

А.П. КРАВЕЦ, Д.А. СОКОЛОВА,  
Г.С. ВЕНГЖЕН, Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ

Институт клеточной биологии и генетической инженерии  
НАН Украины, Киев  
E-mail: kaplibra@gmail.com

## ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ ПРИ ФРАКЦИОНИРОВАННОМ УФ-С ОБЛУЧЕНИИ



*Изучена связь изменений профиля метилирования функционально различных последовательностей ДНК и выхода хромосомных aberrаций в условиях фракционированного УФ-С облучения (дозы 6,2–9 кДж/м<sup>2</sup>). Для оценки изменения профиля метилирования сателлитной и транскрибируемой последовательностей ДНК использовано сочетание рестрикционного анализа с рестриктазами HpaII, MspI, MboI и последующей постановки ПЦР с праймерами internal transcribed space – ITS1(19b), ITS4(20b) и inter simple sequence repeat – ISSR(14b). Полученные результаты свидетельствуют об изменениях в профиле метилирования сателлитной и транскрибируемой последовательностей ДНК при облучении в режиме фракционирования и в зависимости от временного интервала между фракциями. Обсуждается возможная роль изменений в профилях метилирования ДНК как в развитии повреждения, так и в формировании индуцибельных защитных реакций при действии стрессовых факторов.*

© А.П. КРАВЕЦ, Д.А. СОКОЛОВА, Г.С. ВЕНГЖЕН,  
Д.М. ГРОДЗИНСКИЙ, 2013

**Введение.** Метилирование ДНК – один из важнейших и полифункциональных механизмов биологической регуляции, играющий ключевую роль в ряде эпигенетических процессов: геномном импринтинге, дифференцировке, апоптозе и морфогенезе, старении организма, регуляции активности мобильных элементов [1–4]. Известно также, что метилирование цитозина является природным фактором мутагенеза [3] и одновременно фактором стабилизации пространственной структуры ДНК, что необходимо для успешного прохождения ферментативных процессов, связанных со считыванием информации и репарацией.

Растения занимают первое место по относительному содержанию метилированного цитозина (до 30 %); метилирование ДНК у этих организмов происходит с участием четырех классов метилтрансфераз [3], обеспечивая обилие и большое разнообразие сайтов метилирования. Это может играть ключевую роль в реакциях на действие стрессовых факторов, поскольку в альтернативе «бежать или сражаться» решающей стратегией растительных организмов является «сражение» на всех уровнях организации. В ряде исследований последних лет показано изменение уровня и профиля метилирования ДНК при биотическом [4, 5] и различных формах абиотического стресса – засухе [4], засолении [4–7], радиационных воздействиях разной интенсивности [8–13] и продолжительности [8, 12, 13].

Реакция организмов на действие стрессовых факторов является системным процессом, объединяющим развитие повреждения, полное или частичное восстановление исходного состояния, а также изменения в чувствительности к последующему действию стрессового фактора, что проявляется либо в адаптации, либо в сенсibilизации организма.

Изменение чувствительности организма к стрессовым факторам, ее снижение или повышение также включают в себя разнообразные реакции, вовлечение которых в этот процесс зависит от интенсивности, продолжительности и/или периодичности действия фактора. Сложность взаимодействия этих составляющих реакции на стресс связана также с иерархической – структурной и функциональной – организацией организма, в котором

различные процессы и структуры обладают разной чувствительностью и временем ее изменения. Полифункциональность процесса метилирования ДНК также допускает различные формы его участия как в развитии повреждения (например, активизация мобильных элементов, инициализация нестабильности генома), так и в формировании активных защитных реакций, связанных с перестройкой метаболизма. Таким образом, надежно установленные изменения уровня и/или профиля метилирования ДНК при действии разнообразных стрессовых факторов [4–13] еще требуют дальнейшего уточнения биологического значения этих изменений. Одним из первых и необходимых этапов изучения возможной роли этого процесса в реакциях на стресс вообще и в формировании адаптивных реакций в частности является оценка изменений профиля метилирования у различных по своей функции последовательностей ДНК – сателлитных и транскрибируемых – при повторяющихся воздействиях.

Настоящая работа посвящена исследованию изменений в профиле метилирования различных функциональных последовательностей ДНК проростков кукурузы при фракционированном УФ-С облучении с различными интервалами между фракциями. Оценка профиля метилирования проведена в сопоставлении с выходом хромосомных aberrаций в меристематических тканях, что позволяет оценить направленность изменений в чувствительности растительного организма.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на семенах и 3–7-дневных проростках кукурузы, сорт Титан. Семена проращивали на поддонах с увлажненной фильтровальной бумагой, в термостате при температуре 23–24 °С. Использовали облучатель бактерицидный ОБН-150М (Украина) с лампами Philips Special TUV-30W. Трехсуточные проростки подвергали фракционированному УФ-С облучению в дозах 6,2–9 кДж/м<sup>2</sup> (мощность дозы 6,2 Вт/м<sup>2</sup>) с различными временными интервалами между фракциями от 1 ч до 1 сут.

В качестве материала для цитогенетических исследований использовали апикальную меристему корня. Отбор проб для цитогене-

тического анализа проводили на 1, 2, 3, 4-е сутки после облучения. После отделения от корня апексы помещали в фиксатор Бродского (уксусная кислота : этиловый спирт : формалин – 0,3:1:3) на 2 ч, затем отмывали 70%-ным этиловым спиртом (3–4 смены). Мацерацию осуществляли с помощью щелочного гидролиза 20 % NaOH на протяжении 2 ч. Затем препараты 15 мин отмывали дистиллированной водой.

Окраску проводили смесью ацетоорсеина и соляной кислоты (ацетоорсеин : 1 М HCl – 1:1) в течение 16–18 ч. Окрашенный материал промывали 45%-ной CH<sub>3</sub>COOH, затем готовили давленные препараты. Использовали по 10 параллельных проб и анализировали по 5–10 тыс. клеток. С учетом специфики растительных тканей определение хромосомных aberrаций осуществляли анафазно-телофазным методом, при этом выборка клеток в анафазе каждого препарата составляла не менее 300–350.

ДНК выделяли из побегов шестисуточных проростков кукурузы СТАБ-методом [4], модифицированным для этой культуры, депротеинизацию проводили смесью фенол : хлороформ в соотношении 1:1 [15].

Измерения концентрации полученного раствора ДНК осуществляли на спектрофотометре BioPhotometer Plus Eppendorf v.1.35 с использованием стандартной методики [16].

ПЦР проводили в четырехканальном ДНК-амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», РФ). Использованы праймеры к минисателлитным последовательностям ISSR (15-soro, последовательность 5'-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-AC-3'), а также праймеры к транскрибируемыми последовательностям ITS1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') и ITS4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3'). Оба типа праймеров синтезированы фирмой «Metabion» (Германия).

Реакционная смесь для ISSR-PCR объемом 50 мкл содержала 1,25 ед. Taq-полимеразы (recombinant), 5 мкл 10×Taq-Buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM каждого dNTP, 0,5 мкМ праймера, 1,5 мкг тотальной геномной ДНК, 28,7 мкл деионизированной воды. Смесь покрывали 20 мкл вазелинового масла [17]. Амплификация с ISSR-праймерами включала следующие

этапы: начальная денатурация 5 мин при 94 °С, 40 циклов; денатурация при 94 °С – 45 с, температура отжига 52 °С – 45 с, элонгация при 72 °С – 90 с; конечная элонгация продолжалась 7 мин при 72 °С [18].

Реакционная смесь для ITS-PCR объемом 50 мкл содержала 1,25 ед. Taq-полимеразы (recombinant), 5 мкл 10×Taq-Buffer, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ каждого dNTP, 0,5 мкМ каждого праймера, 1,5 мкг тотальной геномной ДНК, 26,2 мкл деионизированной воды. Смесь также покрывали 20 мкл вазелинового масла [17]. ПЦР при использовании ITS-праймеров включала следующие этапы: начальную денатурацию в течение 1,5 мин при 94 °С, 5 циклов; далее следуют дополнительно 40 циклов денатурации при 94 °С – 15 с; отжиг при температуре 55 °С – 15 с и элонгация при 72 °С – 15 с, затем «закрепление»: денатурация при 94 °С – 10 с, температура отжига 55 °С – 10 с; элонгация при 72 °С – 10 с, конечная элонгация 5 мин при 72 °С [17].

Реакцию рестрикции, как и реакцию амплификации, проводили в четырехканальном ДНК-амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», РФ). Использовали два типа рестриктаз-изошизомеров: HpaII (5'.CCGG.3') и MspI (5'.CCGG.3') и рестриктазу MboI («Fermentas», Германия). Пользовались стандартными протоколами проведения рестрикционного анализа фирмы-поставщика.

Реакционная смесь для рестрикционного анализа HpaII объемом 25 мкл содержала 0,2 ед. фермента (0,3 мкл), 2,0 мкл 10×Buffer Tango, 1,5 мкг общей геномной ДНК (5 мкл), 17,7 мкл деионизированной воды. Смесь покрывали 20 мкл вазелинового масла.

Реакция рестрикции с ферментом MspI проходила в объеме 25 мкл, содержала 0,6 ед. фермента (0,9 мкл), 2,0 мкл 10×Buffer Tango, 1,5 мкг тотальной геномной ДНК (5 мкл), 17,1 мкл деионизированной воды. Смесь покрывали 20 мкл вазелинового масла.

Реакционная смесь для рестрикционного анализа с ферментом MboI общим объемом 25 мкл содержала 0,2 ед. фермента (0,3 мкл), 2,0 мкл 10×Buffer Tango, 1,5 мкг общей геномной ДНК (5 мкл), 17,7 мкл деионизированной воды. Смесь также покрывали 20 мкл вазелинового масла.

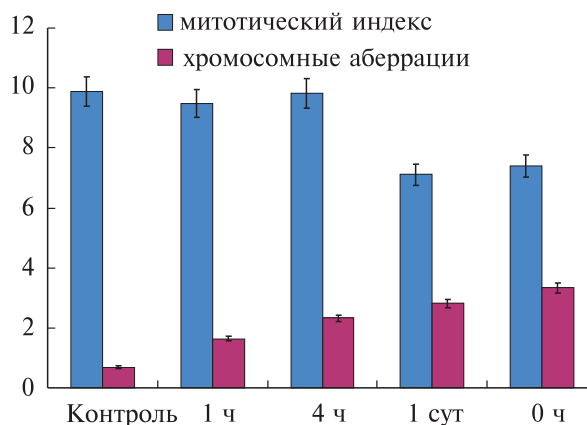
#### Рестриктазы и сайты узнавания/рестрикции

MspI	5'С...С*СG, С...5'
HpaII	5'...С*СGG...3' 3'G...G С*С...5'
MboI	5'...С*СGC...3' 3'...СТ...AG *С...5'

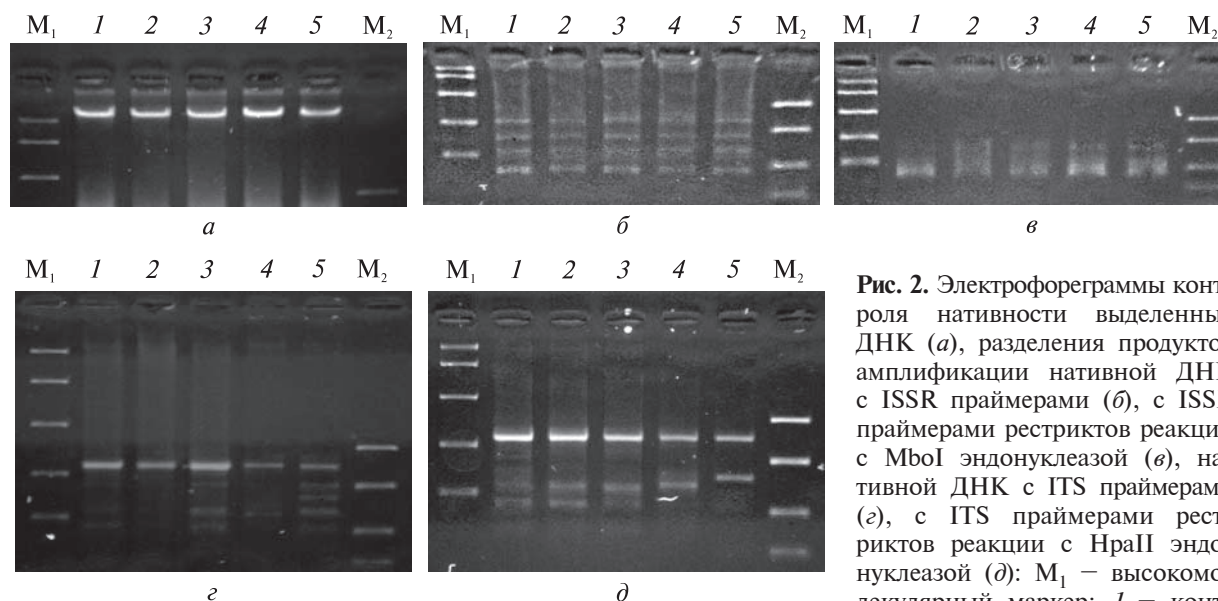
Условия проведения реакции рестрикции: 16 ч при 37 °С, остановка реакции – 20 мин при 65 °С (для HpaII и MboI) и 20 мин при 80 °С (для MspI).

Полученные продукты ПЦР и рестрикционного анализа разделяли в 1%-ном агарозном геле с TBE-буфером в присутствии бромистого этидия и визуализировали на UV-транслюминаторе. При постановке электрофореза в карманы геля вносили одинаковый объем продуктов ПЦР и рестрикции на 10 мкл. В качестве маркера молекулярной массы использовали FastRuler High Range DNA Ladder («Fermentas») с фрагментами длиной 10000, 4000, 2000, 1000 и 500 пар нуклеотидов и FastRuler Low Range DNA Ladder («Fermentas») с фрагментами длиной 1500, 850, 400, 200 и 50 пар нуклеотидов.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Полученные цитогенетические результаты (рис. 1) свидетельствуют о проявлении эффекта фракционирования, который заключается в том, что суммарное повреждение от последовательных фракций облучения оказы-



**Рис. 1.** Митотический индекс и выход хромосомных aberrаций (по вертикали, %) при фракционированном УФ-С облучении в дозе 7,2 кДж/м<sup>2</sup> и различными интервалами между фракциями (по горизонтали)



**Рис. 2.** Электрофореграммы контроля нативности выделенных ДНК (а), разделения продуктов амплификации нативной ДНК с ISSR праймерами (б), с ISSR праймерами рестриков реакции с MboI эндонуклеазой (в), нативной ДНК с ITS праймерами (г), с ITS праймерами рестриков реакции с HpaII эндонуклеазой (д): M<sub>1</sub> – высокомолекулярный маркер; 1 – контроль; 2 – интервал между фракциями 1 ч; 3 – 4 ч; 4 – 1 сут; 5 – облучение в полной дозе или интервал между фракциями 0 ч; M<sub>2</sub> – низкомолекулярные маркеры

роль; 2 – интервал между фракциями 1 ч; 3 – 4 ч; 4 – 1 сут; 5 – облучение в полной дозе или интервал между фракциями 0 ч; M<sub>2</sub> – низкомолекулярные маркеры

вается ниже эффекта при облучении в суммарной дозе, действующей одновременно; иными словами, при последовательных воздействиях наблюдается снижение чувствительности объекта по этому показателю. Указанный эффект, однако, выражен в различной степени в зависимости от временного интервала между фракциями. Интерпретация этого явления должна учитывать не только возможности изменений в активности защитных и репарационных процессов, наступивших после первого облучения, но и особенности образовательных тканей растений.

Меристема является тканью, гетерогенной по нескольким показателям. Во-первых, это асинхронная популяция с достаточно равномерным распределением клеток по клеточному циклу, находящихся в различных функциональных состояниях и в связи с этим обладающих различной радиочувствительностью. Во-вторых, в меристеме находятся так называемые покоящиеся клетки, к которым относятся ствольные клетки центра покоя и небольшой пул клеток, распределенных в меристеме диффузно [19]. Существенно, что ослабление эффекта облучения выражено сильнее при интервалах между фракциями 1 и 4 ч, чем при интервале 1 сут. Если бы измене-

ние чувствительности меристематической ткани было связано только со стимуляцией защитных и репарационных процессов однородной популяции пролиферирующих клеток, то, очевидно, следовало бы ожидать монотонного возрастания этого показателя. Наблюдающееся повышение чувствительности может свидетельствовать о воздействии второй фракции (через 1 сут) на группу клеток, перешедших синхронно к активному делению из покоящихся состояний и обладающих в связи с этим высокой чувствительностью к УФ-С облучению. Таким образом, наблюдающийся эффект фракционирования обуславливается взаимодействием по крайней мере двух групп факторов. Во-первых, последовательные фракции облучения воздействуют на группы клеток асинхронной клеточной популяции, находящиеся изначально в различных по чувствительности фазах цикла и в связи с этим оказавшиеся поврежденными в разной степени. При интервале между фракциями, равном 1 сут, возможен синхронный переход к делению покоящихся клеток, что делает эту популяцию клеток весьма уязвимой. Во-вторых, возможно в зависимости от разной степени повреждения хромосом в изначально различных по чувствительности клет-

ках в разной степени будут происходить и последующие изменения их чувствительности, требующие или не требующие эпигенетических перестроек.

На рис. 2, *а* приведены электрофореграммы контроля нативности выделенной ДНК. Этот результат, наблюдающийся для всех вариантов опыта, свидетельствует об отсутствии значимой фрагментации ДНК в результате прямого УФ-С воздействия в достаточно высоких дозах и/или возможной инициации апоптоза этим видом воздействия.

Электрофореграмма разделения продуктов амплификации нативной ДНК с ISSR праймерами (рис. 2, *б*) свидетельствует об отсутствии различий между контролем и всеми вариантами опыта независимо от условий облучения.

Электрофореграммы разделения продуктов амплификации рестрикетов реакции с MboI эндонуклеазой (рис. 2, *в*) показывают незначительные различия в профиле метилирования контрольных и облученных образцов. Наиболее явные различия, которые проявляются в появлении ампликонов с большей молекулярной массой, наблюдаются между контролем и вариантами, соответствующими облучению в полной дозе и фракционированному облучению через сутки. Они могут свидетельствовать об уменьшении числа сайтов рестрикции MboI эндонуклеазы. При сопоставлении этого результата с данными цитогенетического анализа (рис. 1) очевидно, что эти варианты соответствуют наиболее высокому выходу цитогенетических аномалий. Разделение продуктов амплификации рестрикетов реакций с другими эндонуклеазами не выявило различий между вариантами опыта.

Электрофореграмма разделения ампликонов транскрибируемой части нативной ДНК (рис. 2, *г*) свидетельствует о незначительном, но заметном отличии их спектра не только для контрольных и опытных образцов, но и в пределах вариантов, облученных в различных режимах. Изменения электрофореграммы связаны с появлением ампликонов меньшей молекулярной массы. При объяснении этого явления следует учесть возможное повреждение первичной структуры ДНК, что соответствует и увеличению выхода нестабиль-

ных хромосомных aberrаций (рис. 1) в меристематической ткани. Этот результат не находится в противоречии и с данными о хорошем уровне нативности выделенной ДНК (рис. 2, *а*), который по сути свидетельствует лишь о сохранении ДНК отдельных, даже aberrантных хромосом, своей массы и заряда. Однако последующее участие молекул в ПЦР могло привести к выявлению повреждений макромолекулы, возможно, одиночных разрывов, число и положение которых варьирует в зависимости от режима облучения. Нельзя также исключить возможность прямого влияния скрытых повреждений ДНК на конформацию этой макромолекулы, влияющей на прохождение ПЦР. Взаимосвязь изменений в выходе хромосомных aberrаций и изменений профиля метилирования подтверждаются данными других авторов, отмечавших повышение гомологичной рекомбинации при действии стрессовых факторов [4]. Оба явления – гомологическая рекомбинация и возникновение хромосомных aberrаций, имея различное, даже противоположное биологическое значение, имеют сходное инициализирующее звено – возникновение двойных разрывов в молекуле ДНК.

Электрофореграмма разделения продуктов амплификации с ITS праймерами рестрикетов реакции с HpaII ферментом (рис. 2, *д*) показывает различия в профиле метилирования контрольных и облученных образцов. Наиболее явные различия наблюдаются между контролем и вариантом, соответствующим облучению в полной дозе. Упрощение спектра ампликонов свидетельствует в пользу уменьшения сайтов рестрикции фермента HpaII при дозе облучения 7,2 кДж/м<sup>2</sup>.

Таким образом, при фракционированном УФ-С облучении наблюдается весьма сложная картина изменений в профиле метилирования, биологическое значение каждого из которых может быть различным. Известно, что сателлитная ДНК в значительной степени соотносится с гетерохроматином и является в большей степени метилированной по сравнению с транскрибируемой, эухроматиновой частью ДНК [20, 21]. Изменения в профиле метилирования сателлитной ДНК происходят на фоне неизменной первичной

структуры. Это отражено в тождественности спектра ампликонов на электрофореграммах (рис. 2, б, в) и является подтверждением меньшей чувствительности гетерохроматина к УФ-С облучению. Изменения профиля метилирования ДНК в сателлитных частях могут отражать как активизацию мобильных элементов, которые в большей степени ассоциированы с сателлитной ДНК, так и конформационную перестройку этой макромолекулы, носящую защитный и приспособительный характер [21].

Изменения профиля метилирования транскрибируемой части ДНК позволяют высказать предположение о возможном эпигенетическом значении этого процесса, связанного с изменением экспрессии генов. В настоящее время вопрос о роли изменений генной экспрессии в изменениях чувствительности биологических объектов остается мало изученным. В фундаментальном анализе, проведенном Лежачивичусом [22], значительная роль в адаптационном процессе отводится изменению спектра синтезирующихся изоферментов с целью «подгонки» их оптимумов к изменяющейся при стрессовом воздействии внутренней среде организма. Наблюдающиеся изменения профиля метилирования в транскрибируемой ДНК могут отражать изменения эпигенома, приводящие к активным метаболическим перестройкам, связанным с защитными и восстановительными процессами.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об изменениях при УФ-С облучении профиля метилирования как сателлитной, так и транскрибируемой последовательностей ДНК. Сопоставление характера этих изменений при повторяющихся воздействиях стрессового фактора с изменениями выхода хромосомных aberrаций дает основание считать, что они могут быть связаны с уменьшением чувствительности, адаптацией растительного организма к УФ-С воздействию. Зависимость изменений в выходе хромосомных aberrаций и профиля метилирования ДНК от интервала между последовательными фракциями облучения позволяет оценить взаимодействие разных уровней организации – тканевого и клеточного в адаптации организма к действию стрессового фактора.

*Авторы выражают благодарность директору Института физиологии растений и генетики НАН Украины академику В.В. Моргуну за любезно предоставленные семена кукурузы, а также заведующему лабораторией Института клеточной биологии и генетической инженерии Б.В. Моргуну и науч. сотр. Института микробиологии и вирусологии Л.Б. Зеленой за помощь в освоении методик и обсуждении полученных результатов.*

*A.P. Kravets, D.A. Sokolova,  
G.S. Vengjen, D.M. Grodzinskiy*

#### CORN PLANT DNA METHYLATION PATTERN CHANGES AT FRACTIONATING OF UV-C IRRADIATION

Relationship of changes of methylation pattern of functionally different parts of DNA and chromosomal aberration yield was studied at the conditions of the fractionating of UV-C irradiation. Combination of restriction analysis (HpaII, MspI, MboI enzymes) with the subsequent raising of PCR (internal transcribed space ITS1, ITS4 and inter simple sequence repeat – ISSR, 14b primers) was used. The got results testify to the changes in methylation pattern of satellite and transcription active part of DNA at an irradiation in the mode of fractionating and depending on fraction time ranges. The role of the methylation DNA pattern change in development of radiation damage and induction of organism protective reactions was discussed.

*О.П. Кравець, Д.А. Соколова,  
Г.С. Венгжен, Д.М. Гродзинський*

#### ЗМІНИ ПРОФІЛЮ МЕТИЛУВАННЯ ДНК РОСЛИН КУКУРУДЗИ ПРИ ФРАКЦІОНОВАНОМУ УФ-С ОПРОМІНЕННІ

Вивчено зв'язок змін профілю метилування у функціонально різних частинах ДНК та виходу хромосомних aberrаций в умовах фракціонованого УФ-С опромінення в дозах 6,2–9 кДж/м<sup>2</sup>. Використано поєднання рестрикційного аналізу з рестриктазами HpaII, MspI, MboI та подальшої постановки ПЛР з праймерами internal transcribed space – ITS1(19b), ITS4(20b) і inter simple sequence repeat – ISSR(14b). Отримані результати свідчать про зміни в профілі метилування сателітної ДНК та ДНК, що транскрибується, при опроміненні в режимі фракціонування і залежно від часового інтервалу між фракціями. Обговорюється можлива роль змін в профілях метилування ДНК у розвитку ураження та формуванні індукційних захисних реакцій при дії стресових факторів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ванюшин В.Ф. Метилирование ДНК у эукариотов – новый механизм регуляции экспрессии генов и клеточной дифференцировки // Усп. биол. химии. – 1983. – **24**. – С. 170–193.
2. Adams R.L.P. DNA methylation // Principles Med. Biol. / Ed. E.E. Bittar. – New York, 1996. – Vol. 5. – P. 33–66.
3. Тищенко Е.Н., Дубровная О.В. Эпигенетическая регуляция. Метилирование ДНК генов и транскриптов растений. – К.: Логос, 2004. – 232 с.
4. Hauser M.-T., Aufsatz W., Jonak C., Lusching C. Transgenerational epigenetic inheritance in plants // Biochim. biophys. acta. – 2011. – **1809**, № 8. – P. 459–468.
5. Agorio A., Vera P. ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* // Plant Cell. – 2007. – **19**, № 11. – P. 3778–3790.
6. Bilichak A., Illystkyu Y., Hollunder Y., Kovalchuk I. The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression // PLoS One. 2012 ;7 (1):e30515 22291972
7. Lan Zhong, Yan-hao Xu, Jian-bo Wang. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum* // African J. Biotechnol. – 2009. – **8**, № 22. – P. 6201–6207.
8. Kovalchuk I., Abramov V., Pogribny I., Kovalchuk O. Molecular aspects of plant adaptation to life in the Chernobyl zone // Plant Physiol. – 2004. – **135**, № 1. – P. 357–363.
9. Kovalchuk O., Burke P., Arkhipov A., Kuchma N., James S.J., Kovalchuk I., Pogribny I. Genome hypermethylation in *Pinus sylvestris* of Chernobyl – a mechanism for radiation adaptation? // Mutat. Res. – 2003. – **529**, № 1/2. – P. 13–20.
10. Pogribny I., Koturbash I., Tryndyak V., Hudson D., Stevenson S. M.L., Sedelnikova O., Bonner W., Kovalchuk O. Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus // Mol. Cancer Res. – 2005. – **3**, № 10. – С. 553–561.
11. Bernal A., Dolinoy D.C., Huang D., Jirtle R.L. Low dose radiation alters the fetal epigenome //https://www.ora.gov/lowdose2009/abstracts/Jirtle\_Randy.pdf
12. Kim S.Y., Yun H.J., Kwon Y.Y., Kim E.J., Kang C.M. Possible biomarkers for low dose radiation exposure and/or for old exposure // http://www.dartmouth.edu/~epctr/biodose2008/pdf/B10.pdf
13. Кравец А.П., Мюссе Т.А., Литвинчук А.В., Остермиллер Ш., Венгжен Г.С., Гродзинский Д.М. Изменения паттерна метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом  $\gamma$ -облучении семян // Цитология и генетика. – 2010. – **44**, № 5. – С. 18–22.
14. Дрейнер Дж. Генная инженерия растений : Лаб. руководство. – М.: Наука, 1991. – 458 с.
15. Рахманова Т.И., Матасова Л.В., Семенихина А.В., Сафонова О.А., Макеева А.В., Попова Т.Н. Методы оценки оксидативного стресса. – Воронеж, 2009. – 172 с.
16. Ausubel F.M. et al. Current Protocols in Molecular Biology. 2004. A.3D.1–A.3D.12 Biophotometer – Operating Manual. http://www.eppendorf.com.
17. PCR protocols / Eds J.M.S. Bartlett, D. Stirling. – Totowa, NY: Humana Press Inc. 2003. – 545 p.
18. Tikunov Yu.M., Khrystaleva L.I. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon* // Euphytica. – 2003. – **131**. – P. 71–80.
19. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений. – М.: Наука, 1974. – 223 с.
20. Лобов В.П., Даскалюк А.П., Скрипка Л.В., Тищенко Е.Н. Организация нуклеотидных последовательностей ДНК растений. – К.: Наук. думка, 1986. – 136 с.
21. Хемлебен В., Беридзе Т.Г., Бахман Л., Коварик Я., Торрес Р. Сателлитные ДНК // Усп. биол. химии. – 2003. – **43**. – С. 267–306.
22. Лежявичус Э. Элементы общей теории адаптации. – Вильнюс : Мокслас, 1986. – 272 с.

Поступила 07.03.12