

**Е.Д. Сафронычева, М.А. Григорьев, Д.С. Каржаев,  
В.В. Шаршавикова, М.В. Тис, Н.А. Павлов, В.А. Волков**

**РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ  
ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ФОРМИРОВАНИЕ  
АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ У СОСНЫ**

*Введение.* Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) выступает эдификатором бореальных лесов Европы [Lundqvist et al., 2019]. Изменения климата представляют серьезную угрозу для устойчивости популяций данного вида. Повышение среднегодовой температуры провоцирует учащение и интенсификацию абиотических стрессоров, таких как засухи, поздневесенние заморозки и лесные пожары, что, в свою очередь, ослабляет древостои и повышает их уязвимость к биотическим факторам – вспышкам численности насекомых-вредителей и распространению фитопатогенов [Millar, Stephenson, 2015; Seidl et al., 2017].

В естественных популяциях сосны наблюдается локальная адаптация к упомянутым стрессорам, так как частота их встречаемости варьируется в разных частях ее ареала [Leites, Benito Garzón, 2023]. Данный эволюционный потенциал может быть использован в селекционных программах. Одним из перспективных подходов является отбор и использование улучшенного лесосеменного материала, обладающего повышенной устойчивостью к ключевым стресс-факторам, для создания лесных культур [Feng et al., 2024]. В частности, эффективным инструментом для ускорения селекционного процесса выступает маркер-опосредованная селекция (Marker-Assisted Selection, MAS), позволяющая проводить отбор по целевым признакам на ранних стадиях развития растений на основе молекулярных маркеров [Muranty et al., 2014].

На текущий момент было проведено несколько исследований, посвященных изучению генетической основы локальной адаптации у различных видов сосны [Butcher, Southerton, 2007]. Несмотря на это, гены, связанные с формированием адаптации у сосны обыкновенной, остаются малоизученными из-за отсутствия полногеномной референсной сборки. Имеющиеся черновые сборки не позволяют провести достоверный полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) – наиболее производительный метод для реше-

ния таких задач. Это обуславливает использование альтернативных стратегий, среди которых ключевое место занимает кандидат-генный подход. Его суть заключается в целевом анализе генов, гомологи которых ассоциированы с интересующими функциями у других видов.

Настоящее исследование направлено на выявление аллельных вариантов в генах-кандидатах, потенциально вовлеченных в формирование адаптации у сосны обыкновенной. Исследуемые гены были отобраны по литературным источникам как гомологи генов, ассоциированных с устойчивостью к стрессам у близкородственных хвойных видов. Исследование проведено на материале географических культур, выращенных из семян, собранных в различных регионах СССР. Полученные данные станут первыми шагами на пути создания молекулярных маркеров для селекции сосны обыкновенной. Использование таких маркеров позволит значительно ускорить создание посадочного материала, оптимально приспособленного к конкретным условиям произрастания.

*Описание генов.* Отбор генов-кандидатов для исследования проводили по литературным источникам с фокусом на гены, ассоциированные с адаптивными признаками у других видов хвойных. Основным критерием для включения в исследование было наличие нуклеотидных последовательностей гомологов выбранных генов для сосны обыкновенной в общедоступных базах данных.

Ген *PRR1* (PlantGenIE Acc. № MA\_71728g0010) относится к семейству генов Pseudo Response Regulator. *PRR1* у *Arabidopsis*, также известный как *TOC1* (Timing Of CAB Expression 1) – один из ключевых компонентов циркадных часов [Hotta, 2022]. У арабидопсиса *TOC1* регулирует циклическую экспрессию генов, включая подавление утренних компонентов циркадного ритма (*CCA1/LHY*) в вечернее время [Ito, 2008]. В исследовании [Caré et al., 2024] сообщается, что у ели в гене *PaPRR1* обнаружены SNP, ассоциированные с высотой расположения популяций над уровнем моря. Также указано, что экспрессия *PaPRR1* предположительно индуцируется в дневное время, т. е. зависит от светового стимула. В том же исследовании упоминается, что экспрессия *PaPRR1* может быть связана не только с циркадными циклами, но и с защитными реакциями в ответ на внешние стимулы [Caré et al., 2024].

Ген *PRR7* (*P.taeda* genome assembly scaffold50063) так же, как и *PRR1*, является частью циркадной системы, помогая координировать ритмы экспрессии генов, физиологических процессов (фотосинтез, устьица, гормональные циклы) с суточным световым циклом. В отличие от *PRR1* (*TOC1*),

функция которого проявляется преимущественно в вечернее или ночное время, *PRR7* демонстрирует пик экспрессии днём, т. е. действует раньше по ходу суточной осцилляции. У мутантов *PRR7* арабидопсиса наблюдается снижение чувствительности к красному/дальнему красному свету при деэтиоляции (переходе от роста в темноте к росту на свету). Таким образом, *PRR7* выступает как посредник в фотосигнальных путях через фитохромы [Kaczorowski, Quail, 2003]. Кроме того, у арабидопсиса *PRR7* подвергается температурно-зависимой деградации (например, при холоде) через ген High Expression Of Osmotically Responsive Gene 15 (*HOS15*), что влияет на устойчивость растений к заморозкам [Kim et al., 2024].

Дегидрины – белки семейства LEA II (Late Embryogenesis Abundant), которые накапливаются при стрессах, связанных с обезвоживанием: холод, засуха, осмотический стресс. Дегидрины, как правило, гидрофильны, стабилизируют мембраны, белки и другие структуры клетки при потере воды, выступают как «молекулярные щиты» против повреждений, вызванных стрессом [van Zee et al., 1995]. У хвойных растений они демонстрируют сезонную динамику: в сосновых иглах их количество увеличивается весной и осенью, когда клетки испытывают дефицит влаги и перепады температур, с локализацией в хлоропластах, митохондриях и клеточной стенке [Korotaeva et al., 2015]. В исследованиях дегидрины рассматриваются как важные регуляторы процессов адаптации хвойных деревьев к засухе и температурным стрессам [Wachowiak et al., 2009; Stival Sena et al., 2018].

Ранее нами был обнаружен SNP, локализованный в четвертом интроне *PRR1* у сосны, расщепляющийся в популяции Ленинградской области. Также в гомологе *PRR7* сосны была обнаружена аналогичная мутация [Волков и др., 2024]. На выявленные полиморфизмы были разработаны KASP-маркеры.

В гене *dhn1* (NCBI Acc. № *FJ201299.1*), кодирующем дегидрин 1 у сосны, в первом интроне и первом экзоне в ходе секвенирования были обнаружены сцепленные полиморфизмы – три SNPs и делеция длиной 108 п.о. Попытка маркировать один из выявленных SNP (C/T) с помощью KASP-метода не была успешной, так как близко расположенные однонуклеотидные полиморфизмы искажали получаемые результаты. Для выявления аллельного статуса сцепленных полиморфизмов в гене *dhn1* были разработаны STS-маркеры, фланкирующие inDel длиной 108 пн (рис. 1).

Описанные гены являются регуляторами важнейших процессов роста и развития сосны и влияют на динамику развития растений и реакцию на абиотические и биотические стрессы.

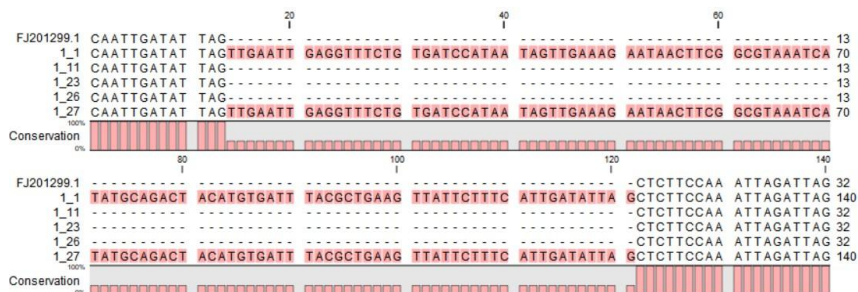


Рис. 1. Полиморфизм (делеция), выявленный у сосны обыкновенной в гене *dhnl*  
 Fig. 1. Polymorphism (deletion) identified in Scots pine in the *dhnl* gene

В работе также были использованы два гена митохондриального генома – *COX1* (NCBI Acc. № KP954672.1) и *ATP-A* (NCBI Acc. № KP954674.1). Ранее полиморфизмы данных генов были использованы для филогеографических исследований в пределах западной части Восточной Европы, в Крыму и на Кавказе [Семериков и др., 2015]. Несмотря на то, что митохондриальные гены не являются адаптивными, на их полиморфизмы также были разработаны KASP-маркеры. Они могут значительно упростить использование этих генов в филогенетических исследованиях.

**Материалы и методика исследования.** Для апробации разработанных маркеров была сформирована тестовая выборка из популяции сосны, произрастающей в географических культурах в Любанском (Тосненском) участковом лесничестве, кв. 69, выделы 10, 11, 12. Географические культуры сосны, площадью 29,0 га, были заложены сотрудниками ЛенНИИЛХ в 1976-1977 гг. Объект расположен в подзоне южной тайги, географические координаты 59°30' с. ш. 30°52' в. д. В культурах испытывается семенное потомство 43 климатипов сосны, семена которых были собраны в разных географических пунктах бывшего Советского Союза [Лесные..., 2024]. С учетом различных географических и климатических условий мест исходных заготовок семян объекты географических культур сосны оптимально подходят для целей апробации молекулярных маркеров, разработанных для адаптивных генов хвойных пород.

Был проведен сбор образцов хвои (100 деревьев) из 4 разных климатипов: Ленинградская обл., Карелия, Эстония и Удмуртия (табл. 1).

Таблица 1

Описание климатипов географических культур сосны, вошедших в тестовую выборку [Лесные..., 2024]

Description of climatypes from Scots pine geographic cultures included in the test sample [Лесные..., 2024]

| № климатипа по гос. реестру | Район заготовки семян |               | Географические координаты |        |
|-----------------------------|-----------------------|---------------|---------------------------|--------|
|                             | регион                | лесхоз        | с. ш.                     | в. д.  |
| 19                          | Ленинградская         | Тосненский    | 59°30'                    | 30°54' |
| 16                          | Карелия               | Сортавальский | 61°50'                    | 30°28' |
| 24                          | Эстония               | Элвасский     | 58°10'                    | 26°28' |
| 67                          | Удмуртия              | Воткинский    | 57°03'                    | 54°00' |

Собранные образцы хвои до начала процедур выделения ДНК хранились в кельвинаторе при –80 °С. Выделение ДНК проводили с помощью модифицированного СТАВ метода [Rahimah et al., 2006]. Генотипирование образцов проводилось с использованием 4 KASP-маркеров и 1 STS-маркера. Все маркеры были нацелены на полиморфизмы в генах-кандидатах, найденные с помощью секвенирования по Сэнгеру.

Нуклеотидные последовательности разработанных праймеров представлены в табл. 2.

Таблица 2

Перечень разработанных маркеров  
List of developed markers

| Название гена, детектируемый полиморфизм | Последовательность праймера  |                             |                               |
|------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|                                          | Прямой 1 (FAM for KASP)      | Прямой 2 (HEX for KASP)     | Обратный                      |
| <i>PRR1</i> , SNP G/C                    | ACTTTGAGTGTCT<br>CTCAGGG     | ACTTTGAGTGTCT<br>TCTCAGCG   | CGTAAATCAATGC<br>AGCTCAACAAAA |
| <i>PRR7</i> , SNP G/A                    | CCCAGACTAGTT<br>ACTTGGATTGTA | CCAGACTAGTTA<br>CTTGGATTGCA | AACCAGGAAAAAT<br>CTTTGAGCTC   |
| <i>dhn1</i> , deletion 108 bp            | CAAACCATTTGAT<br>GTTGGCTCTT  | —                           | CTCGCCTTCTTCC<br>TCTTCATC     |
| <i>COX1</i> , SNP A/C                    | CGAGGAACAGCA<br>AGACCTTATTAT | AGGAACAGCAA<br>GACCTTATTCT  | TATTTGGGTTGCC<br>CCGTC        |
| <i>ATP-A</i> , SNP A/C                   | GCCAGTCATAGC<br>GGACAT       | GCCAGTCATAGC<br>GGACCT      | TCTGGCGGTCAAT<br>GTGTC        |

Для проведения ПЦР с использованием KASP-маркеров была подготовлена смесь праймеров, состоящая из двух прямых аллель-специфичных

праймеров и одного универсального обратного праймера, праймеры концентрацией 10 мкМ смешивались в пропорции 1:1:3. Для проведения ПЦР использовался коммерческий набор KASP 2x Master Mix (LGC Biosearch Technologies, Великобритания).

Реакционная смесь на один образец состояла из 1X KASP Master Mix, 10 нМ прямых праймеров и 30 нМ обратного праймера, примерно 20 нг ДНК в конечном объеме 10 мкл. Амплификация проводилась методом RealTime PCR.

Условия амплификации: съёмка до начала амплификации – 1 мин при 30 °С; начальный цикл денатурации – 15 мин при 94 °С; 10 циклов по 20 с при 94 °С и 1 мин при 61 °С; 60 циклов по 20 с при 94 °С и 1 мин при 55 °С; съёмка после амплификации – 1 мин при 37 °С. Все этапы сопровождались плавным градиентом изменения температуры на 1,6 °С/с.

Реакционная смесь для проведения ПЦР с использованием STS-маркера состояла из 1X Taq Turbo buffer, 0,4 мкМ dNTP, 0,5 нМ прямого и обратного праймеров, 1 ед TaqDNA Polymerase и примерно 20 нг ДНК в конечном объеме 10 мкл.

Условия амплификации: начальный цикл денатурации – 5 мин при 95 °С; 30 циклов по 30 с при 95 °С, 30 с при 62 °С и 35 с при 72 °С; финальная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Результаты KASP-маркирования представлены на рис. 2 и 3. Синие и жёлтые отметки на графиках соответствуют гомозиготам различных аллелей, зелёные – гетерозиготам.

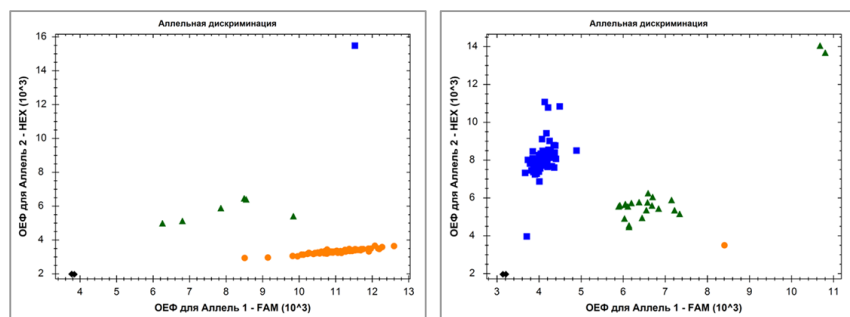


Рис. 2. График дискриминации аллелей SNP (G/C) в гене *PRR1* (слева) и SNP (G/A) в гене *PRR7* (справа)

Fig. 2. Allele discrimination plot for the SNP (G/C) in the *PRR1* gene (left) and the SNP (G/A) in the *PRR7* gene (right)

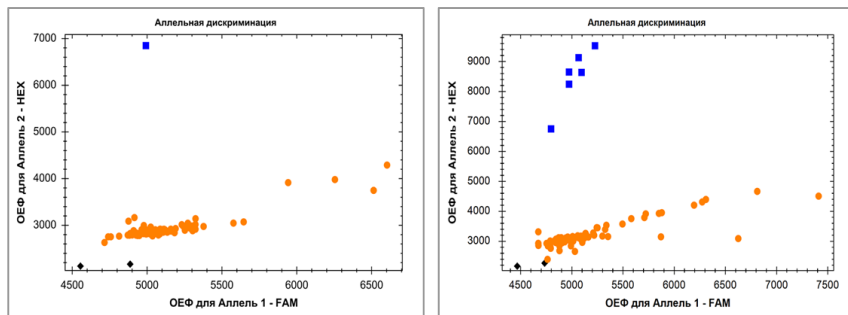


Рис. 3. График дискриминации аллелей SNP (A/C) в митохондриальном гене *COX1* (слева) и SNP (A/C) в митохондриальном гене *ATP-A* (справа)

Fig. 3. Allele discrimination plot for the SNP (A/C) in the mitochondrial *COX1* gene (left) and the SNP (A/C) in the mitochondrial *ATP-A* gene (right)

На рис. 4 представлен пример визуализации продуктов STS-маркеров для гена *dhn1*. Продукт размером 346 п.о. указывает на отсутствие делеции, 238 п.о. – на наличие делеции, наличие обоих продуктов указывает на гетерозиготность исследуемого образца.

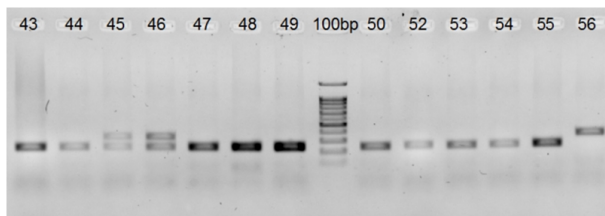


Рис. 4. Пример визуализации продуктов ПЦР с применением STS-маркера на ген *dhn1* у сосны

Fig. 4. Example of PCR product visualization using the STS-marker for the *dhn1* gene in pine

Результаты генотипирования представлены в процентном соотношении различных аллельных вариантов в каждом из климатипов (табл. 3).

**Статистическая обработка.** Для анализа закономерностей распределения различных аллелей по климатипам использовался тест Фишера, который позволяет проводить попарное сравнение на небольшом количестве данных. На рис. 5 представлены результаты сравнения в виде тепловой карты: по вертикали расположены гены, по горизонтали – попарные сравнения всех климатипов.

Таблица 3

Сводная таблица генотипирования образцов

Summary table of sample genotyping

| Ген          | Вариант аллели | Климатип      |            |           |            |
|--------------|----------------|---------------|------------|-----------|------------|
|              |                | Ленинградский | Карельский | Эстонский | Удмуртский |
| <i>PRR1</i>  | GG             | 100           | 95         | 100       | 85         |
|              | CC             | 0             | 5          | 0         | 0          |
|              | GC             | 0             | 0          | 0         | 15         |
| <i>PRR7</i>  | AA             | 75            | 60         | 75        | 87,5       |
|              | GG             | 0             | 5          | 0         | 0          |
|              | AG             | 25            | 35         | 25        | 12,5       |
| <i>dhn1</i>  | del-del        | 75            | 80         | 80        | 70         |
|              | norm-norm      | 10            | 0          | 5         | 5          |
|              | hetero         | 15            | 20         | 15        | 25         |
| <i>COX1</i>  | A              | 100           | 95         | 100       | 100        |
|              | C              | 0             | 5          | 0         | 0          |
| <i>ATP-A</i> | A              | 90            | 90         | 95        | 97,5       |
|              | C              | 10            | 10         | 5         | 2,5        |

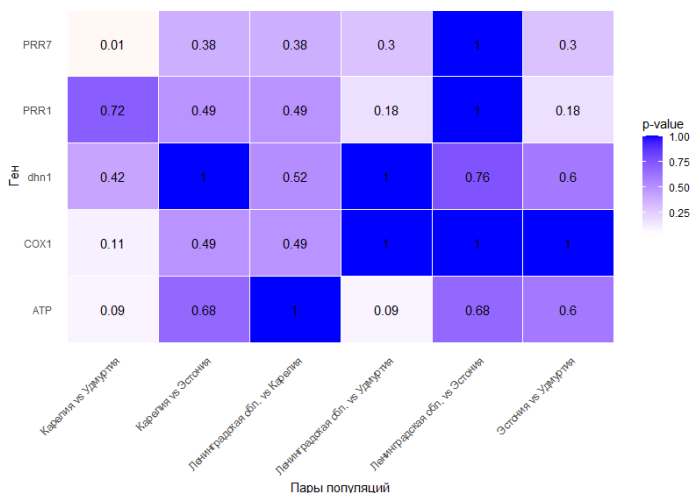


Рис. 5. Тепловая карта попарных сравнений климатипов по результатам генотипирования выборки

Fig. 5. Heatmap of pairwise comparisons between climatypes based on sample genotyping results

Цвет и его интенсивность отражают значение  $p$ -value – статистического критерия достоверности. Зависимость считается достоверной, если её  $p$ -value меньше или равен 0,05. Дополнительно значение  $p$ -value отражено в виде числового значения в соответствующем поле графика.

Как видно из рис. 5, образцы из Карелии показали значительное достоверное отличие по маркеру *PRR7* относительно образцов из Удмуртии. Можно сделать вывод, что данный SNP имеет разную частоту встречаемости в северо-западных и юго-восточных популяциях. Так как по данному гену не было выявлено закономерностей при сравнении с другими климатическими типами, имеющими схожую широту, можно предположить, что он имеет клин по долготе.

**Заключение.** Настоящее исследование направлено на апробацию ген-кандидатного подхода в разработке молекулярных маркеров, ассоциированных с адаптацией сосны обыкновенной к различным экологическим условиям России. В ходе работы на основе данных секвенирования были разработаны ПЦР-маркеры для пяти генов-кандидатов. Анализ аллельных частот в географических культурах выявил статистически значимую дифференциацию между карельским и удмуртским климатическими типами по маркеру в гене *PRR7*, что согласуется с его известной ролью в контроле циркадных ритмов и фотопериодической чувствительности. Это позволяет рассматривать разработанный на него маркер как перспективный для исследования адаптивно значимых признаков.

Полученные результаты демонстрируют принципиальную возможность использования ген-кандидатного подхода для изучения адаптивной изменчивости сосны. Отсутствие четких ассоциаций для остальных исследованных генов может свидетельствовать о более сложном, полигенном контроле адаптации либо о необходимости увеличения объема выборки.

**Сведения о финансировании исследования.** Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания ФБУ «СПб-НИИЛХ» на проведение прикладных научных исследований от 26.12.2024 № 053-00005-25-00 по теме «Разработка лабораторного регламента молекулярного маркирования генов, участвующих в формировании адаптивных реакций у ели и сосны, для использования при планировании лесовосстановления в условиях климатических изменений» (шифр 2-Г25 молекулярное маркирование).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Библиографический список

Волков В.А., Каржаев Д.С., Сафроньчева Е.Д., Тис М.В., Чухланцева К.В., Шаршавикова В.В., Потоккина 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.

Лесные генетические ресурсы России: изучение, сохранение, использование, управление: коллективная монография в 2 кн. Пушкино: Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, 2024. 546 с.

Семериков В.Л., Путинцева Ю.А., Орешкова Н.В., Семерикова С.А., Крутовский К.В. Разработка новых маркеров митохондриальной ДНК сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) для популяционно-генетических и филогеографических исследований // Генетика. 2015. Т. 51, № 12. С. 1386-1390. DOI: 10.7868/S0016675815120103.

Butcher P., Southerton S. Marker Assisted Selection in Forestry Species // Marker Assisted Selection: Current Status and Future Perspectives in Crop, Livestock, Forestry and Fish. Rome, 2007. Ch. 15. P. 284-305.

Caré O., Chano V., Erley M., Rogge M., Gailing O. Circadian rhythm and redox homeostasis candidate genes showed association with shallow elevation in Norway spruce // Plant Biology. 2024. Vol. 26, iss. 4. P. 508-520. DOI: 10.1111/plb.13642.

Feng J., Dan X., Cui Y., Gong Y., Peng M., Sang Y., Ingvarsson P.K., Wang J. Integrating evolutionary genomics of forest trees to inform future tree breeding amid rapid climate change // Plant Communications. 2024. Vol. 5, iss. 10. Art. no. 101044. DOI: 10.1016/j.xplc.2024.101044.

Hotta C.T. The evolution and function of the PSEUDO RESPONSE REGULATOR gene family in the plant circadian clock // Genetics and Molecular Biology. 2022. Vol. 45, iss. 3 Suppl 1. Art. no. e20220137. DOI: 10.1590/1678-4685-gmb-2022-0137.

Ito S., Niwa Y., Nakamichi N., Kawamura H., Yamashino T., Mizuno T. Insight into missing genetic links between two evening-expressed pseudo-response regulator genes TOC1 and PRR5 in the circadian clock-controlled circuitry in *Arabidopsis thaliana* // Plant and cell physiology. 2008. Vol. 49, iss. 2. P. 201-213. DOI: 10.1093/pcp/pcm178.

Kaczorowski K.A., Quail P.H. Arabidopsis PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock // The Plant Cell. 2003. Vol. 15, iss. 11. P. 2654-2665. DOI: 10.1105/tpc.015065.

Kim Y.J., Kim W.Y., Somers D.E. HOS 15-mediated turnover of PRR 7 enhances freezing tolerance // New Phytologist. 2024. Vol. 244, iss. 3. P. 798-810. DOI: 10.1111/nph.20062.

Korotaeva N., Romanenko A., Suvorova G., Ivanova M.I., Lomovatskaya L., Borovskii G., Voinikov V. Seasonal changes in the content of dehydrins in mesophyll cells of common pine needles // Photosynthesis Research. 2015. Vol. 124. P. 159-169. DOI: 10.1007/s11120-015-0112-2.

Leites L., Benito Garzón M. Forest tree species adaptation to climate across biomes: Building on the legacy of ecological genetics to anticipate responses to climate change // Global Change Biology. 2023. Vol. 29, iss. 17. P. 4711-4730. DOI: 10.1111/gcb.16711.

Lundqvist L., Ahlström M.A., Axelsson E.P., Mörling T., Valinger E. Multi-layered Scots pine forests in boreal Sweden result from mass regeneration and size stratification // *Forest Ecology and Management*. 2019. Vol. 441. P. 176-181. DOI: 10.1016/j.foreco.2019.03.044.

Millar C.I., Stephenson N.L. Temperate forest health in an era of emerging mega-disturbance // *Science*. 2015. Vol. 349, iss. 6250. P. 823-826. DOI: 10.1126/science.aaa9933.

Muranty H., Jorge V., Bastien C., Lepoittevin C., Bouffier L., Sanchez L. Potential for marker-assisted selection for forest tree breeding: lessons from 20 years of MAS in crops // *Tree Genetics & Genomes*. 2014. Vol. 10, iss. 6. P. 1491-1510. DOI: 10.1007/s11295-014-0790-5.

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 // *Journal of Oil Palm Research*. 2006. Vol. 18. P. 296-304.

Seidl R., Thom D., Kautz M., Martin-Benito D., Peltoniemi M., Vacchiano G., Wild J., Ascoli D., Petr M., Honkaniemi J., Lexer M.J., Trotsiuk V., Mairota P., Svoboda M., Fabrika M., Nagel T.A., Rey C.P.O. Forest disturbances under climate change // *Nature climate change*. 2017. Vol. 7, iss. 6. P. 395-402. DOI: 10.1038/nclimate3303.

Stival Sena J., Giguère I., Rigault P., Bousquet J., Mackay J. Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression // *Tree Physiology*. 2018. Vol. 38, iss. 3. P. 442-456. DOI: 10.1093/treephys/tpx125.

Wachowiak W., Balk P.A., Savolainen O. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // *Tree Genetics & Genomes*. 2009. Vol. 5, iss. 1. P. 117-132. DOI: 10.1007/s11295-008-0188-3.

van Zee K., Chen F.Q., Hayes P.M., Close T.J., Chen T.H.H. Cold-specific induction of a dehydrin gene family member in barley // *Plant Physiology*. 1995. Vol. 108, iss. 3. P. 1233-1239. DOI: 10.1104/pp.108.3.1233.

## References

Butcher P., Southerton S. Marker Assisted Selection in Forestry Species. *Marker Assisted Selection: Current Status and Future Perspectives in Crop, Livestock, Forestry and Fish*. Rome, 2007, ch. 15, pp. 284-305.

Caré O., Chano V., Erley M., Rogge M., Gailing O. Circadian rhythm and redox homeostasis candidate genes showed association with shallow elevation in Norway spruce. *Plant Biology*, 2024, vol. 26, iss. 4, pp. 508-520. DOI: 10.1111/plb.13642.

Feng J., Dan X., Cui Y., Gong Y., Peng M., Sang Y., Ingvarsson P.K., Wang J. Integrating evolutionary genomics of forest trees to inform future tree breeding amid rapid climate change. *Plant Communications*, 2024, vol. 5, iss. 10, art. no. 101044. DOI: 10.1016/j.xplc.2024.101044.

Forest Genetic Resources of Russia: Study, Conservation, Use, Management: a collective monograph in 2 books. Pushkino: All-Russian Research Institute of Forestry and Mechanization of Forestry, 2024. 546 p. (In Russ.)

Hotta C.T. The evolution and function of the PSEUDO RESPONSE REGULATOR gene family in the plant circadian clock. *Genetics and Molecular Biology*, 2022, vol. 45, iss. 3 Suppl 1, art. no. e20220137. DOI: 10.1590/1678-4685-gmb-2022-0137.

Ito S., Niwa Y., Nakamichi N., Kawamura H., Yamashino T., Mizuno T. Insight into missing genetic links between two evening-expressed pseudo-response regulator genes TOC1 and PRR5 in the circadian clock-controlled circuitry in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology*, 2008, vol. 49, iss. 2, pp. 201–213. DOI: 10.1093/pcp/pcm178.

Kaczorowski K.A., Quail P.H. Arabidopsis PSEUDO-RESPONSE REGULATOR7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock. *The Plant Cell*, 2003, vol. 15, iss. 11, pp. 2654–2665. DOI: 10.1105/tpc.015065.

Kim Y.J., Kim W.Y., Somers D.E. HOS 15-mediated turnover of PRR 7 enhances freezing tolerance. *New Phytologist*, 2024, vol. 244, iss. 3, pp. 798–810. DOI: 10.1111/nph.20062.

Korotaeva N., Romanenko A., Suvorova G., Ivanova M.I., Lomovatskaya L., Borovskii G., Voinikov V. Seasonal changes in the content of dehydrins in mesophyll cells of common pine needles. *Photosynthesis Research*, 2015, vol. 124, pp. 159–169. DOI: 10.1007/s11120-015-0112-2.

Leites L., Benito Garzón M. Forest tree species adaptation to climate across biomes: Building on the legacy of ecological genetics to anticipate responses to climate change. *Global Change Biology*, 2023, vol. 29, iss. 17, pp. 4711–4730. DOI: 10.1111/gcb.16711.

Lundqvist L., Ahlström M.A., Axelsson E.P., Mörling T., Valinger E. Multi-layered Scots pine forests in boreal Sweden result from mass regeneration and size stratification. *Forest Ecology and Management*, 2019, vol. 441, pp. 176–181. DOI: 10.1016/j.foreco.2019.03.044.

Millar C.I., Stephenson N.L. Temperate forest health in an era of emerging megadisturbance. *Science*, 2015, vol. 349, iss. 6250, pp. 823–826. DOI: 10.1126/science.aaa9933.

Muranty H., Jorge V., Bastien C., Lepoittevin C., Bouffier L., Sanchez L. Potential for marker-assisted selection for forest tree breeding: lessons from 20 years of MAS in crops. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, vol. 10, iss. 6, pp. 1491–1510. DOI: 10.1007/s11295-014-0790-5.

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. *Journal of Oil Palm Research*, 2006, vol. 18, pp. 296–304.

Seidl R., Thom D., Kautz M., Martin-Benito D., Peltoniemi M., Vacchiano G., Wild J., Ascoli D., Petr M., Honkaniemi J., Lexer M.J., Trotsiuk V., Mairota P., Svoboda M.,

Fabrika M., Nagel T.A., Reyer C.P.O. Forest disturbances under climate change. *Nature climate change*, 2017, vol. 7, iss. 6, pp. 395-402. DOI: 10.1038/nclimate3303.

Semerikov V.L., Putinseva Yu.A., Oreshkova N.V., Semerikova S.A., Krutovskiy K.V. Development of New Mitochondrial DNA Markers for Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) for Population-Genetic and Phylogeographic Studies *Genetika*, 2015, vol. 51, no. 12, pp. 1386-1390. DOI 10.7868/S0016675815120103. (In Russ.)

Stival Sena J., Giguère I., Rigault P., Bousquet J., Mackay J. Expansion of the dehydrin gene family in the Pinaceae is associated with considerable structural diversity and drought-responsive expression. *Tree Physiology*, 2018, vol. 38, iss. 3, pp. 442-456. DOI: 10.1093/treephys/tpx125.

Volkov V.A., Karzhayev D.S., Safronycheva E.D., Tis M.V., Chukhlantseva K.V., Sharshavikova V.V., Potokina E.K. Use of KASP and HRM Markers for Detection of Polymorphisms Affecting Adaptive Traits of Pine and Spruce. *Izvestiya Sankt-Peterburgskoy Lesotekhnicheskoy Akademii*, 2024, iss. 251, pp. 229-244. DOI: 10.21266/2079-4304.2024.251.229-244. (In Russ.)

Wachowiak W., Balk P.A., Savolainen O. Search for nucleotide diversity patterns of local adaptation in dehydrins and other cold-related candidate genes in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree Genetics & Genomes*, 2009, vol. 5, iss. 1, pp. 117-132. DOI: 10.1007/s11295-008-0188-3.

van Zee K., Chen F.Q., Hayes P.M., Close T.J., Chen T.H.H. Cold-specific induction of a dehydrin gene family member in barley. *Plant Physiology*, 1995, vol. 108, iss. 3, pp. 1233-1239. DOI: 10.1104/pp.108.3.1233.

Материал поступил в редакцию 19.12.2025

---

**Сафронычева Е.Д., Григорьев М.А., Каржаев Д.С., Шаршавикова В.В., Тис М.В., Павлов Н.А., Волков В.А.** Разработка молекулярно-генетических маркеров генов, вовлеченных в формирование адаптивной реакции у сосны // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. 2026. Вып. 257. С. 238–254. DOI: 10.21266/2079-4304.2026.257.238-254

В условиях глобального изменения климата, приводящего к учащению засух, заморозков и всплеск численности вредителей, актуальной задачей является селекция сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на повышение устойчивости. Перспективным инструментом для ускорения селекционного процесса является маркер-опосредованная селекция (MAS), требующая разработки молекулярных маркеров, связанных с адаптивными признаками. Целью настоящего исследования была разработка и первичная апробация таких маркеров. Ввиду отсутствия полногеномной референсной сборки для сосны обыкновенной был применен кандидат-генный подход. В работе сфокусировались на генах, гомологи которых у близкородственных видов ассоциированы с адаптацией: *PRR1* и *PRR7* (компоненты циркадных часов, участвующие в реакции на фотопериод и температурный стресс), *dhn1* (дегидрин, обеспечивающий устойчивость к

обезвоживанию), а также митохондриальных генах *COX1* и *ATP-A* (филогенетические маркеры). На основе выявленных методом секвенирования полиморфизмов (SNP и делеция) были разработаны 4 KASP- и 1 STS-маркер. Их апробация проведена на географических культурах сосны на выборке из 100 деревьев четырех климатипов (Ленинградская обл., Карелия, Эстония, Удмуртия). Статистический анализ с использованием точного критерия Фишера выявил достоверное различие ( $p \leq 0,05$ ) в частотах аллелей гена *PRR7* между карельским и удмуртским климатипами, что указывает на возможную долготную клинальность этого локуса и его потенциальную информативность для оценки адаптивной дифференциации популяций. Для остальных генов в рамках данной выборки четких ассоциаций не установлено. Результаты работы демонстрируют эффективность кандидат-генного подхода для начального этапа разработки молекулярных маркеров адаптации у сосны обыкновенной и закладывают основу для дальнейших исследований по установлению надежных фенотип-генотипных связей с целью последующего применения в селекционных программах для создания устойчивого посадочного материала.

**Ключевые слова:** сосна обыкновенная, однонуклеотидные полиморфизмы, ген-кандидатный подход, молекулярные маркеры, KASP, STS, адаптивные признаки, лесовосстановление, климатические изменения.

**Safronycheva E.D., Grigoryev M.A., Karzhaev D.S., Sharshavikova V.V., Tis M.V., Pavlov N.A., Volkov V.A.** Development of molecular genetic markers of genes encoding adaptive response methods in pine. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj Lesotekhnicheskoy Akademii*, 2026, iss. 257, pp. 238–254 (in Russian with English summary). DOI: 10.21266/2079-4304.2026.257.238-254

Under the conditions of global climate change, which leads to increased frequency of droughts, frosts, and pest outbreaks, the breeding of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) for enhanced resilience is an urgent task. Marker-assisted selection (MAS) is a promising tool for accelerating the breeding process, requiring the development of molecular markers associated with adaptive traits. The aim of this study was to develop and preliminarily test such markers. Due to the lack of a whole-genome reference assembly for Scots pine, a candidate-gene approach was employed. The study focused on genes whose homologs in related species are associated with adaptation: *PRR1* and *PRR7* (components of the circadian clock involved in response to photoperiod and temperature stress), *dhn1* (a dehydrin conferring resistance to dehydration), as well as the mitochondrial genes *COX1* and *ATP-A* (phylogenetic markers). Based on polymorphisms (SNPs and a deletion) identified by sequencing, 4 KASP and 1 STS markers were developed. Their testing was conducted on geographical cultures of pine using a sample of 100 trees from four climotypes (Leningrad Region, Karelia, Estonia, Udmurtia). Statistical analysis using Fisher's exact test revealed a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) in allele frequencies of the *PRR7* gene between the Karelian and Udmurtian climotypes, indicating a potential longitudinal cline for this locus and its potential

informativeness for assessing adaptive population differentiation. For the other genes, no clear associations were established within this sample. The results demonstrate the effectiveness of the candidate-gene approach for the initial stage of developing molecular markers for adaptation in Scots pine and lay the groundwork for further research to establish reliable phenotype-genotype linkages with the aim of subsequent application in breeding programs to create resilient planting material.

**Keywords:** Scots pine, single nucleotide polymorphisms, candidate gene approach, molecular markers, KASP, STS, adaptive traits, reforestation, climate change.

---

**САФРОНЫЧЕВА Елизавета Дмитриевна** – младший научный сотрудник центра биоинформатики и геномных исследований Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова;

194021, Институтский пер., д. 5, лит. У, Санкт-Петербург, Россия;

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 at the Centre for Bioinformatics and Genomic Research, St.Petersburg State Forest Technical University;

194021. Institute per. 5. Let. U. St. Petersburg. Russia;

Junior Researcher at the Scientific Research Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg Forestry Research Institute. SPIN-code: 4971-2924.

194021. Institute per. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: esafronycheva@mail.ru

**ГРИГОРЬЕВ Матвей Александрович** – лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологий Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства;

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

студент Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова.

194021, Институтский пер., д. 5, лит. У, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: dagrmaeiui@gmail.com

**GRIGORYEV Matvey A.** – Laboratory Research Assistant at the Scientific Research Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg Forestry Research Institute;

194021. Institute per. 21. St. Petersburg. Russia;

student, St.Petersburg State Forest Technical University.

194021. Institute per. 5. Let. U. St. Petersburg. Russia. E-mail: dagrmaeiui@gmail.com

**КАРЖАЕВ Дмитрий Сергеевич** – младший научный сотрудник Центра биоинформатики и геномных исследований Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова.

194024, Институтский пер., д. 5, Санкт-Петербург, Россия;

научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства.

194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: karzhaevd@gmail.com

**KARZHAEV Dmitry S.** – Junior Researcher at the Center for Bioinformatics and Genomic Research, St.Petersburg State Forest Technical University.

194024. Institute per. 5. St. Petersburg. Russia;

Researcher at the Scientific Research Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg Forestry Research Institute.

194021. Institute per. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: karzhaevd@gmail.com

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

194021, Институтский пр., д. 21, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: veronikasharshavikova@gmail.com

**SHARSHAVIKOVA Veronika V.** – Laboratory Research Assistant at the Scientific Research Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg Forestry Research Institute.

194021. Institute per. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: veronikasharshavikova@gmail.com

**ТИС Маргарита Витальевна** – младший научный сотрудник Центра биоинформатики и геномных исследований Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова.

194024, Институтский пер., д. 5, Санкт-Петербург, Россия;

младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства;

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

аспирант ИТМО;

197101, Кронверкский пр., д. 49, лит. А, Санкт-Петербург, Россия;

младший инженер-исследователь Проектного центра агротехнологий Сколковского института науки и технологий. SPIN-код: 1716-7665. ORCID: 0009-0009-6998-8823.

121205, Большой бульвар, д. 30, стр. 1, Москва, Россия. E-mail: margarita.tis@yahoo.com

**TIS Margarita V.** – Junior Researcher at the Center for Bioinformatics and Genomic Research, St.Petersburg State Forest Technical University;

194024. Institute per. 5. St. Petersburg. Russia;

Junior Researcher at the Scientific Research Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg Forestry Research Institute.

194021. Institute per. 21. St. Petersburg. Russia;

PhD student, ITMO;

197101. Kronverkskiy av. 49. Let. A. St. Petersburg. Russia;

Junior Research Engineer at the Project Center for Agro Technologies, Skolkovo Institute of Science and Technology. SPIN-code: 17167665. ORCID: 0009-0009-6998-8823.

121205. Bolshoy boul. 30. Bld. 1. Moscow. Russia. E-mail: margarita.tis@yahoo.com

**ПАВЛОВ Никита Александрович** – стажёр-исследователь центра био- и медицинских технологий Сколковского института науки и технологий, магистрант Сколтеха.

121205, Большой бульвар, д. 30, стр. 1, Москва, Россия.

**PAVLOV Nikita A.** – Research intern at the Center for Bio- and Medical Technologies, Skolkovo Institute of Science and Technology, Skoltech master's student.

121205. Bolshoy boul. 30. Bld. 1. Moscow. Russia.

**ВОЛКОВ Владимир Александрович** – директор Центра биоинформатики и геномных исследований Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова;

194024, Институтский пер., д. 5, Санкт-Петербург, Россия;

научный сотрудник научно-исследовательского отдела генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства, кандидат биологических наук.

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, St.Petersburg State Forest Technical University;

194024. Institute per. 5. St. Petersburg. Russia;

Researcher at the Scientific Research Department of Genetics and Biotechnology, Saint Petersburg Forestry Research Institute.

194021. Institute per. 21. St. Petersburg. Russia. E-mail: vol-j@mail.ru