



DOI 10.21178/2079-6080.2023.1.4  
УДК 630.174.755:575.17:582.475:630.425

## Изучение профилей метилирования ДНК ели европейской в зоне техногенного загрязнения методами MS-ISSR и MS-PCR

© Д.С. Каржаев<sup>1,2</sup>, А.И. Баранова<sup>1,2</sup>, Г.В. Калько<sup>1</sup>

---

### The study of DNA methylation profiles of Norway spruce in the zone of technogenic pollution by MS-ISSR and MS-PCR methods

D.S. Karzhaev, A.I. Baranova, G.V. Kalko (Saint Petersburg State Forest Technical University; Saint Petersburg Forestry Research Institute)

In recent decades, the world community has been making efforts to reduce the level of man-made emissions. The most dangerous pollutants are heavy metals (HM), which are contained in the emissions of most industries. HM have a cumulative effect and are practically not removed from ecosystems. The aim of the study was to investigate the profiles of DNA methylation in selected genes (sequences) in spruces growing on contaminated and control plots. The plots were located along the same azimuth, taking into account the wind rose, at different distances from the metallurgical enterprise in Gatchina, Leningrad Region, and characterized by the content of metals Pb, Cu, Cd, Fe, Ni, Cr, Mn, and Zn and ratios of biophilic and toxic metals in the needles of spruces. DNA from needle samples was isolated by the CTAB method. Methylation was studied by MS-ISSR and MS-PCR methods based on the ability of *Msp* I and *Hpa* II endonucleases to recognize the same restriction site: 5'-CCGG. The enzymes differ in their sensitivity to methylation of this site. Detection of genomic DNA restriction results was performed using monomorphic ISSR primers, primers to the fragment of *PaLAR3* gene promoter and to the predicted with the TSSP and TSSPlant programs promoters of three genes. *PaLAR3* gene is encoding the leucoanthocyanidin reductase enzyme. It is also involved in the mechanisms of resistance against the fungus *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies*. It was shown that *PaLAR3* can be considered as a candidate gene for studying the methylation profiles in spruce from contaminated and control plots in natural forest.

**Key words:** Norway spruce, DNA methylation profiles, restriction, *Msp* I, *Hpa* II, ISSR, heavy metal, promoter, TSSP, TSSPlant

### Изучение профилей метилирования ДНК ели европейской в зоне техногенного загрязнения методами MS-ISSR и MS-PCR

Д.С. Каржаев, А.И. Баранова, Г.В. Калько

В последние десятилетия мировое сообщество прилагает усилия для снижения уровня техногенных выбросов. Наиболее опасными загрязнителями являются тяжелые металлы, которые содержатся в выбросах большинства отраслей промышленности. Они обладают кумулятивным эффектом и практически не выводятся из экосистем, оказывая влияние на состав сообществ, генетическое разнообразие видов и проявляя цитотоксическое действие. Эпигенетические реакции лесобразующего вида ели европейской на загрязнение тяжелыми металлами исследованы в недостаточной степени. Целью настоящей работы было изучение профилей метилирования ДНК в отобранных генах (последовательностях) у елей, растущих на загрязненных и контрольных территориях. Пробные площади были расположены по одному азимуту с учетом розы ветров, на разном расстоянии от металлургического предприятия в г. Гатчине Ленинградской области. Загрязненность насаждений опытных участков охарактеризована по содержанию металлов Pb, Cu, Cd, Fe, Ni, Cr, Mn и Zn и отношениям биофильных и токсичных металлов в хвое елей. ДНК из хвои выделяли классическим методом СТАВ (cetyl trimethyl ammonium bromid) с модификациями. Метилирование изучали методами MS-ISSR и MS-PCR, основанными на способности эндонуклеаз *Msp* I и *Hpa* II узнавать один и тот же сайт рестрикции: 5'-CCGG. При этом ферменты отличаются по чувствительности к метилированию этого сайта. Детекцию результатов рестрикции геномной ДНК проводили с использованием мономорфных ISSR-праймеров, праймеров к фрагменту промотора гена *PaLAR3*, кодирующего фермент лейкоантоцианидин-редуктазу, и промоторов генов, предсказанных с помощью программ TSSP и TSSPlant. Нами показано, что промотор гена *PaLAR3*, кодирующего фермент лейкоантоцианидин-редуктазу и вовлеченного в механизмы устойчивости к грибу *Heterobasidion parviporum*, можно рассматривать как ген-кандидат для исследования реакций ели европейской на загрязнение тяжелыми металлами, в частности для изучения профилей метилирования у елей из загрязненных и контрольных насаждений.

**Ключевые слова:** ель европейская, профили метилирования ДНК, рестрикция, *Msp* I, *Hpa* II, ISSR, тяжелые металлы, промотор, TSSP, TSSPlant

Каржаев Дмитрий Сергеевич – специалист исследовательской лаборатории ФБУ «СПбНИИЛХ»; студент (магистратура) Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета им. С.М. Кирова

Баранова Алёна Ивановна – лаборант-исследователь исследовательской лаборатории ФБУ «СПбНИИЛХ»; студент (бакалавриат) Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета им. С.М. Кирова

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией ФБУ «СПбНИИЛХ», канд. биол. наук  
E-mail: gkalko@spb-niilh.ru

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова»  
194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., 5  
Телефон: +7 (812) 670-92-46

<sup>2</sup>ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»  
194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21  
Телефон: (812) 552-80-21, Факс: (812) 552-80-42