

УДК 575.224.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРОВ ОРГАНЕЛЬНОЙ ДНК ДЛЯ АНАЛИЗА ФИЛОГЕОГРАФИИ ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ *PICEA ABIES* (L.) N. KARST.

© 2014 г. Е.К. Потокина^{1,2}, А.А. Киселева^{1,4}, М.А. Николаева²,
С.А. Иванов², П.С. Ульянич², А.Ф. Потокин^{2,3}

¹ Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова,
Санкт-Петербург, Россия, e-mail: e.potokina@vir.nw.ru;

² Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова,
Санкт-Петербург, Россия;

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 9 сентября 2014 г. Принята к публикации 3 октября 2014 г.

История формирования ареала ели европейской на территории Восточно-Европейской равнины обсуждается по результатам анализа аллельного разнообразия митохондриального гена *Nad1*, имеющего материнскую природу наследования, и межгенного спейсера *trnT-trnF* хлоропластной ДНК, наследуемой у елей по отцовской линии. Полиморфизм генов органельной ДНК проанализирован на выборке из 221 ели из 28 регионов РФ, представленной в географических культурах. У елей всех регионов европейской части РФ выявлены аллели *Nad1*, типичные для «северной семьи» *Picea abies*, распространенные также в Скандинавии и Западной Европе. Аллель *Nad1*, характерный для «южной семьи» *P. abies*, обнаружен в популяциях ели из Закарпатья. Аллель *Nad1*, видоспецифичный для *P. obovata*, выявлен только у елей из Свердловской области и Красноярского края. У проанализированных деревьев обнаружены гаплотипы хлДНК, как характерные для *P. obovata*, так и специфичные для *P. abies*. Анализ полиморфизма органельной ДНК позволяет выявить гибридную природу елей, развившихся в результате переопыления между особями разных видов.

Ключевые слова: Филогеография, органельная ДНК, молекулярные маркеры, *Nad1*, *trnT-trnF*, *Picea*, географические культуры.

ВВЕДЕНИЕ

Процессы интрогрессивной гибридизации, протекающие на территории Русской равнины в популяциях ели европейской (*P. abies* (L.) N. Karst.) и ели сибирской (*P. obovata* Ledeb.), интенсивно изучаются с использованием морфометрических и молекулярно-биологических методов. Естественные гибриды между *P. abies* и *P. obovata*, часто обособляемые в отдельный таксон *P. fennica* (Regel) Kom. (ель финская), представляют интерес не только для систематиков, но и специалистов по лесному хозяйству. Сообщается, в частности, о связи между про-

дуктивностью и таксономической принадлежностью образцов ели сибирской, ели европейской и ели финской (Егоров и др., 2011). Вопрос о разработке молекулярных маркеров, позволяющих идентифицировать виды елей, а также их возможных гибридов является актуальным.

У сравнительно долгоживущих организмов, таких, как древесные хвойные, очертание ареала и популяционно-генетическая структура вида несут отпечаток истории послеледниковых миграций (Newton *et al.*, 1999). *P. abies* – один из первых видов древесных растений, которые колонизировали Центральную Европу после последнего оледенения, примерно 12 тыс. лет

назад (по: Gugerli *et al.*, 2001). Считается, что ели европейской удалось уцелеть, благодаря нескольким рефугиумам. Один гипотетический рефугиум располагался в европейской части России, откуда в западном и северо-западном направлении, вслед за отступающим Скандинавским ледниковым щитом, мигрировала так называемая «северная семья» ели европейской (northern lineage, по: Tolledsrud *et al.*, 2008a). В настоящее время эта северная группа популяций ели широко представлена в Скандинавии, странах Западной Европы и Прибалтике (Giesecke, Bennett, 2004). «Южная семья» (southern lineage) ели европейской распространилась в Центральной Европе из рефугиумов в горах Европы, включая Альпы, Карпаты и горы Балканского полуострова. Таким образом, в Западной Европе естественный ареал *P. abies* в настоящее время представлен двумя обособленными территориями: северо-восточная лесная часть и горы Центральной Европы (Schmidt-Vogt, 1977) (рис. 1). В районе Среднепольской возвышенности имеет место дизъюнкция ареала («spruceless zone»), которая, возможно, возникла в результате послеледниковой миграций популяций ели во встречных направлениях (Dering *et al.*, 2009). Недавно опубликованные филогенетические исследования рода *Picea*, основанные на анализе органельной и ядерной ДНК, свидетельствуют о том, что обособление северной и южной «семей»

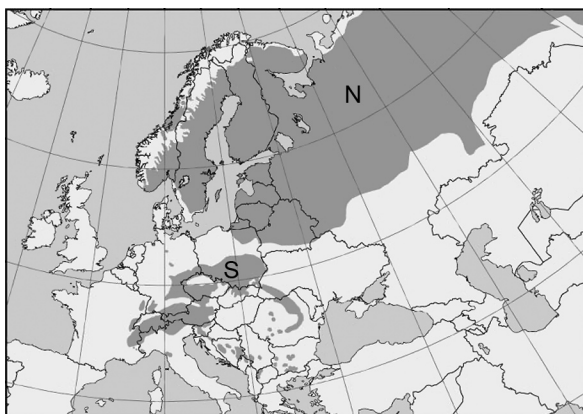


Рис. 1. Ареал *P. abies* в Европе с дизъюнкцией в районе Среднепольской возвышенности (по: (Schmidt-Vogt, 1977)).

N и S – разграниченные дизъюнкцией области распространения северной и южной «семей» ели европейской по результатам анализа мтДНК (Tolledsrud *et al.*, 2008a).

P. abies могло произойти гораздо раньше, около 6 млн лет назад, задолго до начала последнего оледенения (Lockwood *et al.*, 2013).

Для уточнения вопросов филогеографии видов хвойных эффективно используется полиморфизм митохондриального (мтДНК) и хлоропластного (хлДНК) геномов. мтДНК наследуется исключительно по материнской линии, что означает распространение различных вариантов мтДНК через семена, но не посредством пыльцы. Из-за отсутствия рекомбинации мтДНК наследуется как единый гаплотип – набор тесно сцепленных локусов (Минченко, Дударева, 1990). Исследование полиморфизма митохондриальных генов является хорошей основой для изучения процессов миграции и географической разрозненности популяций вида (Sperisen *et al.*, 2001). хлДНК также представляет интерес для филогенетических исследований, благодаря особенностям наследования. Для семейства *Pinaceae* доказано отцовское наследование хлДНК (Sears, 1980; Neale, Sederov, 1989; Neale *et al.*, 1991; Sutton *et al.*, 1991). Суммируя данные, полученные с использованием маркеров мтДНК и хлДНК, можно оценить относительный вклад пыльцы и семян в общем потоке генов, идентифицировать родительские формы гибридов и, таким образом, вести мониторинг процессов интрогрессивной гибридизации между *P. abies* и *P. obovata*.

Цель нашего исследования состояла в том, чтобы по результатам анализа полиморфизма митохондриального гена *Nad1* и межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК на выборках популяций ели из разных регионов европейской части РФ установить материнскую линию наследования интрогрессивных форм *P. abies*–*P. obovata*, населяющих территорию европейской части РФ, и оценить частоту встречаемости гибридных елей, возникших в результате переопыления особей *P. abies* пыльцой *P. obovata*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследований были использованы ели из географических культур, заложенных в 70-х годах прошлого столетия в различных регионах европейской части России с целью разработки и совершенствования лесосеменного районирования. Закладка объектов

осуществлялась в 1977 г. по единой государственной методике. Испытанию подлежали 35 климатипов – популяций ели из разных областей и республик бывшего СССР. Разница между крайними популяциями по широте составила 19,70° (Мурманская область – Закарпатье), по долготе – 43,00° (Литва – Свердловская область). Семена этих популяций были высеяны в разных климатических зонах РФ структурированными плантациями, которые на сегодняшний день и представляют собой, собственно, географические культуры. Один из изучаемых вариантов таких географических культур расположен в Любанском лесничестве (Тосненский лесхоз, Ленинградская область), другой вариант – в Караидельском лесничестве (Южно-Уральский лесостепной район, Республика Башкортостан). Географические культуры являются удобным объектом изучения внутривидового генетического разнообразия, так как представляют собой репрезентативную выборку популяций ели из разных регионов европейской части РФ, выращенных в одинаковых условиях. В исследовании вошли 28 климатипов ели (табл. 1). Дополнительно были исследованы также образцы елей, собранные в период экспедиции в Красноярский край (заповедник «Столбы»), для увеличения числа образцов «чистого» вида *P. obovata*.

Анализ полиморфизма продуктов ПЦР

Для проведения молекулярно-генетического анализа в качестве матрицы использовалась ДНК, выделенная СТАВ-методом по Vousquet с соавт. (1990) из свежей хвои, собранной в географических культурах *P. abies*, *P. obovata* и их гибридов, произрастающих в Любанском и Караидельском лесничествах.

Для анализа аллелей митохондриального гена *Nad1*, содержащего tandemные минисателлитные повторы, полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием термоциклера GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1× буфер для *Taq*-полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Силекс, Россия), 200 мкмоль dNTPs, 0,5 мкмоль каждого из праймеров, 1 ед. *Taq*-полимеразы (Диалат, Россия) и 2 мкл (30–60 нг) исследуемой ДНК.

Для проведения ПЦР использовались праймеры, опубликованные Gugerli (2001): прямой – CTCTCCCTCACCCATATGATG; обратный – AGATCCCCATATATGCCCGG, а также режим проведения ПЦР, рекомендованный автором: преденатурация – 3 мин при 94 °С, далее 26 циклов (1 мин – 94 °С, 1 мин – 57 °С и 2 мин – 72 °С), заключительный этап – 5 мин при 72 °С. Полученные продукты ПЦР были подвергнуты рестрикции с *EcoRV* для укорочения области, содержащей повторяющиеся элементы. Это позволяет более точно установить размеры амплифицированной последовательности (Tollefsrud *et al.*, 2008a). Рестрикцию с использованием *EcoRV* проводили в объеме 15 мкл, содержащем 3 мкл ПЦР-продукта, 10,25 мкл воды, 1,5 мкл буфера и 0,25 мкл (1 ед.) рестриктазы в течение 3 ч при + 37 °С.

Анализ размера рестрикционных фрагментов осуществлялся с использованием автоматической станции капиллярного электрофореза высокого разрешения QIAxcel System Capillary Electrophoresis (Qiagen). При использовании QIAxcel длина фрагментов рассчитывалась с помощью внутренних стандартов, в качестве которых использованы маркеры соответствия (QX Alignment Marker 15bp/3kb), устанавливающие верхний (3000 н.п.) и нижний (15 н.п.) порог детекции. Одновременно использовался внутренний стандарт – набор фрагментов ДНК известного размера (QX Size Marker 25bp/1,8kb), различающихся по длине на 25 нуклеотидов.

ПЦР-фрагменты, различающиеся по длине по результатам рестрикционного анализа, секвенировали в двух повторностях (Евроген, Москва) с использованием прямого и обратного праймеров. Выравнивание ДНК-последовательностей проводили с использованием BioEdit 7.1.

Для анализа полиморфизма межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК были использованы «универсальные» праймеры Taberlet с соавт. (1991): «а» – CATTACAAATGCGATGCTCT, «d» – GGGGATAGAGGGACTTGAAC. Реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала 1×буфер для *Taq*-полимеразы (pH = 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Силекс, Россия), 200 мкмоль dNTPs, 1 мкмоль каждого из праймеров, 5 ед. *Taq*-полимеразы (Диалат, Россия) и 2 мкл (60–80 нг) исследуемой ДНК. ПЦР проводилась при следующем режиме: преденатурация – 5 мин при

Таблица 1
 Географическое происхождение елей, взятых в анализ, и гаплотипы мтДНК и хлДНК, выявленные среди различных климатипов ели европейской в географических культурах Лубанского и Карaidельского лесничеств

№ климатипа	Регион (область)	Пункт сбора	Координаты	Число генотипов в анализе	Гаплотипы мтДНК (<i>NadI</i>)		Гаплотипы хлДНК (<i>trnI-trnF</i>)		
					Северная семья <i>P. abies</i>	Южная семья <i>P. abies</i>	<i>P. obovata</i>	<i>P. abies</i>	
1	Мурманская	Мончегорск	67°51'N – 32°57'E	5	721				<i>P. obovata</i>
2	Карелия	Сегежа	63°75'N – 34°31'E	7	721, 755, 823, 857				
5	Ленинградская	Тосно	59°30'N – 30°52'E	5	721, 823, 857				
6	Ленинградская	Лисино	59°30'N – 30°54'E	6	721, 789				_CAC
7	Псковская	Великие Луки	56°23'N – 30°30'E	11	721, 755, 789				_CCC, _CAC
8	Эстония	Вильянди	58°24'N – 25°38'E	10	721, 789				_CCC, _CAC
12	Могилевский	Чериковский	53°30'N – 31°24'E	6	721				_CCC, _CAC
17	Закарпатье	Раково	48°07'N – 24°03'E	10	721, 789	815			
18	Закарпатье	Ивано-Франковск	48°50'N – 24°44'E	6	721	815			
21	Архангельская	Коноша	60°58'N – 40°11'E	6	721, 789				_CAC
22	Архангельская	Котлас	61°15'N – 46°54'E	6	721, 857				_CAC
24	Вологодская	Череповец	59°07'N – 37°57'E	6	721, 755, 823				_CAC
25	Коми	Корткерос	61°41'N – 51°31'E	6	721				_CCC, _CAC
26	Коми	Сосногорск	63°27'N – 53°55'E	5	721, 789, 857				GCCA, _CCA

Окончание таблицы 1

№ климатического типа	Регион (область)	Пункт сбора	Координаты	Число генотипов в анализе	Гаплотипы мтДНК (<i>NadI</i>)			Гаплотипы хлДНК (<i>trnT-trnF</i>)	
					Северная семья <i>P. abies</i>	Южная семья <i>P. abies</i>	<i>P. obovata</i>	<i>P. abies</i>	<i>P. obovata</i>
27	Костромская	Галич	58°24'N – 42°20'E	6	721			_CAC, _CCC	GCCA
28	Кировская	Слободской	58°49'N – 50°06'E	6	721, 755			_CAC	_CCA
29	Московская	Солнечногорск	56°10'N – 36°58'E	11	721, 755, 789, 857				GCCA
29а	Московская	Загорье	56°19'N – 38°09'E	6	721			_CCC, _CAC	GCCA
30	Тверская	Нелидово	56°14'N – 32°48'E	6	721			_CAC	
32	Калужская	Калуга	54°25'N – 36°16'E	6	721, 823, 857			_CAC	GCCA
34	Татарстан	Сабинский	56°00'N – 50°30'E	16	721, 755, 857			_CCC, _CAC	_CCA
35	Удмуртия	Ижевск	56°50'N – 53°10'E	6	721, 755			_CCC	
36	Башкирский	Красный Ключ	55°43'N – 55°15'E	6	721				_CCC
38	Пермский	Красновишерск	60°12'N – 57°08'E	11	721			_CCC, _CAC	
39	Пермский	Добрянка	58°16'N – 56°25'E	11	721, 857			_CCC, _CAC	GCCA
40	Свердловская	Карпинск	59°51'N – 60°00'E	12	721, 755, 857				
41	Свердловская	Нижний Тагил	51°54'N – 60°00'E	11	721, 789				
42	Свердловская	Тавда	58°04'N – 65°18'E	12	721		712		GCCA

94 °С, далее 35 циклов (45 с – 94 °С, 1 мин – 55 °С и 2 мин – 72 °С), заключительный этап – 5 мин при 72 °С. ПЦР-продукт был секвенирован в двух повторностях с использованием праймеров «а» и «д».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ полиморфизма митохондриального гена *Nad1*

Для анализа полиморфизма мтДНК у ели были использованы маркеры, разработанные для гена *Nad1*, кодирующего первую субъединицу одного из ключевых белков дыхательной цепи NADH-дегидрогеназы (NADH dehydrogenase subunit1) (Sperisen *et al.*, 2001). *Nad1* отличается полиморфной последовательностью второго интрона, в которой присутствуют tandemные повторы длиной в 34 и 32 нуклеотида (мини-сателлиты). Участок в 34 нуклеотида у разных индивидуумов может повторяться от 0 до 10 раз, и смежный с ним элемент длиной 32 нуклеотида характеризуется аналогичной копийностью. Кроме того, имеются еще 11 дополнительных полиморфных сайтов, фланкирующих tandemные повторы, 5 из которых могут влиять на размер фрагмента (Sperisen *et al.*, 2001). Проведенный ранее анализ полиморфизма второго интрона митохондриального гена *Nad1* у *P. abies* (Tollesfrud *et al.*, 2008a) позволил выявить аллели, специфичные для северной и южной «семей» ели европейской, а также аллель, видоспецифичный для *P. obovata*. Все выявленные аллели различаются по длине амплифицируемого фрагмента, который варьирует от 712 п.н. (*P. obovata*) до 1027 п.н. (северная «семья» *P. abies*).

В нашем исследовании структура второго интрона гена *Nad1* была проанализирована у 221 ели, произрастающей в географических культурах Любанского и Караидельского лесничеств, а также трех образцов елей *P. obovata* из Красноярского края. Для первичного анализа использовалась ПЦР с последующей рестрикцией продукта эндонуклеазой *EcoRV* (рис. 2) для более точной оценки размера амплифицируемого фрагмента. После визуализации продуктов рестрикции на 1,5 %-м агарозном геле их точный размер анализировался с использованием капиллярного электрофореза высокого

разрешения (QIAxcel). Всего при анализе 221 дерева было обнаружено 9 различающихся по длине аллелей гена *Nad1*, которые были секвенированы. Результаты секвенирования выявленных аллелей представлены на рис. 3 и обобщены на рис. 4.

Семь из девяти аллелей гена *Nad1*, различающихся длиной tandemных повторов и нуклеотидными вставками-делециями различной протяженности (рис. 4), были описаны ранее Tollefsrud с соавт. (2008a) как характерные для «северной семьи» *P. abies*. Еще один аллель (815 п.н.), описанный ранее для «южной семьи» ели европейской (Tollefsrud *et al.*, 2008a), был выявлен у деревьев, выращенных из семян, собранных в Закарпатье, т. е. наиболее южной области из представленных в географических культурах и вошедших в исследование. Аллель *Nad1*, специфичный для *P. obovata*, был выявлен только у образцов ели, собранных в Красноярском крае (заповедник «Столбы»), и у единственного дерева из 36 представителей «свердловского» климатипа елей, изученных в географических культурах. Этот видоспецифичный для *P. obovata* вариант последовательности второго интрона *Nad1* длиной 712 п.н. был описан ранее Tollefsrud с соавт. (2008a). По результатам секвенирования, он отличается от всех известных аллелей «северной семьи» *P. abies* делецией в 9 нуклеотидов и двумя

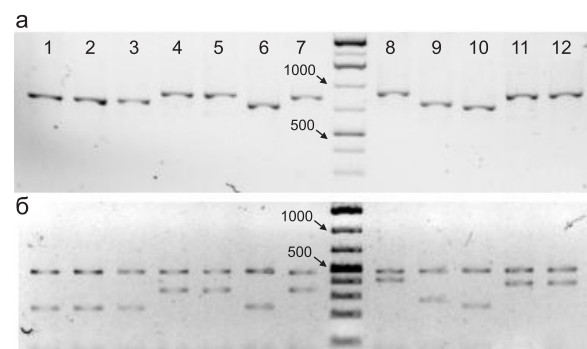


Рис. 2. Аллели митохондриального гена *Nad1*, выявленные у деревьев *P. abies* в географических культурах Любанского и Караидельского лесничеств с помощью геноспецифичной ПЦР (а) и последующей рестрикции ПЦР-продукта с *EcoRV* (б).

Выявленные аллели *Nad1*: 1, 2, 3, 6, 10 – 721 п.н.; 4, 5 – 789 п.н.; 7 – 815 п.н.; 8 – 857 п.н.; 9 – 755 п.н.; 11, 12 – 823 п.н.

	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
AF254636	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KF896145	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KF896146	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KM588355	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KM588356	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KF896147	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KF896148	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KF896149	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KM588357	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
KM588358	TTATACACCTTTATTTTCTTCCCTTAAAGGGGCTTTGAAAGGACTTTCGGAAGATCTGTCTCACAATGGGTAACCTGATCCCTTAAAGCTCCTATCTATCTATCTATTCTATCTATTCTTCTAGTCTGTTCGGCGGCAGCAAGATACAA															
AF254636	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	
KF896145	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KF896146	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KM588355	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KM588356	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KF896147	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KF896148	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KF896149	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KM588357	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
KM588358	TTAAGAGCAATTTTATGCGCTCGACCGATGTAATTCATAGTCTTAAAGAGAGACAACAACACTTAAAGTAAGTCTTTCACATCTCTTCCAGGACCTTTTAAAGAGGAAAGCCCGCTAGCCGAATCCCTTTCCTTTGCCGTAGCCTAGG															
AF254636	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
KF896145	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
KF896146	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
KM588355	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
KF896147	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
KF896148	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
KF896149	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
KM588357	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
KM588358	TTAAGGTTAATCTTATTCGGCTTCCAGCTTTCAGGGGGAAGAAATAAGGGACCTTCCCTTCCATCCGTTAAGACCTAGCCAGCTAGGAGGAAAGGCAAGATCTATAGTTTACAAGATCCGCACTAGTGAATCGTACTCTTC															
AF254636	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280								
KF896145	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KF896146	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KM588355	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KM588356	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KF896147	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KF896148	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KF896149	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KM588357	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															
KM588358	CGTTAAACAATTCASAATGAAATCTATAGTGTGCCCAATTTTAGAACCTTCGGAGGGACCCTGAGTCTCCGGGAAATATATGAGGGATCT															

Рис. 3. Нуклеотидные последовательности 9 аллелей митохондриального гена *NadI*, выявленные при анализе 221 ели различных климатипов с территории Восточно-Европейской равнины, представленных в географических культурах. GenBank Accession No. AF254636.1 – консенусная последовательность второго интрона *NadI* (Spreisen *et al.*, 2001); KF896145, KF896146, KF896147, KF896148, KF896149 – гаплотипы второго интрона гена *NadI*, опубликованные ранее (Volkova *et al.*, 2014); KM588355, KM588356, KM588357, KM588358 – гаплотипы второго интрона гена *NadI*, выявленные в ходе данного исследования.

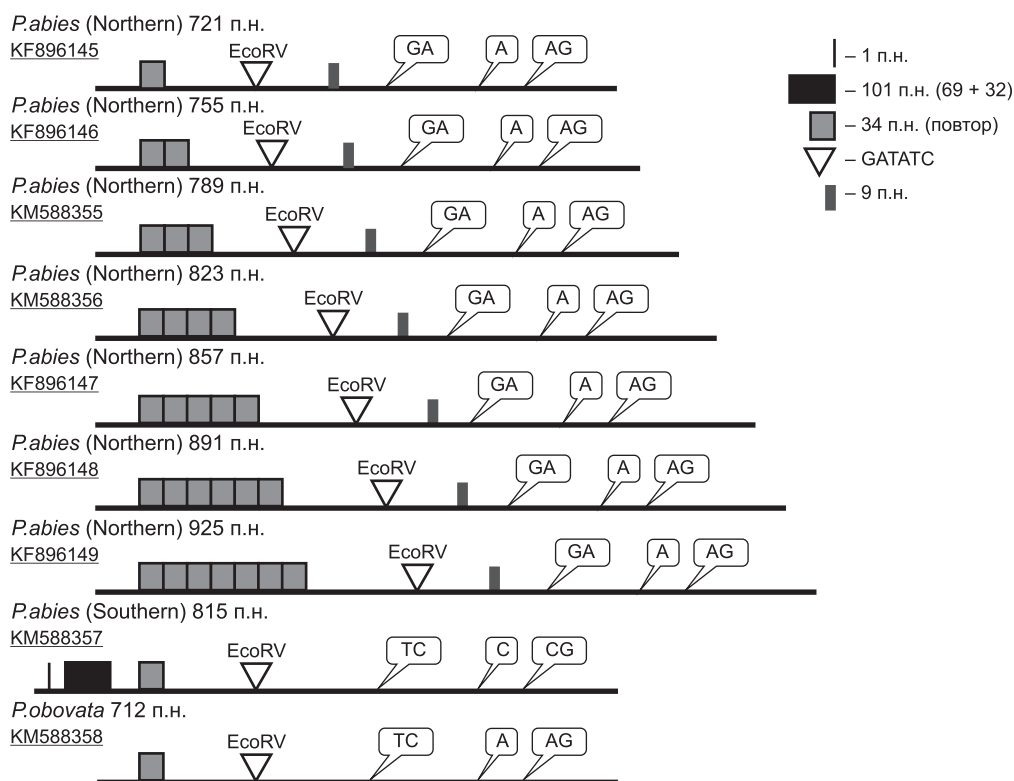


Рис. 4. Варианты структуры второго интрона митохондриального гена *Nad1*, выявленные при анализе елей в географических культурах Любанского и Караидельского лесничеств.

Треугольником отмечен сайт рестрикции *EcoRV*. Последовательности KM588355, KM588356, KM588357, KM588358 представлены к депонированию в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

нуклеотидными заменами. От «южной семьи» *P. abies* его также можно отличить по двум де- лениям (рис. 4).

Таким образом, все многообразие елей, представленное в изученной выборке, по поли- морфизму митохондриального гена *Nad1* можно свести к трем кластерам, соответствующим груп- пам популяций, вероятно, связанным общностью происхождения. «Северная семья» *P. abies*, широко представленная в странах Северной Европы, объединяет также и ели, произрас- тающие практически во всех регионах евро- пейской части РФ. К «южной семье» *P. abies* относятся образцы ели из Закарпатья. К виду *P. obovata*, по результатам маркирования мт- ДНК, относятся все образцы елей из заповед- ника «Столбы» (Красноярский край) и един- ственный экземпляр в географических культурах происхождения из наиболее восточного пун- кта Свердловской области, представленного в анализе (пос. Тавда, 65°18' в.д.).

О распространении аллелей гена *Nad1* среди различных климатипов ели в географических культурах можно судить по табл. 1. Наиболее рас- пространенным является аллель длиной 721 п.н., характерный для популяций ели Северо-Запад- ного и Центрального регионов России, который также является доминирующим в популяциях «северной семьи» *P. abies* в странах Северной Европы (Tollefsrud, 2008a). Остальные аллели *Nad1* представлены значительно реже и не обнаруживают какой-либо географической приуроченности.

Анализ полиморфизма межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК

В результате ПЦР с «универсальными» прай- мерами, описанными Taberlet с соавт. (1991), амплифицируется участок межгенного спей- сера *trnT-trnF* хлДНК длиной 1031 п.н. Четыре различных варианта структуры этого участка

хлДНК (гаплотипа) были выявлены ранее при анализе 50 популяций елей с территории Восточно-Европейской равнины, которая считается зоной интрогрессивной гибридизации видов *P. abies* и *P. obovata* (Толлефсруд, Спиренсен, 2011). По мнению авторов, ель сибирская характеризуется собственным набором видоспецифичных гаплотипов межгенного спейсера *trnT-trnF*. Эти нуклеотидные последовательности были опубликованы лишь недавно (Volkova *et al.*, 2014) и в настоящее время доступны из баз данных GenBank (GenBank Acc. KF896139, KF896142). Гаплотипы спейсера *trnT-trnF* ели европейской и ели сибирской различаются четырьмя полиморфными сайтами, причем для хлоропластного генома *P. abies* характерны гаплотипы *_CCC, _CAC, _TCC, GCAC* и *GCCC*, а типичными для *P. obovata* являются гаплотипы *GCCA* и *_CCA* (Tollesfrud *et al.*, 2008b, цит. по: (Volkova *et al.*, 2014)). К сходным выводам ранее пришли Ran с соавт. (2006), которые сравнивали последовательность межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК у видов *P. abies* и *P. obovata* (DQ358149 и DQ0106), описав два видоспецифичных полиморфных сайта.

Для того чтобы установить, насколько эти описанные видоспецифичные гаплотипы межгенного спейсера *trnT-trnF* распространены среди елей, произрастающих на территории Восточно-Европейской равнины РФ, в нашем исследовании были секвенированы последовательности межгенного спейсера *trnT-trnF* у 52 елей разных климатипов, представленных в географических культурах, а также у 3 елей из Красноярского края, представляющих в анализе «чистый» вид *P. obovata*. Среди 55 проанализированных елей у 37 были обнаружены гаплотипы хлДНК, характерные для *P. abies*, у 18 елей – гаплотипы хлДНК, типичные для *P. obovata*.

В процессе анализа были выявлены особи, сочетающие аллели *P. abies* как в митохондриальном, так и хлоропластном геноме, которые теоретически можно отнести к «чистому» виду *P. abies*. Обнаружены также ели, которые несут аллели мтДНК, характерные для *P. abies*, и аллели хлДНК, характерные для *P. obovata*, что может указывать на их гибридное происхождение. Так, по результатам комбинированного анализа мтДНК и хлДНК ели из Республики Коми,

Калужской, Кировской, Архангельской, Могилевской областей были выращены из семян, завязавшихся в результате переопыления ели европейской пыльцой ели сибирской (табл. 1). Не выявлено какой-либо географической закономерности в преобладании «чистой» *P. abies* или гибридов *P. abies* × *P. obovata* в проанализированных климатипах географических культур. К «чистому» виду *P. obovata* по результатам маркирования органельной ДНК можно отнести только образцы елей из Красноярского края (заповедник «Столбы»), так как для мтДНК и хлДНК этих образцов характерны гаплотипы, типичные для *P. obovata*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

История расселения *P. abies* в Западной Европе в голоцене в настоящее время представляет достаточно ясную картину, благодаря работам по популяционной генетике и молекулярной филогеографии ели, основанной на анализе полиморфизма генов органельной ДНК (Gugerli *et al.*, 2001; Sperisen *et al.*, 2001; Tollesfrud *et al.*, 2008a). Выявленные ранее закономерности формирования ареала ели европейской в Центральной и Западной Европе сохраняются и на Восточно-Европейской равнине: практически во всех регионах европейской части РФ доминируют генотипы «северной семьи», описанной Tollesfrud с соавт. (2008a). Представители «южной семьи» – потомки елей, переживших последнее оледенение в рефугиумах Балканского полуострова (Huntley, Birks, 1983), обнаружены только в популяциях из Закарпатья. Остается неизвестным, насколько далеко распространилась эта филогенетическая ветвь в северном и северо-восточном направлениях от Карпатских гор и где сейчас проходит граница распространения «южной» и «северной» семей ели европейской на территории РФ. На сегодняшний день отсутствуют также и работы, посвященные вопросам филогеографии вида *P. obovata*, с использованием методов маркирования органельной ДНК. Возможно, этот вид имеет свою собственную историю послеледниковых миграций, которую можно было бы реконструировать при изучении полиморфизма митохондриального и хлоропластного геномов. Полученные данные могут представлять интерес для разработки стратегии

консервации лесных генетических ресурсов Сибирского региона.

Процессы интрогрессивной гибридизации елей европейской и сибирской, протекающие на территории Восточно-Европейской равнины, представляют интерес с эволюционной точки зрения (см. Попов, 2010), а также имеют важное значение для развития генетико-селекционных программ и организации мероприятий по охране и рациональному использованию биологических ресурсов (Политов, 2007). Специфика однородительского наследования митохондриального и хлоропластного геномов хвойных может быть использована для разработки ДНК-маркеров, позволяющих идентифицировать гибридные особи, возникшие в результате переопыления *P. abies* пыльцой *P. obovata*, которые, несомненно, нашли бы свое применение в селекционной практике и лесосеменном районировании. Наследование митохондриального генома у *P. abies* строго по материнской линии было подтверждено специальными исследованиями в контролируемых скрещиваниях (Bobola *et al.*, 1996; Grivet *et al.*, 1999) так же, как и отцовское наследование маркеров хлДНК у елей, которое было показано в экспериментах по получению межвидовых гибридов елей *P. mariana* и *P. rubens* (Bobola *et al.*, 1996), *P. pungens* и *P. glauca* (Stine *et al.*, 1989), *P. engelmannii* и *P. sitchensis* (Sutton *et al.*, 1991). Использование комбинации этих маркеров могло бы позволить определять гибридную природу растений, развившихся в результате переопыления между особями разных видов елей.

Несколько неясным остается вопрос о «видоспецифичности» гаплотипов межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК, указанных как «типичные» для елей *P. obovata* сибирского происхождения (Толлефсруд, Спиренсен, 2011) и позднее описанных П. Волковой (Volkova *et al.*, 2014) на материале из Карелии. Имеющиеся в доступе опубликованные данные, к сожалению, не позволяют однозначно ответить на вопрос, насколько достоверно описанные гаплотипы, GССА и _ССА, межгенного спейсера *trnT-trnF* ассоциированы именно с видом *P. obovata*. Доступная информация сводится к короткому сообщению (Толлефсруд, Спиренсен, 2011) и ссылкам на неопубликованную диссертационную работу (Tollefsrud, 2008b, цит. по: (Volkova

et al., 2014)). Тем не менее использование в нашем исследовании маркеров органельной ДНК, предложенных этими авторами, подтверждает опубликованные ранее сообщения об интенсивных процессах интрогрессивной гибридизации ели сибирской и ели европейской на территории Восточно-Европейской равнины (Щербакова, 1973; Попов, 2010; Ильинов и др., 2011). Согласно результатам анализа полиморфизма органельной ДНК на выборке деревьев, представленных в географических культурах, популяции ели на территории европейской части РФ сформированы генотипами *P. abies* и гибридными формами *P. abies* × *P. obovata*. И те и другие могут быть идентифицированы по специфичным различиям в последовательности митохондриальной и хлоропластной ДНК. Результаты нашего исследования подтверждают опубликованные ранее сообщения о том, что «нативный» вид *P. obovata* на территории европейской части России, вероятно, не представлен и встречается к востоку от Уральских гор (Толлефсруд, Спиренсен, 2011). Полученные выводы основаны на результатах анализа популяционных выборок, представленных в географических культурах ели. Для получения более точной картины распространения гибридных форм ели в европейской части РФ и сведений о частотном географическом градиенте встречаемости межвидовых гибридов необходим более детальный анализ природных популяций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01418а и научного проекта №37.1521.2014/К Минобрнауки РФ в рамках реализации проектной части государственного задания.

ЛИТЕРАТУРА

- Егоров А.А., Бурцев Д.С., Орлова Л.В. и др. Продуктивность видов и внутривидовых таксонов *Picea abies*, *P. fennica*, *P. obovata* в географических культурах на Северо-Западе России // Уч. записки Петрозаводского гос. ун-та. 2011. Т. 121. № 8. С. 59–64.
- Ильинов А.А., Раевский Б.В., Рудковская О.А. и др. Сравнительная оценка фенотипического и генетического разнообразия северотаежных малонарушенных популяций ели финской (*Picea* × *fennica*) // Тр. Карельского науч. центра РАН. 2011. Т. 1. С. 37–47.

- Минченко А.Г., Дударева Н.А. Митохондриальный геном. Новосибирск: Наука, 1990. 194 с.
- Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. *Pinaceae*) Северной Евразии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2007. 47 с.
- Попов П.П. Формовая структура и географическая дифференциация популяций ели на северо-западе России // Экология. 2010. № 5. С. 336–343.
- Толлефсруд М.М., Спиренсен Х. Отцовская интрогрессия от ели сибирской (*Picea obovata*) к ели обыкновенной (*P. abies*): отслеживание потока пыльцы и семян с помощью хлоропластной и митохондриальной ДНК // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: Матер. 3-го междунар. совещ. Красноярск, 2011. С. 166–167.
- Щербакова М.А. Генэкология ели обыкновенной *Picea abies* (L.) Karst. в разных лесорастительных районах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Красноярск, 1973. 47 с.
- Bobola M., Guenette D., Eckert R. *et al.* Using nuclear and organelle DNA markers to discriminate among *Picea rubens*, *Picea mariana*, and their hybrids // Can. J. Forest Res. 1996. V. 26. No. 3. P. 433–443.
- Bousquet J., Simon L., Lalonde M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction // Can. J. Forest Res. 1990. V. 20. P. 254–257.
- Dering M., Lewandowski A. Finding the meeting zone: Where have the northern and southern ranges of Norway spruce overlapped? // Forest Ecol. Manag. 2009. V. 259. P. 229–235.
- Giesecke T., Bennett K.D. The Holocene spread of *Picea abies* (L.) Karst. in Fennoscandia and adjacent areas // J. Biogeogr. 2004. V. 31. P. 1523–1548.
- Grivet D., Jeandroz S., Favre J. *Nad1* b/c intron polymorphism reveals maternal inheritance of the mitochondrial genome in *Picea abies* // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 99. No. 1/2. P. 346–349.
- Gugerli F., Sperisen C., Büchler U. *et al.* Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 1255–1263.
- Huntley B., Birks H. An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0–13,000 BP. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1983.
- Lockwood J.D., Aleksić J.M., Zou J. *et al.* A new phylogeny for the genus *Picea* from plastid, mitochondrial, and nuclear sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. No. 3. P. 717–727.
- Neale D., Sederoff R. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 77. No. 2. P. 212–216.
- Neale D., Marshall K., Harry D. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*) // Can. J. Forest Res. 1991. V. 21. No. 5. P. 717–720.
- Newton A.C., Allnutt T.R., Gillies A.C.M. *et al.* Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species // Trends Ecol. Evol. 1999. V. 14. P. 140–145.
- Ran J., Wei X., Wang X. Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (*Pinaceae*): Implications for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 41. P. 405–419.
- Schmidt-Vogt H. Die Fichte, Band I // Taxonomie. Verbreitung. Morphologie. Ökologie. Waldgesellschaft. Hamburg und Berlin. Verlag Paul Parey, 1977. T. 647.
- Sears B. Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom // Plasmid. 1980. V. 4. No. 3. P. 233–255.
- Sperisen C., Buchler U., Gugerli F. *et al.* Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 257–263.
- Stine M., Sears B., Keathley D. Inheritance of plastids in interspecific hybrids of blue spruce and white spruce // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 78. No. 6. P. 768–774.
- Sutton B., Flanagan D., Gawley J. *et al.* Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 82. No. 2. P. 242–248.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Mol. Biol. 1991. 17. P. 1105–1109.
- Tollefsrud M.M., Brochmann C., Sperisen C. Paternal introgression from Siberian spruce (*Picea obovata*) to Norway spruce (*P. abies*): tracing pollen and seed flow with chloroplast and mitochondrial DNA // Phylogeography, diversity and hybridization in Norway spruce / M.M. Tollefsrud. PhD thesis. University of Oslo, Norway. 2008b.
- Tollefsrud M., Kissling R., Gugerli F. *et al.* Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen // Mol. Ecol. 2008a. V. 17. No. 18. P. 4134–4150.
- Volkova P., Shipunov A., Borisova P. *et al.* In search of hybridity: the case of Karelian spruces // Silva Fennica. 2014. V. 48. No. 2. Art. id 1072. 14 p. <http://dx.doi.org/10.14214/sf.1072>

**ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF ORGANELLE DNA
TO ELUCIDATE THE PHYLOGEOGRAPHY
OF NORWAY SPRUCE IN THE EAST EUROPEAN PLAIN**

**Е.К. Potokina^{1,2}, А.А. Kiseleva⁴, М.А. Nikolaeva²,
S.A. Ivanov², P.S. Ulianich², A.F. Potokin^{2,3}**

¹ Vavilov Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia, e-mail: e.potokina@vir.nw.ru;

² Saint Petersburg State Forest Technical University, St. Petersburg, Russia;

³ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;

⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

The history of Norway spruce distribution in the East European plain is discussed with regard to the results of allele diversity survey of the mitochondrial *Nad1* gene, which is maternally inherited, and the chloroplast *trnT-trnF* region, which is paternally inherited in spruce. The polymorphism of organelle DNAs was examined in 221 genotypes from 28 regions of the former USSR in geographical provenances. Alleles common for the northern *Picea abies* lineage were detected in accessions originated from the most regions investigated. The *Nad1* allele typical for the southern lineage of *P. abies* was discovered just in spruces originated from Carpathians. The *Nad1* allele typical for *P. obovata* was found in spruces from the Sverdlovsk (Urals) and Krasnoyarsk (Siberia) oblasts. Among the trees analyzed, some had chloroplast DNA sequences (*trnT-trnF*) assigned to *P. abies*, others carried cpDNA haplotypes fixed for *P. obovata*. Analysis of organelle DNA allows revealing the hybrid nature of spruces resulting from cross-pollination of different species.

Key words: phylogeography, organelle DNA, molecular markers, *Nad1*, *trnT-trnF*, *Picea*, geographical provenances.