УДК 630.165+575.17

В.А. Волков, Д.С. Каржаев, Е.Д. Сафронычева, М.В. Тис, К.В. Чухланцева, В.В. Шаршавикова, Е.К. Потокина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ KASP- И HRM-МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА АДАПТИВНЫЕ ПРИЗНАКИ СОСНЫ И ЕЛИ

Введение. Глобальное изменение климата оказывает значительное влияние на лесные экосистемы, особенно на хвойные лесообразующие породы [Королева и др., 2015]. Повышение температуры в ближайшие годы будет существенно затрагивать физиологические процессы роста древесных пород, особенно вечнозеленых видов, таких как ель и сосна [Way, Oren, 2010]. В России прогнозируется изменение растительных сообществ на 70% площадей сосняков и 50% ельников, что требует пересмотра подходов к лесовосстановлению и селекции [Королева и др., 2015].

Существующая система ДНК-скрининга лесных генетических ресурсов, используемая сегодня для инвентаризации и паспортизации разнообразия лесных генетических ресурсов РФ, может и должна быть дополнена функциональными молекулярными маркерами генов, контролирующих важнейшие адаптивные признаки основных лесообразующих пород.

Известно, что изменчивость важнейших приспособительных признаков хвойных лесообразователей контролируется генетически. Так, например, сроки распускания почек у ели сизой (*Picea glauca* (Moench) Voss*)* на 44-83% обусловлены генотипом [Rweyongeza et al., 2010]. Однако идентификация соответствующих генов или картирование QTL (Quantitative Trait Loci) классическим способом – путем скрещивания и создания картирующих популяций – чрезвычайно затруднена у древесных пород. В такой ситуации на помощь приходят методы «обратной» генетики, главный принцип которой – от гена к признаку (фенотипу).

Сегодня в научной литературе накоплена обширная информация о генах-кандидатах, полиморфизм которых ассоциирован с внутривидовой изменчивостью деревьев по фенологическим ритмам, годичным приростам, продолжительности вегетационного периода, устойчивости к абиотическим факторам. В большинстве случаев эти гены были идентифицированы как «кандидаты» на основании их хорошо изученной функции у

модельных видов, например, у арабидопсиса. Функциональность выбранных генов у ели и сосны доказывается тем фактом, что частота встречаемости их аллелей в популяциях лесообразующих пород демонстрирует четко выраженный географический клин в широтном направлении [Chen et al., 2012, 2014; Kujala, Savolainen, 2012; Ranade, García-Gil, 2023]. Это свидетельствует о ключевой роли этих генов в формировании адаптивной реакции основных лесообразователей. Формирование такого «широтного клина» также говорит о том, что аллельный полиморфизм генов-кандидатов находится под давлением естественного отбора и при формировании искусственных насаждений лесных пород лучше использовать генотипы, которые в данных конкретных условиях имеют преимущество при выживании.

Молекулярное маркирование генов-кандидатов, контролирующих важные приспособительные признаки, потенциально позволяет выявлять деревья, генетически наиболее адаптированные к изменяющемуся климату, и использовать их семенное потомство для закладки лесных культур в регионах, для которых в ближайшей перспективе прогнозируется существенное изменение климатических условий. Это может значительно повысить эффективность лесовосстановительных программ.

Цели и задачи. Целью исследования являлась разработка методов для массового скрининга аллельного полиморфизма генов, вовлеченных в формирование адаптивных признаков ели и сосны.

Методика исследования. В рамках нашего исследования для генотипирования были выбраны гены-кандидаты, связанные с адаптивными признаками у ели и сосны. В перечень, составленный по литературным данным, были включены гены фотопериодической реакции pseudo-response regulators (PRR1, PRR7) а также гены фоторецепторов, кодирующие фитохромы (PhyO) и криптохромы (CRY1) [Chen et al., 2012; Kujala, Savolainen, 2012; Ranade, García-Gil, 2023].

Для всех перечисленных генов на подготовительном этапе были сконструированы праймеры и с их использованием получены ПЦР-продукты ожидаемого размера, предназначенные для последующего секвенирования по Сэнгеру с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500. Секвенирование проводили с использованием набора NimaGen BrilliantDye Terminator, v 3.1 в соответствии с протоколом производителя. Перечень праймеров, использованных для секвенирования, представлен в табл. 1.

Таблица 1

Праймеры для амплификации последовательностей генов-кандидатов с последующим секвенированием по Сэнгеру

Primers for amplification of candidate gene sequences followed by Sanger sequencing

Название	Температура отжига, °C	Последовательность	Источник
CRY1_F	55	CTGGGTTCCAACTATCCACTAC	[Ranade, García-Gil, 2023]
CRY1_R	55	GGTACAATGCCTCCACTACTC	
PhyO_F	56	GGAGAAGGGACCAGTTGTTT	[Ranade, García-Gil, 2023]
PhyO_R	56	TCCTGCCGAATGTATGCTAAT	
PRR1_F	56	ACTCCAATACCAACAGTACCAA	[Kujala, Savolainen, 2012]
PRR1_R	56	ATATGTGAGGAAAGCTGATGC	
PRR7_F	55	CCAGAGATTGCCAGGACAAA	[Chen et al., 2012]
PRR7_R	55	AGCATGGTCTTAGATGGAAAGG	

В результате секвенирования последовательностей этих генов-кандидатов на выборке из 20 деревьев ели и 20 деревьев сосны лесных культур Дружносельского лесничества (Ленинградская область) были обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в следующих генах: у ели – PhyO, CRY1; у сосны – PRR1, PRR7. Ниже приводим описания выявленного полиморфизма.

Ген PhyO (NCBI Acc. № U60264.1, PlantGenIE Acc. № MA_6809).

В экзоне 4 гена *PhyO* в результате секвенирования обнаружен SNP, ранее описанный в популяциях ели европейской из Швеции [Ranade, García-Gil, 2023]. В указанной публикации сообщалось о корреляции частоты встречаемости аллелей этого гена с географической широтой места произрастания популяции, и, соответственно, с изменением длины светового дня и соотношением различных длин волн красного света [Ranade, García-Gil, 2021; Ranade, García-Gil, 2023]. Мутация (A/G) является функциональной (несинонимичный SNP), она изменяет структуру кодируемого белка вследствие аминокислотной замены (аспарагин/серин) (рис. 1).

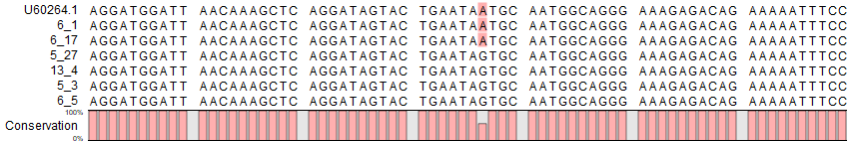

Рис. 1. Полиморфизм (SNP A/G), выявленный у ели европейской в гене *PhyO*

Fig. 1. Polymorphism (SNP A/G) identified in the *PhyO* gene of Norway spruce

Ген CRY1 (NCBI Acc.№ KF144048.1, PlantGenIE Acc.№ MA_10428291g0010).

На материале исследованной выборки елей из Дружносельского лесничества был обнаружен SNP в экзоне 4 гена *CRY1*. Выявлен аллель, альтернативный по отношению к опубликованной в NCBI последовательности и ранее не описанный в литературных источниках. Найденный полиморфизм приводит к изменению структуры кодируемого белка, изменяя пролин на аланин (рис. 2).

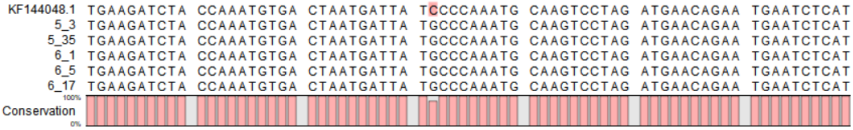

Рис. 2. Полиморфизм (SNP C/G), выявленный у ели европейской в гене *CRY1*

Fig. 2. Polymorphism (SNP C/G) identified in the CRY1 gene of Norway spruce

Ген PRR1 (NCBI Acc. № JQ969545.1).

При исследовании последовательности гена *PRR1* на выборке сосны обыкновенной был обнаружен SNP, локализованный в интроне 4 (рис. 3).

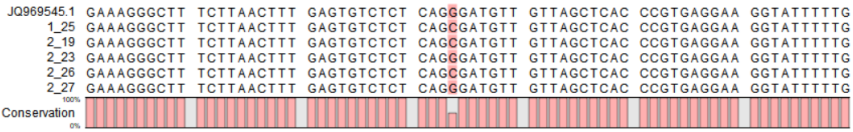

Рис. 3. Полиморфизм (SNP G/C), выявленный у сосны обыкновенной в гене *PRR1*

Fig. 3. Polymorphism (SNP G/C) identified in the PRR1 gene of Scots pine

Ген PRR7 (NCBI Acc. № JQ969545.1).

Последовательность участка гена *PRR7,* полученная при секвенировании выборки сосны обыкновенной, была выровнена на референсную гомологичную последовательность генома *Pinus taeda* L. В результате выявлен SNP (G/A) (рис. 4), однако установить, находится ли этот SNP в кодирующем участке ДНК, не удалось по причине отсутствия в базах данных последовательностей к ДНК.

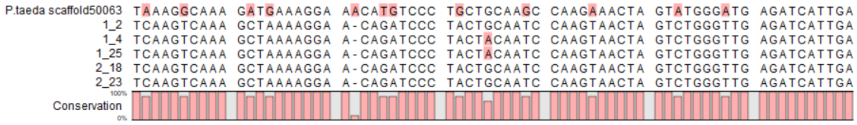

Рис. 4. Полиморфизм (SNP G/A), выявленный у сосны обыкновенной гене *PRR7*

Fig. 4. Polymorphism (SNP G/A) identified in the PRR7 gene of Scots pine

Разработка метода массового скрининга.

Для разработки метода массового скрининга, позволяющего выявлять мутации у анализируемых деревьев без применения дорогостоящего и трудоемкого метода секвенирования, мы использовали тестовую выборку из 100 генотипов ели и 100 генотипов сосны, собранных на объекте лесных культур ели и сосны в квартале 81 Дружносельского лесничества Ленинградской области.

В качестве объектов для молекулярного маркирования были использованы полиморфизмы, выявленные путем секвенирования и описанные выше.

ДНК выделяли из замороженной хвои с помощью CTAB-метода [Rahimah et al. 2006]. Чистоту и концентрацию выделенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Германия). Для проведения анализа отбиралась ДНК с соотношением поглощения (A260/280) от 1,8 до 2. Выделенная ДНК разводилась до концентрации 100 нг/мкл.

Для каждого гена-кандидата были разработаны специфические праймеры, фланкирующие однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), подлежащие анализу (табл. 2). Секвенирование ПЦР-продуктов с использованием анализатора Applied Biosystems 3500 позволило выявить полиморфизмы в генах PhyO и CRY1 у ели и в генах PRR1 и PRR7 у сосны. В качестве методов массового скрининга использовались два метода генотипирования: HRM (High Resolution Melting) и KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) – что обеспечивало надежность и точность выявления SNP в генах-кандидатах.

Таблица 2

Последовательности праймеров для выявления полиморфизма методом HRM и KASP

Primer sequences for polymorphism detection using HRM and KASP methods

Ген	Метод	Название праймера	Последовательность праймера
PhyO (ель)	HRM	Pa_PhyO_HRM_F	GCCAACTCAAAGGTCAGGAT
		Pa_PhyO_HRM_R	CTGTCTCTTTCCCTGCCATT
CRY1 (ель)	HRM	Pa_CRY1_HRM_F	GAAGATCTACCAAATGTGACTAATG
		Pa_CRY1_HRM_R	ATCTCGCCCTCTCAAGATAC
PRR1 (сосна)	HRM	Ps_PRR1_HRM_F	TGCGGTAAGGTATGAGAAAGG
		Ps_PRR1_HRM_R	GTTGAATGCTAAGGATGCGTAAA
PRR7 (сосна)	HRM	Ps_PRR7_HRM_F	GGGAAAGGTAACAACCAGGAA
		Ps_PRR7_HRM_R	CTTGGATTGCAGTAGGGATCTG
PhyO (ель)	KASP	PhyO_KASP_F (аллель X)	CTGTCTCTTTCCCTGCCATTGCAT
		PhyO_KASP_Y (аллель Y)	TGTCTCTTTCCCTGCCATTGCAC
		PhyO_KASP_ Common	GGATTAACAAAGCTCAGGATAGTACTGAA
CRY1 (ель)	KASP	CRY1_KASP_F (аллель X)	AAGATCTACCAAATGTGACTAATGATTATC
		CRY1_KASP_Y (аллель Y)	AAGATCTACCAAATGTGACTAATGATTATG
		CRY1_KASP_ Common	GATTCATTCTGTTCATCTAGGACTTGCAT

HRM-анализ.

Для выявления SNP методом HRM были разработаны праймеры, последовательности которых приведены в табл. 2. Реакции проводились на системе CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с использованием реактивов от компании «Евроген». В реакционную смесь добавляли SYBR Green I (PB025S) для флуоресцентной детекции. Стандартная программа амплификации включала начальную денатурацию при 95 °C в течение 2 минут,

затем 35 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С на 20 секунд, отжига праймеров при температуре 52 °С на 30 секунд и элонгации при 72 °С на 30 секунд. Анализ кривых плавления проводился в диапазоне 70–95 °С с шагом 0,1 °С, что позволяло надежно различать образцы с гомо- и гетерозиготными генотипами.

KASP-анализ.

KASP-генотипирование проводилось с использованием аллель-специфичных праймеров и FRET-кассет с красителями FAM и HEX, которые позволяли дифференцировать аллели по интенсивности свечения. Реакции проводились на приборе CFX96 (Bio-Rad, США), следуя протоколу производителя. В ходе оптимизации протокола были внесены коррективы: для обеспечения четкой кластеризации образцов повышали температуру до 68 °С и увеличивали количество циклов до 36. Программа амплификации включала начальную денатурацию при 94 °С в течение 15 минут, далее 10 циклов с понижением температуры отжига с 68 °С до 62 °С и финальную стадию из 30 циклов при температуре 62 °С.

Результаты исследования. Различия в эффективности HRM и KASP для различных генов подчеркивают необходимость выбора подходящего метода генотипирования с учетом характеристики каждого конкретного гена-кандидата. Для выявления аллельных вариантов, ассоциированных с ключевыми адаптивными признаками, такими как устойчивость к абиотическим стрессам и сроки наступления фенологических фаз, KASP-маркеры продемонстрировали самую высокую точность. HRM, в свою очередь, оказался наименее затратным методом, однако потребовал значительных усилий по оптимизации условий проведения экспериментов.

В результате успешно проведенной апробации на тестовых выборках для скрининга массового материала рекомендованы к использованию приведенные ниже разработанные функциональные молекулярные маркеры.

KASP маркер для выявления SNP (A/G) в гене PhyO ели.

Ген *PhyO* является фоторецептором и отвечает за восприятие света в красном (Red) и дальнем красном (Far Red) спектрах, играя фундаментальную роль в регулировании процессов роста и развития в зависимости от качества света. Ранее было установлено, что частота встречаемости аминокислотной замены Asn835Ser в результате SNP (A/G) в гене фоторецептора фитохрома *PhyO* в популяциях ели европейской разного широтного происхождения тесно коррелирует с изменением длины светового дня и соотно-

шением разных длин волн красного света в местах их произрастания. Частота встречаемости аллеля, кодирующего аспарагин (SNP, A, Asn835), уменьшается в естественных популяциях ели при продвижении по территории Швеции от 67% на севере до 21% на юге [Ranade, García-Gil, 2023]. Соответственно, при продвижении с севера на юг повышается встречаемость альтернативной аллели (SNP, G, 835Ser). Пример использования KASP-маркера, разработанного для гена ели *PhyO* SNP(A/G), представлен на рис. 5.

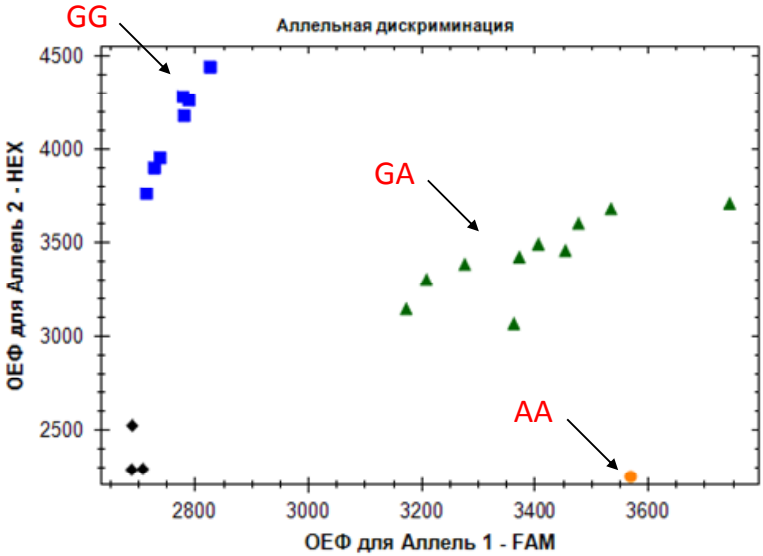

Рис. 5. Пример работы KASP-маркера. Визуализация успешно работающего KASP-маркера, разработанного для гена ели *PhyO* SNP(A/G)

Fig. 5. Example of KASP-marker performance: visualization of a successfully functioning KASP-marker developed for the PhyO Gene SNP (A/G) in Norway spruce

KASP-маркер для выявления SNP (G/C) в гене CRY1 ели.

KASP-маркер для выявления SNP (G/C) в гене *CRY1* ели разработан на полиморфизм, который был впервые обнаружен в ходе секвенирования тестовой выборки елей. Ген *CRY1* кодирует фоторецептор, отвечающий за восприятие света в синем спектре. Как и для другого фитохрома *PhyO,* для

гена *CRY1* ранее сообщалось о наличии широтной клинальности в распространении аллелей в популяциях ели. SNP в экзоне 4 гена *CRY1* ранее не был описан в литературных источниках. Этот впервые выявленный полиморфизм является функциональным, так как приводит к изменению структуры кодируемого белка. На рис. 6 показано, как KASP-маркирование данного полиморфизма может быть использовано для скрининга этой важной функциональной нуклеотидной замены в последовательности гена CRY1 на выборке 100 генотипов ели.

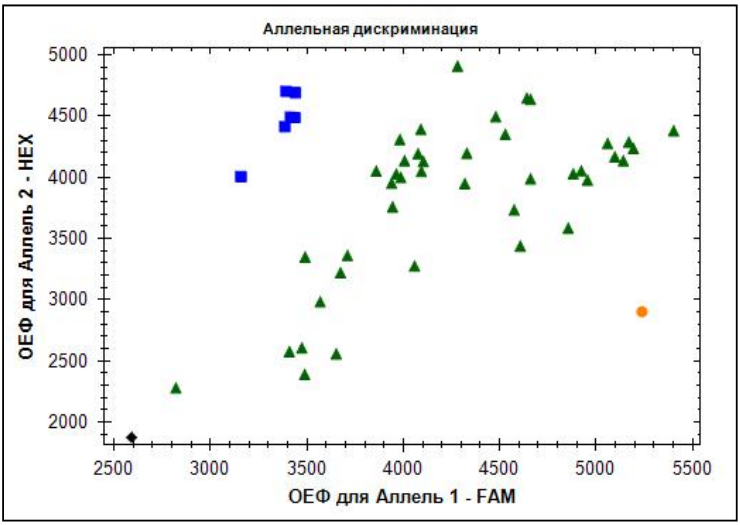

Рис. 6. Пример использования KASP-маркера, разработанного для гена ели *CRY1* SNP(G/C). Синие квадраты – GG, зеленые треугольники – GC, желтые круги – CC

Fig. 6. Example of the usage of KASP-marker developed for the *CRY1* Gene SNP (G/C) in Norway Spruce. Blue squares – GG, green triangles – GC, yellow circles – CC

HRM-маркер для выявления SNP (C/G) в гене PRR1 сосны.

Ген *PRR1* – один из генов циркадных ритмов у растений, который играет важную роль в формировании фотопериодической реакции. Ген влияет на ритмы закладки и распускания почек, ранее в литературе сообщалось о корреляции между миссенс-мутациями в данном гене и сроками закладки

почек у хвойных. HRM-маркер для выявления SNP (C/G) в гене *PRR1* сосны был разработан по результатам секвенирования тестовой выборки деревьев сосны. Пример работы HRM-маркера, разработанного для этого SNP, представлен на рис. 7.

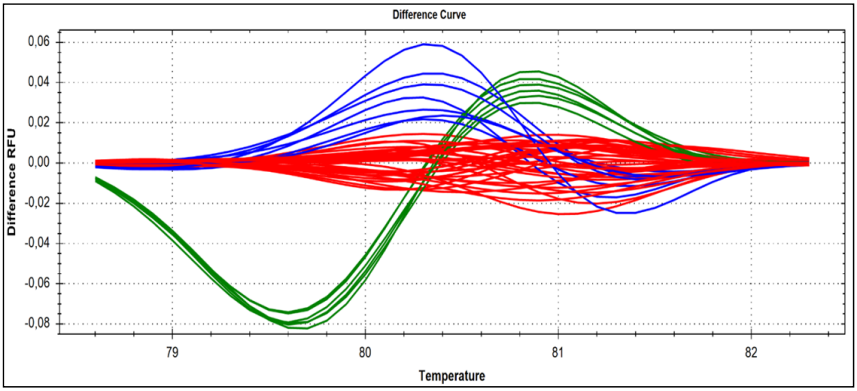

Рис. 7. Пример работы HRM-маркера. Кластеризация образцов тестовой выборки сосны в зависимости от температуры плавления ПЦР-продукта гена PRR1, содержащего SNP (C/G). Синим цветом показана температура плавления для генотипов CC, зеленым – GG, красным – для гетерозигот CG

Fig. 7. Example of HRM-marker performance: clustering of test sample Scots pine based on the melting temperature of the PCR product of the PRR1 gene containing SNP (C/G). Blue lines – melting curve for CC genotypes, green – GG, red – for heterozygotes CG

Заключение. Разработанные молекулярные маркеры на основе KASP- и HRM-технологий позволяют проводить эффективный скрининг аллелей, связанных с адаптивными признаками ели и сосны, что открывает широкие перспективы для использования их в лесной селекции и при мониторинге популяций. Эти маркеры могут использоваться для оценки адаптивного потенциала лесного генетического материала, обеспечивая лесовосстановительные программы генетически приспособленным посадочным материалом. В условиях меняющегося климата подобные подходы могут значительно повысить устойчивость лесных экосистем к экологическим стрессам и способствовать восстановлению лесов с учетом изменения климата.

Применение разработанных маркеров также открывает перспективы для селекционных программ, позволяя отбирать генотипы, оптимально приспособленные к экологическим условиям конкретного местообитания. Массовый скрининг лесных насаждений с использованием функциональных молекулярных маркеров позволил бы более точно установить степень влияния этих аллельных вариантов на формирование адаптивных признаков у хвойных пород.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Сведения о финансировании исследования. Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания ФБУ «СПбНИИЛХ» (№ 053-00012-24-00).

Библиографический список

Королева Т.С., Константинов А.В., Шунькина Е.А. Угрозы и социально-экономические последствия изменения климата для лесного сектора // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2015. № 3. С. 55-71.

Chen J., Källman T., Ma X., Gyllenstrand N., Zaina G., Morgante M., Bousquet J., Eckert A., Wegrzyn J., Neale D., Lagercrantz U., Lascoux M. Disentangling the roles of history and local selection in shaping clinal variation of allele frequencies and gene expression in Norway spruce (*Picea abies*) // Genetics. 2012. Vol. 191, no. 3. P. 865–881.

Chen J., Tsuda Y., Stocks M., Källman T., Xu N., Kärkkäinen K., Huotari T., Semerikov V.L., Vendramin G.G., Lascoux M. Clinal variation at phenology-related genes in spruce: parallel evolution in FTL2 and Gigantea // Genetics. 2014. Vol. 197, no. 3. P. 1025–1038.

Kujala S.T., Savolainen O. Sequence variation patterns along a latitudinal cline in Scots pine (*Pinus sylvestris*): signs of clinal adaptation? // Tree Genetics & Genomes. 2012. Vol. 8. P. 1451–1467.

Rahimah A.B., 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. P. 296–304.

Ranade S.S., García-Gil M. R. Molecular signatures of local adaptation to light in Norway spruce // Planta. 2021. Vol. 253. P. 1–18.

Ranade S.S., García-Gil M. R. Clinal variation in PHY (PAS domain) and CRY (CCT domain)—Signs of local adaptation to light quality in Norway spruce // Plant, Cell & Environment. 2023. Vol. 46, no. 8. P. 2391–2400.

Rweyongeza D.M., Yeh F.C., Dhir N.K. Genetic parameters for bud flushing and growth characteristics of white spruce seedlings // Silvae Genetica. 2010. T. 59, no. 1–6. P. 151–158.

Way D.A., Oren R. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data // Tree physiology. 2010. Vol. 30, no. 6. P. 669–688.

References

Chen J., Källman T., Ma X., Gyllenstrand N., Zaina G., Morgante M., Bousquet J., Eckert A., Wegrzyn J., Neale D., Lagercrantz U., Lascoux M. Disentangling the roles of history and local selection in shaping clinal variation of allele frequencies and gene expression in Norway spruce (*Picea abies*). *Genetics*, 2012, vol. 191, no. 3, pp. 865–881.

Chen J., Tsuda Y., Stocks M., Källman T., Xu N., Kärkkäinen K., Huotari T., Semerikov V.L., Vendramin G.G., Lascoux M. Clinal variation at phenology-related genes in spruce: parallel evolution in FTL2 and Gigantea. *Genetics*, 2014, vol. 197, no. 3, pp. 1025–1038.

Koroleva T.S., Konstantinov A.V., Shun'kina E.A. Threats and socio-economic impacts of climate change for the forest sector. *Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute*, 2015, no. 3, pp. 55-71. (In Russ.)

Kujala S.T., Savolainen O. Sequence variation patterns along a latitudinal cline in Scots pine (*Pinus sylvestris*): signs of clinal adaptation? *Tree Genetics & Genomes*, 2012, vol. 8, pp. 1451–1467.

Rahimah A.B., 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.

Ranade S.S., García-Gil M.R. Molecular signatures of local adaptation to light in Norway spruce. *Planta*, 2021, vol. 253, pp. 1–18.

Ranade S.S., García-Gil M.R. Clinal variation in PHY (PAS domain) and CRY (CCT domain)—Signs of local adaptation to light quality in Norway spruce. *Plant, Cell & Environment*, 2023, vol. 46, no. 8, pp. 2391–2400.

Rweyongeza D.M., Yeh F.C., Dhir N.K. Genetic parameters for bud flushing and growth characteristics of white spruce seedlings. *Silvae Genetica*, 2010, T. 59, no. 1–6, pp. 151–158.

Way D.A., Oren R. Differential responses to changes in growth temperature between trees from different functional groups and biomes: a review and synthesis of data. *Tree physiology*, 2010, vol. 30, no. 6, pp. 669–688.

Материал поступил в редакцию 15.05.2024

Волков В.А., Каржаев Д.С., Сафронычева Е.Д., Тис М.В., Чухланцева К.В., Шаршавикова В.В., Потокина Е.К. Использование KASP- и HRM-маркеров для выявления полиморфизмов, влияющих на адаптивные признаки сосны и ели // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2024. Вып. 251. С. 229–244. DOI: 10.21266/2079-4304.2024.251.229-244

Изменение климатических условий оказывает значительное влияние на лесные экосистемы, особенно на хвойные породы, такие как сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*) и ель европейская (*Picea abies*), которые составляют основу лесов умеренной зоны. Адаптация этих видов к новым экологическим условиям требует учета генетической изменчивости ключевых адаптивных признаков. Настоящее исследование направлено на изучение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах-кандидатах, регулирующих фотопериодическую реакцию и циркадные ритмы, которые играют важную роль в физиологических процессах деревьев. В работе описываются разработка и тестирование молекулярных маркеров, основанных на методах KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) и HRM (High Resolution Melting), для массового генотипирования деревьев. Были идентифицированы SNP в генах фоторецепторов PhyO и CRY1, а также в генах фотопериодической реакции PRR1 и PRR7. Аллельный полиморфизм этих генов демонстрирует географическую клинальность, что свидетельствует об их значительной роли в адаптации деревьев к широтным изменениям фотопериода и температурным градиентам. Результаты исследования подтверждают эффективность методов KASP и HRM для генотипирования, что позволяет использовать разработанные маркеры для мониторинга генетического разнообразия популяций и отбора наиболее адаптивных генотипов в селекционных программах. Такие подходы обеспечивают использование генетически приспособленного посадочного материала в лесовосстановительных мероприятиях, что особенно актуально в условиях меняющегося климата.

Ключевые слова: сосна обыкновенная, ель европейская, однонуклеотидные полиморфизмы, молекулярные маркеры, KASP, HRM, фотопериодическая реакция, циркадные ритмы, генетическое разнообразие, адаптивные признаки, лесовосстановление, климатические изменения.

Volkov V.A., Karzhaev D.S., Safronycheva E.D., Tis M.V., Chukhlantseva K.V., Sharshavikova V.V., Potokina E.K. Application of KASP and HRM markers for detecting polymorphisms affecting adaptive traits in Scots pine and Norway spruce. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj Lesotehniceskoj Akademii*, 2024, iss. 251, pp. 229–244 (in Russian with English summary). DOI: 10.21266/2079-4304.2024.251.229-244

Climate change significantly impacts forest ecosystems, particularly coniferous species such as Scots pine (*Pinus sylvestris*) and Norway spruce (*Picea abies*), which form the basis of temperate forests. The adaptation of these species to new environmental conditions necessitates consideration of the genetic variability of key adaptive traits. This study investigates single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes that regulate photoperiodic response and circadian rhythms, which are critical to tree physiological processes. The research describes the development and testing of molecular markers based on KASP (Kompetitive Allele

Specific PCR) and HRM (High Resolution Melting) methods for high-throughput genotyping. SNPs were identified in the photoreceptor genes *PhyO* and *CRY1* and the photoperiodic response genes *PRR1* and *PRR7*. These polymorphisms exhibit geographic clinality, highlighting their significant role in tree adaptation to latitudinal gradients of light and temperature conditions. The findings confirm the efficiency of KASP and HRM methods for genotyping, enabling the use of these markers for monitoring genetic diversity and selecting resilient genotypes in breeding programs. Such approaches ensure the integration of genetically adapted planting material into reforestation efforts, which is particularly relevant in the context of changing climate conditions.

Keyrords: Scots pine, Norway spruce, single nucleotide polymorphisms, molecular markers, KASP, HRM, photoperiodic response, circadian rhythms, genetic diversity, adaptive traits, reforestation, climate change.

ВОЛКОВ Владимир Александрович – директор центра биоинформатики и геномных исследований Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова; научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства, кандидат биологических наук. SPIN-код: 1473-9800. ORCID: 0000-0002-2933-4456.

194021, Институтский пер., д 5, лит. У, Санкт-Петербург, Россия; 194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: vol-j@mail.ru

VOLKOV Vladimir. A. – PhD (Biological), Director of the Center for Bioinformatics and Genomic Research of St.Petersburg State Forest Technical University; researcher of the Research Department of Genetics and Biotechnology, Saint-Petersburg Forestry Research Institute. SPIN-code: 1473-9800. ORCID: 0000-0002-2933-4456.

194021. Institute per. 5. Let. U. St. Petersburg. Russia; 194021. Institutskiy av. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: vol-j@mail.ru

КАРЖАЕВ Дмитрий Сергеевич – младший научный сотрудник центра биоинформатики и геномных исследований Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова, аспирант СПбГЛТУ; младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. SPIN-код: 1864-2827. ORCID: 0000-0002-2444-9502.

194021, Институтский пер., д. 5, лит. У, Санкт-Петербург, Россия; 194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: karzhaevd@gmail.com

KARZHAEV Dmitry S. – junior researcher at the Centre for Bioinformatics and Genomic Research of St. Petersburg State Forest Technical University, PhD student of SPbFTU; junior researcher of the Research Department of Genetics and Biotechnology of the St. Petersburg Forestry Research Institute. SPIN-code: 1864-2827. ORCID: 0000-0002-2444-9502.

194021. Institute per. 5. Let. U. St. Petersburg. Russia; 194021. Institutskiy av. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: karzhaevd@gmail.com

САФРОНЫЧЕВА Елизавета Дмитриевна – младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. SPIN-код: 4971-2924.

194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: esafronycheva@mail.ru

SAFRONYCHEVA Elizaveta D. – Junior researcher of the Research Department of Genetics and Biotechnology of the St. Petersburg Forestry Research Institute. SPIN-code: 4971-2924.

194021. Institutskiy av. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: esafronycheva@mail.ru

ТИС Маргарита Витальевна – лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. SPIN-код: 1716-7665.

194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия.

TIS Margarita V. – Research assistant of the Research Department of Genetics and Biotechnology of the St. Petersburg Forestry Research Institute. SPIN-code: 1716-7665.

194021. Institutskiy av. 21. St. Petersburg. Russia.

ЧУХЛАНЦЕВА Ксения Витальевна – лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства.

194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия.

CHUKHLANTSEVA Ksenia V. – Research assistant of the Research Department of Genetics and Biotechnology of the St. Petersburg Forestry Research Institute.

194021. Institutskiy av. 21. St. Petersburg. Russia.

ШАРШАВИКОВА Вероника Владимировна – лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства.

194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия.

SHARSHAVIKOVA Veronika V. – Research assistant of the Research Department of Genetics and Biotechnology of the St. Petersburg Forestry Research Institute.

194021. Institutskiy av. 21. St. Petersburg. Russia.

ПОТОКИНА Елена Кирилловна – ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства, доктор биологических наук. SPIN-код: 7270-0032.

194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: e.potokina@yahoo.com

POTOKINA Elena K. – DSc (Biological), Senior researcher of the Research Department of Genetics and Biotechnology of the St. Petersburg Forestry Research Institute. SPIN-code: 7270-0032.

194021. Institutskiy av. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: e.potokina@yahoo.com