Schubert I. Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends in Plant Science*, 2006, vol. 11 (4), pp. 199–208.
21. Heer K., Ullrich K.K., Hiss M., Liepelt S., Brüning R.S., Zhou J., Opgenoorth L., Rensing S.A. Detection of somatic epigenetic variation in Norway spruce via targeted bisulfite sequencing. *Ecology and Evolution*, 2018, vol. 8 (19), pp. 9672–9682.
22. Houben A., Houben A., Demidov D., Caperta A.D., Karimi R., Agueci F., Vlasenko L. Phosphorylation of histone H3 in plants – A dynamic affair. *Biochimica Et Biophysica*, 2007, vol. 1769 (5–6), pp. 308–315.
23. Liu D., Jiang W., Gao X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Biol. Plant.*, 2003/4, vol. 47, no. 1, pp. 79–83.
24. Liu Y., El-Kassaby Y.A. Global Analysis of Small RNA Dynamics during Seed Development of *Picea glauca* and *Arabidopsis thaliana* Populations Reveals Insights on their Evolutionary Trajectories. DOI: 10.3389/fpls.2017.01719. *Frontiers in Plant Science*, 2017, vol. 8, URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29046688/>
25. Liu Y., El-Kassaby Y.A. Techniques for Small Non-Coding RNA Analysis in Seeds of Forest Tree Species. *Methods in molecular biology*, 2020, vol. 2093, pp. 217–225. publication/332595630_Plant_miRNAome_Cross_Talk_in_Abiotic_Stressful_Times
26. Mahrez W., Arellano M.S.T., Moreno-Romero J., Nakamura M., Shu H., Nanni P., Köhler C., Gruissem W., Hennig L. H3K36ac Is an Evolutionary Conserved Plant Histone Modification That Marks Active Genes, *Plant Physiology*, 2016, vol. 170(3), pp. 1566–1577, URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26764380/>.
27. McClelland M., Nelson M., Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic acids research*, 1994, vol. 22, no. 17, pp. 3640–3659.
28. Nkongolo K.K., Michael P., Demers T. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids. *Genome*, 2005, v. 48, no. 2, pp. 302–311.
29. Ohlsson A.B., Segerfeldt P., Lindstrom A., Borg-Karlson A. K., Berglund T. UV-B Exposure of Indoor-Grown *Picea abies* Seedlings Causes an Epigenetic Effect and Selective Emission of Terpenes. *Z. Naturforsch C. J. Biosci*, 2013, vol. 68, no. 3–4, pp. 139–147, URL: <https://www.pubfacts.com/detail/23819310/UV-B-exposure-of-indoor-grown-Picea-abies-seedlings-causes-an-epigenetic-effect-and-selective-emissi>.
30. Ossowski S., Schwab R., Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant Journal*, 2008, vol. 53 (4), pp. 674–690.
31. Ou X., Zhang Y., Xu C., Lin X. Zang Q., Zhuang T., Jiang L., von Wettstein D., Liu B. Transgenerational Inheritance of Modified DNA Methylation Patterns and Enhanced Tolerance Induced by Heavy Metal Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). DOI: 10.1371/journal.pone.0041143, PLOS One, 2012, Vol. 7 (9), URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041143>.
32. Patel P., Yadav K., Ganapathi T.R., Penna S. Plant miRNAome: Cross Talk in Abiotic Stressful Times. DOI: 10.1007/978-3-319-91956-0_2. *Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches*, V.R. Rajpal, D. Sehgal, A. Kumar, S.N. Raina (Eds.), 2019, vol. I, pp. 25–52. URL: <https://www.researchgate.net/>
33. Rahimah A.R., Cheah S.C., Rajinder S. Freeze-drying of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf and its effect on the quality of extractable DNA. *J. Oil Palm Res*, 2006, vol. 18, pp. 296–304, ISSN 1511-2780.
34. Ramya N. , Kabwe N. Genetic variation in *Picea mariana* × *P. rubens* hybrid populations assessed with ISSR and RAPD markers. *American Journal of Plant Sciences*, 2012, vol. 3 (6), pp. 731–737.
35. Shah K., Dubey R.S. Cadmium elevates level of protein, amino acids and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds. *Acta Physiol. Plant.*, 1998, vol. 20, no. 2, pp. 189–196.

36. Vandegheuchte M.B., Janssen C.R. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology*, 2011, vol. 20 (3), pp. 607–624.
37. Xia Y., Jing D.L., Kong L.S., Zhang J., OuYang F., Zhang H., Wang J., Zhang S. Global Lysine Acetylome Analysis of Desiccated Somatic Embryos of *Picea asperata*. doi.org/10.3389/fpls.2016.01927, *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol. 7, URL: [https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01927/ full](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01927/full).
38. Yakovlev, I.A., Carneros. E., Lee Y., Olsen J.E., Fossdal C.G. Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. *Planta*, 2016, vol. 243 (5), pp. 1237–1249.

Статья поступила в редакцию 29.10.2021