

УДК 575.22 : 575.174 : 574.3

**Application of ISSR-Markers to Assess Genetic State
of *Scorzonera glabra* Rupr. (Asteraceae)
from the Environs of Karabash
(the Chelyabinsk Region)**

Natalia A. Kutlunina,
Diana R. Junusova and Elena V. Zhuikova*
*Ural Federal University
19 Mira, Ekaterinburg, 620002, Russia*

Received 29.09.2016, received in revised form 14.10.2016, accepted 12.12.2016

*Genetic diversity of two local populations of the Ural endemic and the Pleistocene relict *Scorzonera glabra* Rupr. (Asteraceae) from the surroundings of Karabashskiy Copper-Smelting Plant (impact) and mountain *Egosa* (background) was studied using ISSR markers. The results show that the level of polymorphism is high in both populations. Analysis of molecular variance (AMOVA) show that the large portion of the variability (85 %) determines by intrapopulation one. There are no significant differences in genetic diversity among local populations. We suppose that *S. glabra* being a plastic species has pre-adaptations that allow it to grow under impact conditions.*

*Keywords: Karabashskiy Copper-Smelting Plant, environmental contamination, *Scorzonera glabra*, ISSR markers, genetic diversity.*

Citation: Kutlunina N.A., Junusova D.R., Zhuikova E.V. Application of ISSR markers to assess genetic state of *Scorzonera glabra* Rupr. (Asteraceae) from the environs of Karabash (the Chelyabinsk region). J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2018, 11(1), 49-59. DOI: 10.17516/1997-1389-0048.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: elena.zhuykova@urfu.ru

Использование ISSR-маркеров для оценки генетического состояния *Scorzonera glabra* Rupr. (Asteraceae) в окрестностях Карабаша (Челябинская обл.)

Н.А. Кутлунина, Д.Р. Юнусова, Е.В. Жуйкова
Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина
Россия, 620002, Екатеринбург, Мира, 19

Методом ISSR-маркирования были изучены две локальные популяции уральского эндемика и плейстоценового реликта *Scorzonera glabra* Rupr. (Asteraceae) в окрестностях Карабашского медеплавильного комбината (импактная зона) и горы Егоза (фоновая зона). Показатели полиморфизма были высокими в обеих локальных популяциях; результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) показали, что 85 % изменчивости приходится на внутривидовую компоненту. Таким образом, достоверных различий в генетической структуре локальных популяций импактной и фоновых зон выявлено не было. Можно предположить, что *S. glabra* является пластическим видом и имеет преадаптации, которые позволяют ей произрастать в местообитаниях с повышенным уровнем техногенной нагрузки.

Ключевые слова: Карабашский медеплавильный комбинат, аэротехногенное загрязнение, *Scorzonera glabra*, ISSR-маркеры, генетическое разнообразие.

Введение

Активная хозяйственная деятельность на Урале привела к появлению большого количества техногенно нарушенных территорий. К ним, в том числе, относятся окрестности Карабашского медеплавильного комбината (КМК), в состав аэральных выбросов которого входят: SO₂ (около 90 %), CO, NO₂, оксиды меди, свинца, цинка, железа и мышьяка (Залесов и др., 2017). За 100 лет работы комбината загрязнение почвы поллютантами, ее уплотнение и выпадение токсических осадков привели к значительному изреживанию и исчезновению растительного покрова (Куянцева и др., 2011). В первую очередь, в таких условиях исчезает лесная растительность, а многолетние травянистые растения (петрофиты, луговые корневищные мезо-

фиты) сохраняются. Одним из таких видов цветковых растений, произрастающих в импактной зоне КМК, является уральский эндемик и плейстоценовый реликт *Scorzonera glabra* Rupr. (сем. Asteraceae).

Адаптивность растений к токсическому стрессу может определяться как фенотипическими, так и генетическими изменениями. Ряд исследований показывает негативное влияние токсического стресса на генетическое разнообразие ценопопуляций (Deng et al., 2007; Nkongolo et al., 2007). Например, в ценопопуляциях *Lychnis flos-cuculi* L. (сем. Caryophyllaceae) загрязненных импактных территорий Среднеуральского медеплавильного завода был обнаружен эффект основателя, который приводит к значительной генетической дифференциации этих ценопопуляций

(Дуля, 2015). Потеря генетического разнообразия также была показана для двух ценопопуляций *Deschampsia cespitosa* L. P.Beauv. (сем. Poaceae), колонизировавших загрязненные металлами территории рудников, и выражалась в снижении аллельного разнообразия, но не в уменьшении гетерозиготности (Bush, Barrett, 1993).

Тем не менее во многих случаях снижения генетического разнообразия на загрязненных территориях не происходит. Так, для *Silene paradoxa* L. (сем. Caryophyllales) было показано, что, несмотря на эффект основателя и отбор, параметры генетического разнообразия ценопопуляции загрязненного района остаются такими же, как и у ценопопуляции ненарушенных территорий (Mengoni et al., 2000, 2001). Исследование S. Gervais и K. Nkongolo (2011) также выявило отсутствие снижения генетического разнообразия в ценопопуляции *D. cespitosa* по мере увеличения загрязнения территории тяжелыми металлами (ТМ).

По литературным данным, при воздействии поллютантов уровень генетического разнообразия может понижаться или оставаться неизменным, однако в ходе исследования трех ценопопуляций *Viola tricolor* L. (Slomka et al., 2011) был выявлен повышенный уровень полиморфизма и генетического разнообразия в ценопопуляции из загрязненных ТМ местообитаний.

Таким образом, на текущий момент среди исследователей не сложилось единого мнения о том, существует ли корреляция между степенью загрязненности территории и уровнем генетического разнообразия. Вероятно, реакция каждого вида специфична и связана с особенностями его биологии и исторического развития локальной популяции.

При изучении генетических особенностей популяций широко используются методы ПЦР-маркирования. Один из них – ISSR

(Inter Simple Sequence Repeats) – направлен на амплификацию межмикросателлитных участков генома. Он специфичен и воспроизводим, что делает его удобным для изучения внутривидового и популяционного разнообразия.

Исходя из этого целью исследования являлась оценка генетических параметров локальной популяции *S. glabra*, в течение длительного времени произрастающей в импактной зоне КМК, в сравнении с фоновой.

Материал и методы

Исследование проводили на г. Золотой (55°46'85» с.ш., 60°24'73» в.д., рис. 1) в черте г. Карабаш, расположенного на восточном склоне Южного Урала в Челябинской области. В настоящее время импактная зона протянулась на расстояние 5-8 км от КМК и представляет собой техногенную пустошь (Koroteeva et al., 2015).

Для района исследования характерна неоднородная роза ветров с преобладанием восточного (28 %), северо-восточного (17 %) и северного (15 %) направлений. В соответствии с ней, г. Золотая оказывается подверженной влиянию кислотных выбросов КМК в наибольшей степени (рис. 1), что приводит к подкислению почв (средний показатель pH верхнего горизонта составляет 4,8) (Аминов, 2009), потере обменных оснований, мобилизации токсичных элементов.

К началу 1990-х гг. содержание ТМ в почве превысило фоновый показатель в 45 раз для меди, в 20 раз для свинца и в 5 раз для кадмия. Максимальное содержание меди 6744 мг/кг отмечено в трех километрах к северо-западу от комбината (Степанов, 1992), а уже через 3-5 лет ее концентрация превысила фоновую в 128 раз (Нестеренко, 1997). Максимальные концентрации других элементов в зоне техногенной пустыни достигали 3593

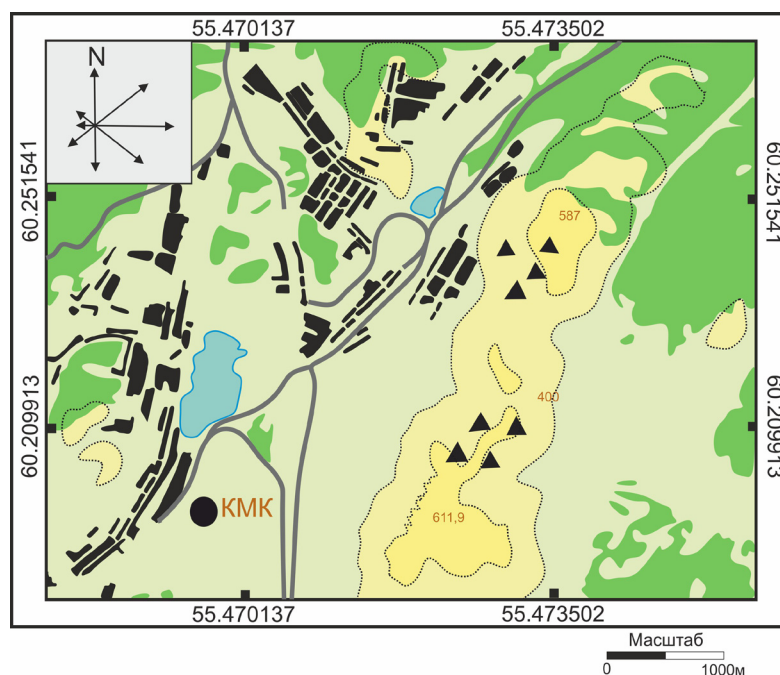


Рис. 1. Точки сбора *Scorzonera glabra* (черные треугольники) в окрестностях Карабашского медеплавильного комбината (КМК) (импактная зона). Вверху слева – роза ветров района

Fig. 1. Sampling points of *Scorzonera glabra* (black triangles) in environs of Karabashskiy Copper-Smelting Plant (impact). Above left: a wind rose plot for the area

мг/кг для цинка и 4977 мг/кг для свинца (Макунина, 2002).

В качестве контрольной выбрана локальная популяция *S. glabra*, произрастающая на г. Егоза (Челябинская обл., 55°45'04.8» с.ш., 60°26'55,8» в.д.). Гора Егоза относится к Сугомакскому горному массиву и представляет собой самую высокую точку горной цепи с западной стороны Кыштыма. Ее территория по комплексу эдафических и орографических факторов оптимально подходит в качестве фоновой зоны. Так, основными горными породами Сугомакского и Карабашского ультраосновных массивов являются серпентиниты; сходны также уровни инсоляции и увлажнения. В работе А.Ю. Тептиной с соавторами (2016) проведено сравнение содержания ТМ в почвах г. Егоза и г. Золотой. Превышение валового содержания в окрестностях КМК составило 60 раз в случае меди,

23 раза – кадмия, 15 раз – цинка и 4 раза – железа.

Объектом исследования был выбран реликтовый вид плейстоценового флористического комплекса козелец гладкий *Scorzonera glabra* Rupr. (сем. Asteraceae). Вид относится к группе скальных и петрофитно-степных реликтов южно-сибирского происхождения, подгруппе петрофитно-степных и скальных видов с преимущественным распространением в полосе лесостепи восточного макросклона Южного Урала. В Челябинской области он распространен главным образом по восточному склону Южного Урала в окрестностях городов Кыштым, Карабаш, Миасс. Произрастает в горных каменистых степях, в остепненных сосновых и сосново-лиственничных редколесьях, на основных и ультраосновных подстилающих горных породах (Куликов и др., 2013; Лесина, Коротеева, 2011). В услови-

Таблица 1. Характеристика используемых ISSR-праймеров

Table 1. ISSR primers

| ISSR-праймер (UBC) | Последовательность (5'→3') | Температура отжига (Ta), °C | Количество выявленных бэндов |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 807 | AGAGAGAGAGAGAGAGT | 45 | 13 |
| 808 | AGAGAGAGAGAGAGAGC | 47 | 13 |
| 810 | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 45 | 10 |
| 811 | GAGAGAGAGAGAGAGAC | 45 | 12 |
| 814 | CTCTCTCTCTCTCTA | 45 | 9 |
| 815 | CTCTCTCTCTCTCTG | 47 | 11 |
| 822 | TCTCTCTCTCTCTCA | 45 | 18 |
| 834 | AGAGAGAGAGAGAGAGYT | 49 | 17 |
| 842 | GAGAGAGAGAGAGAGAYG | 49 | 9 |

Примечание: UBC – праймеры из набора биотехнологической лаборатории Университета Британской Колумбии (The University of British Columbia), Канада.

ях техногенной пустыни Карабаша *S. glabra* формирует многочисленные моновидовые группировки по всей вершине и склонам хребта вне зависимости от их экспозиции.

Выборка в каждом местообитании составила 20 особей. Для работы отбирали лист одного растения в каждой изолированной и отдаленной друг от друга не менее чем на 5 м группировке.

Нуклеиновые кислоты (НК) выделяли из свежего материала методом Porebski (Porebski et al., 1997). Для анализа всех образцов использовали девять ISSR-праймеров (табл. 1), температуру отжига которых определяли предварительно.

Программа ПЦР состояла из предварительной денатурации при 95 °C 5 мин, 40 циклов денатурации 95 °C 45 с, отжига праймеров 45, 47 или 49 °C 50 с и элонгации при 72 °C 40 с, финальной элонгации 10 мин при 72 °C. ПЦР проводили в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США).

ПЦР-смесь включала 12,2 мкл dH₂O, 4 мкл окрашенного буфера (Mg⁺² 2,5 мМ), 1 мкл 10 мМ праймера, 0,4 мкл HS Taq полимеразы, 0,4 мкл 200 мМ dNTP и 2 мкл НК.

Разделение ПЦР-продуктов проводили в горизонтальной электрофорезной камере Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad Laboratories, США) в 1,2 % TBE агарозном геле с добавлением бромистого этидия 2 ч при 80 V. Гели визуализировали с помощью трансиллюминатора ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, США).

По электрофереграммам (рис. 2) была составлена бинарная матрица данных: присутствие или отсутствие каждого ампликона обозначалось, соответственно, как 1 или 0. Анализ матрицы проводился в программах GenAlEx 6.5 (Peakall et al., 2012), PAST3 (Hammer et al., 2001).

Результаты

В ходе работы было выявлено 112 фрагментов, 108 (96,43 %) из которых оказались полиморфными. Процент полиморфных локусов для локальной популяции «Карабаш» составил 76,79 %, для «Егозы» – 85,71 % (табл. 2). Показатели общего генетического разнообразия: ожидаемая гетерозиготность (He) и индекс Шеннона (H), – составили 0,254 и 0,261, и 0,381 и 0,397 соответственно.

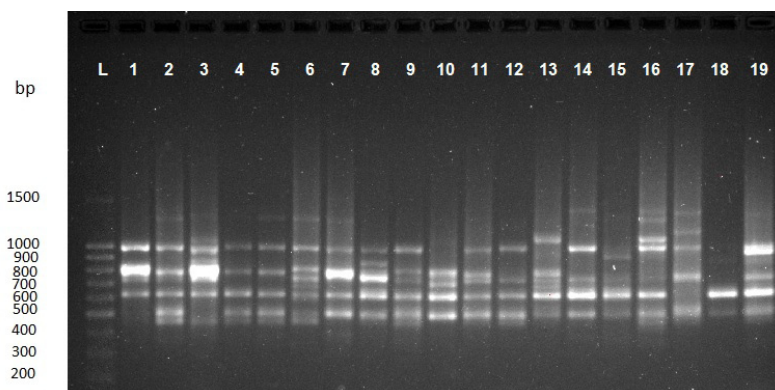


Рис. 2. Электрофореграмма ISSR-ПЦР *Scorzonera glabra* с праймером UBC 815: L – маркер молекулярного веса, 1-10 – образцы из локальной популяции “Карабаш” (импакт) и 11-19 – образцы из локальной популяции “Егоза” (фон)

Fig. 2. ISSR-PCR electrophoregram of *Scorzonera glabra* with UBC 815 primer: L – molecular weight marker, 1-10 – samples from the local population “Karabash” (impact) and 11-19 – samples from the local population “Egoza” (background)

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия локальных популяций *Scorzonera glabra*

Table 2. Genetic diversity indicators of *Scorzonera glabra* local populations

| Популяция | Индекс Шенона (H) | Генетическое разнообразие по Ней (H _e) | Процент полиморфных локусов (P, %) |
|-----------|-------------------|--|------------------------------------|
| Карабаш | 0,381 (0,026) | 0,254 (0,018) | 76,79 |
| Егоза | 0,397 (0,023) | 0,261 (0,017) | 85,71 |
| Общее | 0,389 (0,017) | 0,258 (0,013) | 81,25 (4,46) |

Примечание: в скобках указаны значения стандартного отклонения.

Таблица 3. Результаты анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) между локальными популяциями *Scorzonera glabra*

Table 3. Results of molecular dispersion analysis (AMOVA) between *Scorzonera glabra* local populations

| Источники изменчивости | d.f. | Сумма квадратов | Компоненты дисперсии | Процент изменчивости (%) |
|------------------------|------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| Межпопуляционная | 1 | 70,150 | 2,721 | 15 |
| Внутрипопуляционная | 38 | 597,800 | 15,732 | 85 |
| Общая | 39 | 667,950 | 18,453 | 100 |

Межпопуляционное генетическое разнообразие характеризуется показателем G'_{ST} , который отражает меру дифференциации субпопуляций (Peakall, Smouse, 2012) и составил 0,089.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) выявил (табл. 3), что большая доля изменчивости (85 %) приходится на внутрипопуляционную изменчивость, а на межпопуляционную изменчивость оста-

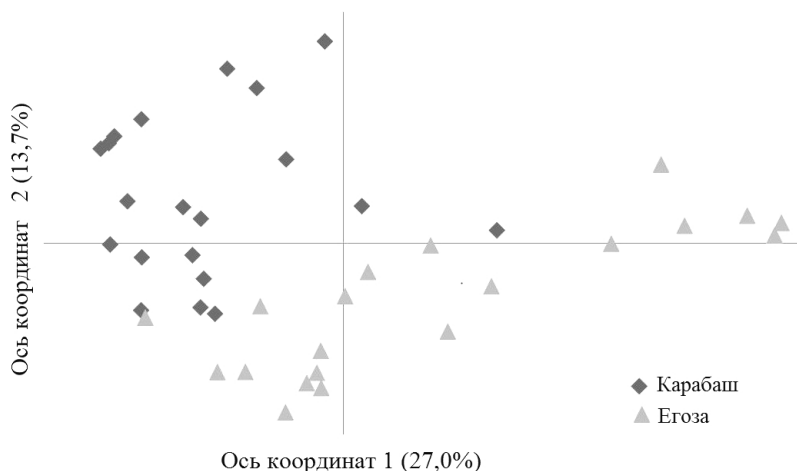


Рис. 3. Точечная диаграмма генетических дистанций Неи *Scorzonera glabra* из импактной (Карабаш) и фоновой (Егоза) локальных популяций, построенная методом главных координат

Fig. 3. PCoA diagram of *Scorzonera glabra* local populations from Karabash (impact) and Egoza (background), constructed on the Pairwise Nei Genetic Distance Matrix

ется 15 %. Дисперсия составила 0,147 ($p = 0,001$).

Для визуализации генетической дистанции между локальными популяциями был использован метод главных координат (рис. 3). На первые три оси координат приходится 27, 13,73 и 7,39 % общей дисперсии.

Обсуждение

Было показано, что в отличие от естественных фитоценозов, в условиях техногенно нарушенной территории в окрестностях КМК, *S. glabra* оказывается главным ценообразователем и формирует многочисленные полночленные ценопопуляции с преобладанием генеративной стадии в возрастном спектре (Лесина, Коротеева, 2014).

Однако многие эндемичные виды обычно имеют более низкие уровни генетического разнообразия и более высокие уровни генетической подразделенности популяций по сравнению с широкоареальными. Это связано с выраженными эффектами генетического дрейфа и ограниченным потоком генов у рас-

тений с дизъюнктивным ареалом (Hamrick, Godt, 1989; Nybom, 2004). Для характеристики разнообразия популяций подобных видов при использовании доминантных маркеров указывается среднее значение ожидаемой гетерозиготности, равное 0,2 (Escaravage et al., 2011; Nybom, 2004).

Уровень генетического разнообразия зависит от целого ряда факторов, таких как история появления и развития ценопопуляции, системы размножения, жизненной формы, ареала и метода его изучения (Powell et al., 1996; Nybom, 2004). При сравнении полученных для локальной популяции «Карабаш» значений показателей генетического разнообразия с таковыми для «Егозы» можно предположить, что локальная популяция «Карабаш» не проходила через «бутылочное горлышко» и постепенное исчезновение леса на г. Золотой, наоборот, способствовало расселению *S. glabra*.

Такие факторы, как изоляция, небольшая численность популяций и поток генов, могут оказывать значительное влияние на

уровень генетического разнообразия внутри и между популяциями (Hamrick et al., 1992). Уровень межпопуляционного генетического разнообразия свидетельствует о слабой дифференциации популяций *S. glabra*, которая с высокой вероятностью является насекомоопыляемым, перекрестноопыляемым видом (Кашин и др., 2007; Демьянова, 2014). В локальной популяции «Карабаш» каждый год образуется огромное количество генеративных побегов и семян (Чукина и др., 2015), распространяющихся ветром; все это способствует панмиксии и препятствует формированию популяционной подразделенности.

Значительная часть генетической изменчивости *S. glabra* обнаружена внутри локальных популяций, что соответствует ожидаемой для многолетнего перекрестно опыляемого растения (Nybom, 2004). Расстояние между импактной и фоновой территориями составляет около 40 км, и поток генов между

локальными популяциями, по-видимому, ограничен. Группировки растений достаточно многочисленны, особенно в окрестностях КМК, генетическое разнообразие сконцентрировано внутри ценопопуляций, что уменьшает эффект генетического дрейфа.

Заключение

Сравнение показателей генетического разнообразия локальных популяций позволило предположить, что медеплавильное производство в окрестностях г. Карабаш, которое привело к экологическому коллапсу и полному изменению фитоценоза, с одной стороны, с другой – создало подходящие условия обитания для *S. glabra*. По-видимому, *S. glabra* реагирует на измененные условия (высокий уровень инсоляции, аэротехногенное загрязнение) не генетическими, а морфофизиологическими изменениями (Ситников и др., 2016; Лесина, Коротеева, 2014) в пределах нормы реакции.

Авторы благодарят С.А. Лесину за помощь в сборе материала. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 15-04-08380 А.

Список литературы

Аминов П.Г. (2009) Тяжелые металлы в хвое *Pinus sylvestris* в условиях градиентного аэрального потока загрязняющих веществ медеплавильного производства (Карабашская геотехническая система, Южный Урал). *Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского*, 8: 18-25 [Aminov P.G. (2009) Heavy metals in *Pinus sylvestris* needles in conditions of gradient aerial flow of copper melting production contaminants (Karabakh geotechnical system, South Urals). *Problems of Contemporary Science and Practice. Vernadsky University* [Voprosy sovremennoj nauki i praktiki. Universitet im. V.I. Vernadskogo], 8: 18-25 (in Russian)]

Демьянова Е.И. (2014) О системах скрещивания охраняемых цветковых растений Пермского края. *Вестник Пермского университета. Серия: Биология*, 3: 4-18 [Demyanova E.I. (2014) Concerning the crossing systems of protected flowering plants in Perm region. *Bulletin of Perm University. Biology* [Vestnik Permskogo universiteta. Seriya: Biologiya], 3: 4-18 (in Russian)]

Дуля О.В. (2015) *Эколого-генетические механизмы устойчивости травянистых растений к промышленному загрязнению: дис. канд. биол. наук*. Екатеринбург, 212 с. [Dulya O.V. (2015)

Ecological and genetic mechanisms of resistance of herbaceous plants to industrial pollution: Ph.D. thesis. Ekaterinburg, 212 p. (in Russian)]

Залесов С.В., Бачурина А.В., Бачурина С.В. (2017) *Состояние лесных насаждений, подверженных влиянию промышленных поллютантов ЗАО «Карабашимедь», и реакция их компонентов на проведение рубок обновления.* Екатеринбург, Урал. гос. лесотехн. ун-т, 278 с. [Zalesov S.V., Bachurina A.V., Bachurina S.V. (2017) *Condition of forest stands undergone the impact of ЗАО «Karabashmed» industrial pollutants and their components reaction on renewal cutting carrying on.* Yekaterinburg, Ural State Forest Engineering University, 278 p. (in Russian)]

Кашин А.С., Березуцкий М.А., Кочанова И.С., Добрыничева Н.В., Полянская М.В. (2007) Особенности семенного размножения в популяциях видов Asteraceae при воздействии антропогенных факторов. *Ботанический журнал*, 9: 1408–1427 [Kashin A.S., Berezutsky M.A., Kochanova I.S., Dobrynichcheva N.V., Poljanskaja M.V. (2007) Peculiarities of seed reproduction in populations of Asteraceae species under impact of anthropogenic factors. *Journal of Botany* [Botanicheskij zhurnal], 9: 1408–1427 (in Russian)]

Куликов П.В., Золотарева Н.В., Подгаевская Е.Н. (2013) *Эндемичные растения Урала во флоре Свердловской области.* Екатеринбург, Гощицкий, 612 с. [Kulikov P.V., Zolotareva N.V., Podgaevskaya E.N. (2013) *Endemic plants of Ural in the flora of the Sverdlovsk Region.* Ekaterinburg, Goshchitskii, 612 p. (in Russian)]

Куюнцева Н.Б., Мумбер А.Г., Потапкин А.Б., Гаврилкина С.В. (2011) Реакция березовых древостоев на кислотные выбросы, формируемые Карабашским медеплавильным комбинатом (Южный Урал). *Вестник ОГУ*, 12: 98–100 [Kuyantseva N.B., Mumber A.G., Potapkin A.B., Gavrilkina S.V. (2011) Reaction of birch stands on acid emissions generated by the Karabash Copper Smelting Combine (South Urals). *Bulletin of the Orenburg State University* [Vestnik OGU], 12: 98-100 (in Russian)]

Лесина С.А., Коротеева Е.В. (2014) Биологические особенности *Scorzonera glabra* (Asteraceae) в Челябинской области. *Ботанический журнал*, 12: 1363-1376 [Lesina S.A., Koroteeva E.V. (2014) Biological features of *Scorzonera glabra* (Asteraceae) in Chelabinsk region. *Journal of Botany* [Botanicheskij zhurnal], 12: 1363-1376 (in Russian)]

Лесина С.А., Коротеева Е.В. (2011) Онтогенез и экология произрастания *Scorzonera glabra* в Челябинской области. *Вестник ОГУ*, 12: 204-206 [Lesina S.A., Koroteeva E.V. (2011) The ontogeny and ecology of growth of *Scorzonera glabra* in the Chelyabinsk region. *Bulletin of the Orenburg State University* [Vestnik OGU], 12: 204-206 (in Russian)]

Макунина Т.С. (2002) Деградация и химические свойства почв Карабашской техногенной аномалии. *Почвоведение*, 3: 368-376 [Makunina T.S. (2002) Degradation and chemical properties of soils in the Karabash technogenic anomaly. *Soil Science* [Pochvovedenie], 3: 368-376 (in Russian)]

Нестеренко В.С. (1997) Карабашская техногенная система. *Проблемы экологии Южного Урала*, 3: 4-13 [Nesterenko V.S. (1997) Karabash technogenic system. *Problems of Ecology of the Southern Urals* [Problemy ekologii Yuzhnogo Urala], 3: 4-13 (in Russian)]

Ситников И.А., Шаихова Д.Р., Чукина Н.В., Киселева И.С. (2016) Влияние аэротехногенного загрязнения на фотосинтетический аппарат растений *Scorzonera glabra* Rupr. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета*, 8 (161): 84–90 [Sitnikov I.A., Shaikhova D.R., Chukina N.V., Kiseleva I.S. (2016) Aerotechnogenic pollution effects on photosynthetic

apparatus of *Scorzonera glabra* Rupr. *Proceedings of Petrozavodsk State University* [Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta], 8 (161): 86-91 (in Russian)]

Степанов А.М. (1992) Комплексная экологическая оценка техногенного воздействия на экосистемы южной тайги. *Вестник Удмуртского университета*, 1: 1005–1011 [Stepanov A.M. (1992) Integrated ecological assessment of anthropogenic impact on the ecosystems of the southern taiga. *Bulletin of Udmurt University* [Vestnik Udmurtskogo universiteta], 1: 1005–1011 (in Russian)]

Тептина А.Ю., Пауков А.Г., Морозова М.В. (2016) Аккумуляция Ni представителями семейства Brassicaceae на почвах ультраосновных пород Южного и Среднего Урала. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета*, 4 (157): 110-117 [Teptina A.Yu., Paukov A.G., Morozova M.V. (2016) Accumulation of Ni by species of Brassicaceae on ultramafic soils in the Southern and Middle Urals. *Proceedings of Petrozavodsk State University* [Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta], 4 (157): 110-117 (in Russian)]

Чукина Н.В., Кутлунина Н.А., Шаихова Д.Р., Шарнина Т.Ф., Ситников И.А., Киселева И.С. (2015) Экспресс-оценка состояния вегетативных и генеративных органов травянистых растений в окрестностях Карабашского медеплавильного комбината. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета*, 8: 80-86 [Chukina N.V., Kutlunina N.A., Shaikhoval D.R., Sharnina T.F., Sitnikov I.A., Kiseleva I.S. (2015) Express estimation of vegetative and reproductive organs in herbaceous plants from environs of Karabash copper smelter. *Proceedings of Petrozavodsk State University* [Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta], 8: 80-86 (in Russian)]

Bush E.J., Barrett S.C. (1993) Genetics of mine invasions by *Deschampsia cespitosa* (Poaceae). *Canadian Journal of Botany*, 10: 1336-1348

Deng D.M., Shu W.S., Zhang J., Zou H.L., Lin Z., Ye Z.H., Wong M.H. (2007) Zinc and cadmium accumulation and tolerance in populations of *Sedum alfredii*. *Environmental Pollution*, 147: 381-386

Escaravage N., Cambecedes J., Largier G., Pornon A. (2011) Conservation genetics of the rare Pyreneo-Cantabrian endemic *Aster pyrenaicus* (Asteraceae). *AoB PLANTS*, 2011: plr029. doi: 10.1093/aobpla/plr029

Gervais S., Nkongolo K. (2011) *Effect of metal contamination on the genetic diversity of Deschampsia cespitosa populations from northern Ontario: an application of ISSR and microsatellite markers*. Rijeka, InTech, 154 p.

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4: 1–9

Hamrick J.L., Godt M.J.W. (1989) Allozyme diversity in plant species. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (eds.) Sunderland, MA, Sinauer Associates, p. 43–63

Hamrick J.L., Godt M.J.W., Sherman-Broyles S. (1992) Factor influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6: 95–124

Koroteeva E.V., Veselkin D.V., Kuyantseva N.B., Chashchina O.E. (2015) The size, but not the fluctuating asymmetry of the leaf, of silver birch changes under the gradient influence of emissions of the Karabash Copper Smelter Plant. *Doklady Biological Sciences*, 460: 36-39

Mengoni A., Gonnelli C., Galardi F., Gabbrielli R., Bazzicalupo M. (2000) Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, 9: 1319-1324

Mengoni A., Klein M., Geisler M., Bovet L., Forestier C., Kolukisaoglu Ü., Schulz B. (2001) Genetic diversity of heavy metal-tolerant populations in *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 8: 1909-1916

Nkongolo K.K., Mehes M., Deck A., Michael P. (2007) Metal content in soil and genetic variation in *Deschampsia cespitosa* populations from Northern Ontario (Canada): application of ISSR markers. *European Journal of Genetic Toxicology*, March Issue: 1-38

Nybom H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143–1155

Peakall R., Smouse P.E. (2012) GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Bioinformatics*, 19: 2537-2539

Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 8-15

Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225–238

Słomka A., Sutkowska A., Szczepaniak M., Malec P., Mitka J., Kuta E. (2011) Increased genetic diversity of *Viola tricolor* L. (Violaceae) in metal-polluted environments. *Chemosphere*, 4: 435-442