УДК 599.322.2+575.174

DOI 10.21685/2500-0578-2020-4-3

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ БОЛЬШОГО СУСЛИКА (*Spermophilus major* Pall.) В СВЯЗИ С ДИНАМИКОЙ НАСЕЛЕНИЯ ВО ВРЕМЕНИ

С. В. Титов¹, М. Д. Симаков², О. В. Чернышова³, Н. А. Картавов⁴, А. А. Кузьмин⁵

Пензенский государственный университет, Россия, 440026, г. Пенза, ул. Красная, 40

¹ E-mail: svtitov@yandex.ru, ² e-mail: maksimakov@bk.ru, ³ e-mail: oliarabbit@yandex.ru, ⁴ e-mail: nikitakartavov@yandex.ru

⁵ Пензенский государственный технологический университет, Россия, 440039, г. Пенза, проезд Байдукова/ул. Гагарина, 1а/11
E-mail: kuzmin-puh@yandex.com

Аннотация. Актуальность и цели. Пространственная подразделенность и временная изоляция популяций, как правило, приводит к ограничению потока генов, снижению уровня гетерозиготности, повышению уровня инбридинга, к потере генетического разнообразия. В некоторых случаях возможны как полное их вымирание, так и коренная перестройка их структуры в связи с прохождением популяциями состояния «бутылочного горлышка» или процесса формирования от ограниченного числа первопоселенцев. В условиях столь противоречивой и ненаправленной динамики населения в ареале постоянно происходят структурные популяционные перестройки. В условиях симпатрического обитания близкородственных видов в тех или иных точках контактов возникают ситуации, при которых наблюдается преодоление симпатрическими видами изоляционных барьеров и появление межвидовых гибридов в случайных контактах неконспецификов [11, 12]. Целью работы было изучение в модельных поселениях большого суслика (*Spermophilus major* Pall.) особенностей динамики генетической структуры популяций в связи с глубокой изоляцией и волнообразными изменениями численности на фоне существующей симпатрии с крапчатым (*S. suslicus* Güld.) сусликом. **Материалы и методы.** Аналитические выборки для генетического анализа составили: популяция *S. major* близь с. Чириково 2005–2010 гг. – 43 экз. и 2018–2019 гг. – 34 экз.; популяция *S. major* на о. Пальчинский (2011 г.) – 10 экз. Анализ внутривидового полиморфизма и генетических различий двух модельных популяций большого суслика проводили, используя результаты анализа изменчивости двух маркеров мтДНК – контрольный регион (С-регион, *D-loop*) и гена *Cyt b*, по двум направлениям: по характеру распределения в них митотипов ДНК и по выявлению гаплотипической изменчивости анализируемых выборок по используемым маркерам. Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 32$) и гена *Cyt b* ($n = 44$) проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) с использованием набора реактивов BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kits при первоначальной подготовке проб в амплификаторе SimpliAmp™ Thermal Cycler. Нуклеотидные последовательности были изучены с помощью программ BioEdit 7.0.9, Mega7.0.21, PopArt и DnaSP 5.10.01. Полученные последовательности выделенных гаплотипов мтДНК (*D-loop* и *Cyt b*) были размещены в GeneBank NCBI (MW398128-MW398138; MW398139-MW398148). Все результаты были проверены статистическими тестами (Microsoft Office Excel 2010, STATISTICA 10.0). **Результаты.** Анализ изменчивости фрагментов контрольного региона *D-loop* и гена *Cyt b* мтДНК показал, что анализируемые популяции большого суслика хорошо дифференцированы и различаются друг с другом. Анализ двух временных состояний популяции у с. Чириково выявил достоверные отличия между ними – несмотря даже на то, что поиск этих различий осложняется хорошо выраженной митотипической структурой. Тестирование последовательностей двух временных выборок популяции большого суслика с. Чириково по степени их дифференциации показало, что индексы Таджиджи ($T_s D$) имеют положительные значения по обоим маркерам мтДНК. При этом индексы имеют значения, указывающие на действие стабилизирующего отбора после быстрого роста численности, произошедшего по данным наблюдений после сильной депрессии и прохождения популяцией состояния «бутылочного горлышка». **Выводы.** Проведенные генетические исследования динамически меняющихся и надежно изолированных популяций большого суслика показали, что использование маркеров мтДНК позволяет достаточно точно изучить их генетическую структуру и успешно воссоздать историю формирования поселений. Особенно такие исследования актуальны при изучении динамики контактных участков зон симпатрии гибридирующих близкородственных видов. Как показали наши исследования, именно в тех точках ареала, где наблюдается взрывная демографическая ситуация, связанная с прохождением популяциями состояния «бутылочного горлышка» и восстановлением численности, а также отмечается присутствие симпатрического вида, и фиксируются случаи межвидовой гибридизации большого суслика с другими представителями р. *Spermophilus*.

Ключевые слова: большой суслик, генетическая структура популяции, временная динамика, изменчивость, митохондриальные маркеры, Поволжье.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта №18-04-00687 а.

Для цитирования: Генетические особенности популяционной структуры большого суслика (*Spermophilus major* Pall.) в связи с динамикой населения во времени / С. В. Титов, М. Д. Симаков, О. В. Чернышова, Н. А. Картавов, А. А. Кузьмин // Russian Journal of Ecosystem Ecology. – 2020. – Vol. 5 (4). – <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2020-4-3>

GENETIC FEATURES OF THE POPULATION STRUCTURE OF THE RUSSET GROUND SQUIRREL (*SPERMOPHILUS MAJOR* PALL.) DUE TO POPULATION DYNAMICS OVER TIME

S. V. Titov¹, M. D. Simakov², O. V. Chernyshova³, N. A. Kartavov⁴, A. A. Kuzmin⁵

Penza State University, 40 Krasnaya street, Penza, 440026, Russia

¹ E-mail: svtitov@yandex.ru, ² e-mail: maksimakov@bk.ru, ³ e-mail: oliarabbit@yandex.ru, ⁴ e-mail: nikitakartavov@yandex.ru

⁵ Penza State Technological University, 1A / 11 Baidukova proezd / Gagarina street, Penza, 440039, Russia

E-mail: kuzmin-puh@yandex.com

Abstract. Relevance and goals. Spatial subdivision and temporary isolation of populations, as a rule, lead to limited gene flow, a decrease in the level of heterozygosity, an increase in the level of inbreeding, and a loss of genetic diversity. In some cases, both their complete extinction and radical restructuring of their structure are possible due to the passage of populations of the “bottleneck” state or of the formation process from a limited number of early settlers. In the conditions of such a contradictory and undirected population dynamics in the area, structural population changes are constantly taking place. Under the conditions of sympatric habitation of closely related species at certain points of contact, situations arise in which sympatric species overcome isolation barriers and interspecific hybrids appear in random contacts of non-specifics [11, 12]. The goal of this work was the study in model settlements of the russet ground squirrel (*Spermophilus major* Pall.) of the peculiarities of the dynamics of the genetic structure of populations in connection with deep isolation and wavelike changes in numbers against the background of the existing sympatry with the spotted souslik (*S. suslicus* Güld). **Materials and methods.** Analytical samples for genetic analysis were as follows: *S. major* population near the village of Chirikovo, 2005–2010, 43 individuals, and 2018–2019, 34 individuals; *S. major* population on the island of Paltsinsky (2011) – 10 individuals. The analysis of intrapopulation polymorphism and genetic differences of two model populations of the russet ground squirrel was carried out using the results of the analysis of two mtDNA markers variability – the control region (C-region, D-loop) and the Cyt *b* gene, in two directions: by the nature of DNA mitotypes distribution in them and by identifying haplotype variability of the analyzed samples for the used markers. Fragments of the mtDNA control region ($n = 32$) and the Cyt *b* gene ($n = 44$) were sequenced on an ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems) using reagent kits BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kits during the initial sample preparation in the SimpliAmp™ Thermal Cycler amplifier. Nucleotide sequences were studied using the BioEdit 7.0 Mega7.0.21 PopArt and DnaSP 5.10.01 programmes. The obtained sequences of the isolated mtDNA haplotypes (D-loop and Cyt *b*) were placed at GeneBank NCBI (MW398128-MW398138; MW398139-MW398148). All the results were verified by statistical tests (Microsoft Office Excel 2010, STATISTICA 10.0). **Results.** Analysis of the variability of the fragments of the control region D-loop and the Cyt *b* gene of mtDNA showed that the analyzed populations of the russet ground squirrel are well differentiated and differ from each other. The analysis of two temporal states of the population near the village of Chirikovo revealed significant differences between them, despite the fact that the search for these differences is complicated by a well-marked mitotypic structure. Testing sequences of two time samples of a russet ground squirrel population near the village of Chirikovo by the degree of their differentiation showed that the Tajima indices (T 's D) have positive values for both mtDNA markers. In this case, the indices have values indicating the effect of stabilizing selection after a rapid increase in numbers, which, according to observational data, took place after a strong depression and the passage of the population of the “bottleneck” state. **Conclusions.** The conducted genetic studies of dynamically changing and reliably isolated populations of the russet ground squirrel showed that the use of mtDNA markers allows studying their genetic structure quite accurately and recreating the history of settlement formation. Such studies are especially relevant when studying the dynamics of contact areas of sympatric zones of hybridizing closely related species. As our studies have shown, it is in those points of the range where an explosive demographic situation associated with the passage of the populations of the “bottleneck” state and the restoration of numbers is observed, as well as the presence of a sympatric species occurs, that cases of interspecific hybridization of the russet ground squirrel with other representatives of the r. *Spermophilus* are recorded.

Key words: russet ground squirrel, genetic structure of the population, temporal dynamics, variability, mitochondrial markers, Volga region.

Acknowledgments. The research was carried out with financial support from the Russian Foundation for Basic Research within the project no. 18-04-00687 a.

For citation: Genetic features of the population structure of the russet ground squirrel (*Spermophilus major* Pall.) due to population dynamics over time / S. V. Titov, M. D. Simakov, O. V. Chernyshova, N. A. Kartavov, A. A. Kuzmin // Russian Journal of Ecosystem Ecology. – 2020. – Vol. 5 (4). – <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2020-4-3>

В настоящее время проблема изучения популяционной структуры ареалов различных видов животных является актуальной и вызывает широкий интерес у зарубежных и отечественных исследователей. Это направление научных исследований, связанное с изучением генетической структуры популяционных систем в пространстве и времени, является информативным и продуктивным как для теоретической науки, так и для региональных прикладных изысканий. Изучение генетической структуры популяций стало современным направлением экологических исследований [1–5]. Оно направлено на решение ряда фундаментальных биологических проблем и важных прикладных задач, связанных с сохранением видов и биологического разнообразия. Среди фундаментальных проблем следует отметить проблему целостности биологического вида, проблему микроэволюционной изменчивости, проблему границ внутривидовой дифференциации и проблему динамики популяций. В качестве прикладных задач стоит упомянуть задачу по оценке продуктивности вида в ареале, задачу изучения риска вымирания и перспектив восстановления природных популяций [6–10]. Пространственная подразделенность и временная изоляция популяций, как правило, приводят к ограничению потока генов, снижению уровня гетерозиготности, повышению уровня инбридинга, а также к потере генетического разнообразия. В некоторых случаях возможны как полное их вымирание, так и коренная перестройка структуры в связи с прохождением популяциями состояния «бутылочного горлышка» или процесса формирования от ограниченного числа первопоселенцев. В условиях столь противоречивой и ненаправленной динамики населения в ареале постоянно происходят структурные популяционные перестройки. В условиях симпатрического обитания близкородственных видов в тех или иных точках контактов возникают ситуации, при которых наблюдается преодоление симпатрическими видами изоляционных барьеров и появление межвидовых гибридов в случайных контактах неконспецификов [11, 12].

Целью работы было изучение в модельных поселениях большого суслика (*Spermophilus major* Pall.) особенностей динамики генетической структуры популяций в связи с глубокой изоляцией и волнообразными изменениями численности на фоне существующей симпатрии с крапчатым (*S. suslicus* Güld.) сусликом.

Материал и методы

Материалом для работы послужил биоматериал, собранный в ходе полевых исследований 2018–2019 гг. в прошедшей цикл волнообразной динамики численности популяции большого суслика (*Spermophilus major* Pall.), расположенной близ с. Чириково Кузоватовского р-на Ульяновской обл. (53.7472° с.ш., 47.8277° в.д.), а также материал из коллекции ДНК кафедры «Зоология и экология» ПГУ, полученный из той же популяции в 2005–2010 гг. и из изолированной популяции *S. major* на о. Пальцинский (54.3905° с.ш., 48.4794° в.д.; Куйбышевское водохранилище в окрестностях г. Ульяновска) в 2011 г. (рис. 1).

Аналитические выборки для генетического анализа составили: 43 экз. – популяция *S. major* близ с. Чириково в период 2005–2010 гг. (Ch1); 34 экз. – популяция *S. major* близ с. Чириково в период 2018–2019 гг. (Ch2); 10 экз. – популяция *S. major* на о. Пальцинский в 2011 г. (Pal).

Молекулярно-генетические исследования проводили с целью выявления генетического полиморфизма и генетического разнообразия в трех сформированных выборках, используя результаты анализа изменчивости двух маркеров мтДНК – контрольный регион (С-регион, *D-loop*) и гена *Cyt b*.

ДНК выделяли из образцов тканей, взятых прижизненно в результате биопсии на ушной раковине и зафиксированных в 96 % этаноле, по стандартной методике фенолхлороформной экстракции после обработки материала протеиназой K и SDS [13, 14].

Полимеразную цепную реакцию (PCR) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl (pH 8.9), 20 мМ сульфат аммония, 20 мкМ ЭДТА, 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (200 мкМ каждого из четырех), 2 мМ хлористого магния, 15 пмоль каждого из праймеров, 2 ед. активности Taq-полимеразы и 0,1–0,2 мкг ДНК с использованием разработанных специфических праймеров [15] (табл. 1).

Видоспецифические митотипы мтДНК определяли по результатам рестрикции, полученным после ПЦР фрагментов С-региона (1051 пн), с использованием рестриктазы *Rsa I* (2–4 ч, 37° С). Для *S. major* было выявлено 4 основных митотипа (A, B1, B2, C1) [15] и один специфиче-

ский для его правобережных популяций – С1*, характеризующийся одной специфической в последовательности митотипа В2 заменой

и выявляемый при помощи рестриктазы *Hae III* (2–4 ч, 37° С) [16, 17].

Рис. 1. Популяции большого суслика, в которых был собран генетический материал для исследований:
а – с. Чириково, Кузоватовский р-н, Ульяновская обл. (53.7472° с.ш., 47.8277° в.д.);
б – о. Пальцинский (54.3905° с.ш., 48.4794° в.д.)

Fig. 1. Populations of the russet ground squirrel where the genetic material for research was collected:
а – the village of Chirikovo, Kuzovatovsky district, Ulyanovsk region (53.7472 ° N, 47.8277 ° E);
б – Paltinsky Island (54.3905 ° N, 48.4794 ° E)

Таблица 1

Table 1

Праймеры, использованные в анализе митохондриальной ДНК больших сусликов

Primers used in the analysis of mitochondrial DNA in russet ground squirrels

Маркер	Праймеры	T° _{отж}	Последовательность 5' – 3'	Фрагмент, п.н.
С-регион	MDL 1 H00651	60°	TCCACCTTCAACTCCCAAAGC TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAAACCT	1051
Cyt b	GlCbSt D GlCbend R	62°	AATGACATGAAAAATCATCGTTGT GTTCATTTTTGGTTTACAAGACCA	1140

Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 32$) и гена *Cyt b* ($n = 44$) проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) с использованием набора реактивов *BigDye® Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kits* при первоначальной подготовке проб в амплификаторе *SimpliAmp™ Thermal Cycler*. Нуклеотидные последовательности были прочитаны и

отредактированы с помощью программы BioEdit 7.0 (<https://bioedit.software.informer.com>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли по алгоритму MUSCLE [18] в программе Mega7.0.21 с обязательной доводкой вручную. Для реконструкции филогенетических отношений использовали метод максимального правдоподобия (ML) в программе MEGA 7.0.21

[19], а также метод построения медианной сети (Median Joining) в программе PopArt [20]. Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие было изучено с помощью программы DnaSP 5.10.01 [21]. Полученные последовательности выделенных гаплотипов мтДНК (*D-loop* и *Cyt b*) были размещены в GeneBank NCBI (MW398128-MW398138; MW398139-MW398148).

Для статистической обработки результатов для всех статистических тестов был установлен уровень значимости $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проведена в пакетах Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 10.0.

Результаты

Анализ внутривидового полиморфизма и генетических различий двух модельных популяций большого суслика проводили по двум направлениям. Первое было связано с выявлением генетической структуры популяций

по характеру распределения в них митотипов ДНК. Второе было направлено для выявления гаплотипической изменчивости анализируемых выборок.

Анализ митотипической изменчивости модельной популяции большого суслика (с. Чириково) в различные периоды ее существования показал, что генетическая структура по этому генетическому параметру значительно изменилась (рис. 2, а, б). Если в 2010 г. преобладающим митотипом в популяции был C1 (65,1 %), а митотип C1* был редким (2,3 %), то к 2020 г. доля особей, имеющих митотип C1, сократилась до 14,7 %, а доля редкого в прошлом митотипа C1* возросла до 17,65 %. При этом на новом этапе существования этой популяции преобладающим стал митотип B2 – 67,7 %, а различия генетической структуры популяции в эти разные периоды ее существования являются высоко достоверными по выровненным выборкам ($\chi^2 = 26,074$, $df = 1$, $p = 0,00000$).

Рис. 2. Результаты рестрикционного анализа мтДНК (*D-loop*) больших сусликов из:

а – популяции у с. Чириково в 2005–2010 гг. (Ch1);

б – популяции у с. Чириково в 2018–2019 гг. (Ch2). А, В2, С1, С1* – выявленные митотипы ДНК

Fig. 2. Results of mtDNA restriction analysis (*D-loop*) of russet ground squirrels from:

а – populations near the village of Chirikovo in 2005-2010 (Ch1);

б – populations near the village of Chirikovo in 2018–2019 (Ch2). A, B2, C1, C1* – identified DNA mitotypes

Анализ модельной популяции большого суслика с о. Пальцинского (Pal) выявил существование в ней только одного митотипа ДНК – А (100 %), что указывает на ее изолированность от основного ареала вида и высокую генетическую однородность в результате формирования от ограниченного числа особей-основателей.

Для изучения нуклеотидной и гаплотипической изменчивости в модельных популяциях *S. major* (Ch1, Ch2, Pal) был проведен ML-анализ (метод максимального правдоподобия) последовательностей фрагментов *D-loop* мтДНК большого суслика ($n = 32$). Для этого была использована эволюционная модель НКУ (модель Хасегава-Кишино-Яно; максимальный логарифм правдоподобия –2314,06), выбор ко-

торой определялся результатами модель-теста – значения Байесового информационного критерия (BIC) для нее были минимальны и составили 5397,48.

Уровень изменчивости митохондриальных фрагментов *D-loop* большого суслика (число нуклеотидных замен) оказался высоким (для внутривидового уровня) и изменяется в пределах от 22,1 до 0,0 % (в среднем около $8,6 \pm 1,3$ %). При этом соотношение транзиций и трансверсий (Ts/Tv) равно 1,71 (R), а нуклеотидные частоты составили: для А – 31,07 %, Т – 34,11 %, С – 22,79 %, G – 12,02 %.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов *D-loop* (ML) с учетом неравномерности скорости эволюционных процессов поз-

волил построить кладограмму и объединить их в группы, соответствующие митотипам ДНК, выявленным в модельных популяциях. Верхняя группировка (GR 1) сформирована последовательностями митотипов B2 и C1*, которые характеризуют модельную популяцию у с. Чириково в двух временных точках своего

существования (Ch1 и Ch2); средняя группировка (GR 2) – последовательностями митотипа A, выявленными только в популяции о. Пальцинский (Pal); нижняя группировка (GR 3) – последовательностями митотипа C1, характеризуют модельную популяцию у с. Чириково только в первый период наблюдений (Ch1) (рис. 3).

Рис. 3. Результаты генетического ML-анализа (модель НКУ) нуклеотидных последовательностей ($n = 32$) участка D-петли мтДНК (1051 пн), показывающие филогенетические отношения между митотипами, характеризующими модельные популяции большого суслика. В узлах – результаты бутстреп-анализа (1000 реплик), шкала – генетические дистанции между митотипами, К – контрольные последовательности. Популяции: 1 – с. Чириково в 2005–2010 гг. (Ch1); 2 – с. Чириково в 2018–2019 гг. (Ch2); 3 – о. Пальцинский, 2011 г. (Pal). Выявленные митотипы ДНК: GR 1 – B2, C1*; GR 2 – A; GR 3 – C1

Fig. 3. Results of genetic ML-analysis (HKY model) of nucleotide sequences ($n = 32$) of the mtDNA D-loop region (1051 bp), showing the phylogenetic relationships between mitotypes characterizing the model populations of the russet ground squirrel. In nodes – results of bootstrap analysis (1000 replicas), scale – genetic distances between mitotypes, K – control sequences. Populations: 1 – the village of Chirikovo in 2005–2010 (Ch1); 2 – the village of Chirikovo in 2018–2019 (Ch2); 3 – Paltsinsky Island, 2011 (Pal). Identified DNA mitotypes: GR 1 – B2, C1*; GR 2 – A; GR 3 – C1

Анализ генетической изменчивости фрагмента *D-loop* мтДНК по группам сравнения последовательностей – двум временным состояниям популяции у с. Чириково и изолированной популяции о. Пальцинский (Ch1, Ch2, Pal) – выявил следующие результаты. Средняя эволюционная дивергенция по всем парам последовательностей по нуклеотидным заменам составила $5,1 \pm 0,4$ %, а среднее эволюционное разнообразие для всей совокупности последовательностей – $4,9 \pm 0,4$ %. При этом среднее эволюционное разнообразие внутри анализируемых группировок было значительно ниже общих показателей – $2,7 \pm 0,24$ %, а коэффициент межгрупповой эволюционной дифференциации составил $0,444 \pm 0,016$.

Анализ гаплотипического и нуклеотидного разнообразия популяций большого суслика (DnaSP 5.10.01) по 32 секвенсам фрагмента *D-loop* выявил, что число сегрегирующих сайтов (S) составило 152, число мутаций – 159. Было выделено 11 гаплотипов (h), гаплотипическое разнообразие (Hd) составило 0,726, нуклеотидное разнообразие (π) – 0,049, среднее число нуклеотидных различий (k) – 49,14 (табл. 2). Генетическая дифференциация популяций большого суслика по оценке показателя G_{ST} составила 0,163 при показателе миграции (число особей в каждой популяции $\times$ долю мигрантов в каждой популяции) N_m – 1,28, а по оценке показателя F_{ST} – 0,559 и 0,20 соответственно.

Таблица 2

Table 2

Гаплотипы мтДНК (*D-loop*, 1051 пн) большого суслика из модельных популяций большого суслика: 1 – с. Чириково в 2005–2010 гг. (Ch1), 2 – с. Чириково в 2018–2019 гг. (Ch2), 3 – о. Пальцинский, 2011 г. (Pal). Во второй колонке указаны характерные нуклеотидные замены и их позиции в последовательности, в третьей – популяции локализации с указанием номера особи и митотипа (A, B2, C1, C1*)

MtDNA haplotypes (*D-loop*, 1051 bp) of a russet ground squirrel from model populations of the russet ground squirrel: 1 – the village of Chirikovo in 2005-2010 (Ch1), 2 – the village of Chirikovo in 2018–2019 (Ch2), 3 – Paltinsky Island, 2011 (Pal). The second column lists the characteristic nucleotide substitutions and their positions in the sequence, the third lists the population localization with indication of the number of the individual and the mitotype (A, B2, C1, C1 *)

		1	1	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	5	6	6	6	6	6	7	7	7	8	8	8	9	9	9	9	9	0	0	2	2
	1	1	7	0	1	2	8	1	2	6	0	2	3	4	0	1	2	3	5	4	6	9	0	5	6	0	3	4	7	3	5	4	5	
Hap1	T	G	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	C	T	T	T	A	A	T	T	T	T	G	A	T	T	C	C	A	A	T	A	T	
Hap2	.	A	C	A	.	.	.	A	.	.	.	G	T	.	.	C	C	.	C	A	.	.	T	A	C	T	A	C	.	A	.	.		
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap4	.	A	C	A	.	.	.	A	.	.	.	G	T	.	.	C	C	.	C	A	.	.	T	A	C	T	A	C	.	A	.	.		
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	C	A	.	G		
Hap7	.	A	C	.	.	.	.	A	.	.	.	G	T	.	.	C	C	.	C	A	.	.	T	A	C	T	A	C	.	A	.	.		
Hap8	.	A	C	A	.	.	.	A	.	G	.	G	T	.	.	C	C	.	C	A	G	.	T	A	C	G	A	C	.	A	G	.		
Hap9	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	.	.	.	.	A	.	.	C	T	.	.	.	A	.	.		
Hap10	C	.	.	A	C	C	T	.	A	.	.	.	.	C	C	.	C	.	.	.	.	A	.	.	C	T	.	.	.	A	.	.		
Hap11	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	.	.	.	.	A	.	.	C	T	.	.	.	A	.	.		

		1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
		4	5	5	6	6	6	6	8	8	1	1	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	6	6	7	7	7	7		
		2	7	9	0	2	3	4	7	0	5	3	6	0	1	3	6	4	5	1	2	3	5	1	3	7	8	0	8	0	3	5	7	8
Hap1	A	T	T	A	T	C	C	A	T	T	G	C	A	T	C	T	T	C	C	T	C	A	A	A	A	T	T	A	A	C	C	A		
Hap2	.	.	.	.	C	T	A	.	A	C	.	T	.	C	A	A	G	A	T	C	T	.	G	C	C	C	A	G	C	T	T	T		
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap4	.	.	.	.	C	T	A	.	A	C	.	T	.	C	A	A	G	A	T	C	T	.	G	C	C	C	A	G	C	T	T	T		
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap6	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
Hap7	.	.	.	.	C	T	A	.	A	C	.	.	.	C	A	A	G	A	T	C	T	.	G	C	C	C	A	G	C	T	T	T		
Hap8	G	.	.	.	C	T	A	.	A	C	.	.	.	C	A	A	G	A	T	C	T	.	G	C	C	C	A	.	C	T	T	T		
Hap9	.	.	C	T	C	.	.	.	A	C	A	.	G	.	.	A	.	.	.	G	.	G	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.		
Hap10	.	.	C	T	C	.	.	.	A	C	A	.	G	.	.	A	.	.	.	G	.	G	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.		
Hap11	.	.	C	T	C	.	.	.	A	C	A	.	G	.	.	A	.	.	.	G	.	G	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.		

Окончание табл. 2

End of Table 2

	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	6	6
	8	9	9	9	9	9	0	0	1	2	3	3	4	4	4	6	8	9	1	1	3	6	6	8	0	0	1	2	5	6	7	3	3		
	3	0	2	6	7	9	6	7	6	4	4	6	1	2	3	7	8	2	6	7	2	5	6	9	7	9	0	6	3	9	2	3	4		
Hap1	G	G	A	T	C	T	A	G	G	T	T	C	C	G	A	T	T	C	T	A	C	T	G	T	G	A	C	A	T	T	A	A	G		
Hap2	.	.	.	.	A	.	G	.	A	C	C	T	.	.	.	A	C	T	C	T	T	C	A	.	A	T	T	T	.	.	.	.	.		
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap4	.	.	.	.	A	.	G	.	A	C	C	T	.	.	.	A	C	T	C	T	T	C	A	.	A	C	T	T	.	.	.	.	.		
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Hap6	C	A	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	
Hap7	.	.	.	.	A	.	G	.	A	C	C	T	.	.	.	A	C	T	C	T	T	C	A	.	A	T	T	T	.	.	.	.	.		
Hap8	.	.	.	.	A	.	G	.	A	C	C	T	.	.	.	A	C	T	C	T	T	C	A	.	A	T	T	T	.	.	.	.	.	A	
Hap9	.	.	.	A	.	C	.	.	A	.	.	T	T	.	T	.	C	.	.	C	T	.	A	.	A	.	.	.	.	C	G	C	.		
Hap10	.	.	.	A	.	C	.	.	A	.	.	T	T	.	T	.	C	.	.	C	T	.	A	.	A	.	.	.	.	C	G	C	.		
Hap11	.	.	.	A	.	C	.	.	A	.	.	T	T	.	T	.	C	.	.	C	T	.	A	.	A	.	.	.	.	C	G	C	.		

	6	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	5	6	7	7	1	2	2	2	2	3	6	6	8	9	9	9	2	3	3	3	4	4	6	6	0	1	2	2	2	3	3	3	3	
	2	1	4	8	9	0	4	6	8	7	3	7	8	3	6	9	1	4	5	8	1	3	7	9	9	2	4	8	9	0	1	7	8	
Hap1	T	T	T	G	A	C	T	T	T	T	A	G	A	C	T	C	T	T	G	C	A	T	A	A	C	C	A	T	T	A	C	A	C	
Hap2	.	.	C	A	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	A	T	A	C	.	T	.	.	.	T	T	T	C	.	.	G	T	T	.	
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap4	.	.	C	A	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	A	T	A	C	A	T	.	.	.	.	T	T	C	.	.	G	T	T	.	
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hap7	.	.	C	A	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	A	T	A	C	.	T	.	.	.	T	T	T	C	.	.	G	T	T	.	
Hap8	G	A	C	A	.	.	.	.	.	C	.	.	T	.	A	T	A	C	.	T	C	C	.	T	T	T	C	.	.	G	T	T	.	
Hap9	.	.	.	A	T	T	C	A	.	C	G	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	C	C	.	.	.	.	T	
Hap10	.	.	.	A	T	T	C	A	.	C	G	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	C	C	.	.	.	.	T	
Hap11	.	.	.	A	T	T	C	A	.	C	G	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	C	C	.	.	.	.	T	

	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0		N	
	4	4	4	4	5	5	6	6	8	8	9	9	9	6	9	9	1	1	1	2	2		SEQ	Локалитет
	1	5	6	8	0	8	1	4	8	9	0	4	7	8	9	0	4	9	4	8				
Hap1	T	T	A	C	T	C	C	C	C	C	A	T	T	C	C	T	T	C	C			1	Ch1 – 625m-B2	
Hap2	.	C	.	T	C	T	T	T	T	T	T	G	C	C	T	T	C	C	T	.		6	Ch1 – 623m-C1, 518m-C1, 440m-C1, 446m-C1, 444m-C1, 442m-C1	
Hap3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		16	Ch1 – 622m-B2, 506m-B2, 443m-B2, 441m-B2, 439m-B2, 437m-B2; Ch2 – 1444m-C1*, 1442m-C1*, 1381m-C1*, 1380m-C1*, 1379m-C1*, 1366m-B2, 1365m-B2, 1358m-B2, 1357m-B2, 1356m-B2	
Hap4	.	C	.	T	C	T	T	T	T	T	T	G	C	C	T	T	C	C	T	.		1	Ch1 – 621m-C1	
Hap5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.										

Для проведения более точной кластеризации анализируемых гаплотипов больших сусликов и выяснения микроэволюционных событий между ними была построена медианная сеть гаплотипов мтДНК (рис. 4). Сеть построена на основании 152 сегрегирующих и 121 информативного сайта. Нуклеотидное разнообразие (π) вошедших в сеть последовательностей составила 0,323, коэффициент дифференциации (F_{ST}) – 0,218 ($p = 0,011$), а тест Таджимы выявил близкую к достоверной стабилизацию генетической структуры изучаемых генетических групп больших сусликов – $T's D = 1,153$, при $p = 0,135$. В целом она подтверждает данные, полученные как при ML-анализе выше. Результаты медиан-

ного теста указывает на существование трех генетически близких групп последовательностей фрагмента *D-loop*: группы митотипов C1, группы митотипов B2 и группы митотипов A. Принимая во внимание показанное ранее преобладание в генетической структуре анализируемых популяций больших сусликов того или иного митотипа ДНК, выделенные медианным тестом группы последовательностей можно представить как группы, характеризующие, соответственно, два временных состояния популяции с. Чириково (Ch1 и Ch2) и популяцию о. Пальдинский (Pal). При этом генетическая дистанция между Ch1 и Ch2 составила 88 замен, а между Ch2 и Pal – 53 замены.

Рис. 4. Результаты генетического анализа нуклеотидных последовательностей ($n = 32$) участка мтДНК (*D-loop*, 1051 пн) больших сусликов – медианная сеть гаплотипов (Hap). Длина ветвей, соединяющих отдельные гаплотипы, пропорциональна количеству мутационных шагов (указаны цифрами). Ch1 – популяция с. Чириково в период 2005–2010 гг., Ch2 – популяция с. Чириково в период 2018–2019 гг., Pal – популяция о. Пальцинский 2011 г.

Fig. 4. Results of genetic analysis of nucleotide sequences ($n = 32$) of the mtDNA region (*D-loop*, 1051 bp) of russet ground squirrels – the median network of haplotypes (Hap). The length of the branches connecting individual haplotypes is proportional to the number of mutational steps (indicated by numbers). Ch1 – population of the village of Chirikovo in the period of 2005–2010, Ch2 – population of the village of Chirikovo in the period of 2018–2019, Pal – population of Paltsinsky Island, 2011

Таким образом, анализ изменчивости фрагмента контрольного региона мтДНК показал, что анализируемые популяции большого суслика хорошо дифференцированы и различаются друг с другом. Анализ двух временных состояний популяции у с. Чириково выявил между ними достоверные отличия – несмотря даже на то, что поиск этих различий осложняется хорошо выраженной митотипической структурой.

Для изучения нуклеотидной и гаплотипической изменчивости в модельных популяциях *S. major* (Ch1, Ch2, Pal) был проведен ML-анализ последовательностей фрагментов гена *Cyt b* мтДНК большого суслика ($n = 44$). Для этого была использована эволюционная модель TN93+G (модель Тамуры-Нея с моделированием неравномерности эволюционных скоростей с помощью гамма-распределения (+G = 0,20); максимальный логарифм правдоподобия –2476,08), выбор которой определялся результатами модель-теста (BIC – 5960,79).

Уровень изменчивости митохондриальных фрагментов гена *Cyt b* большого суслика (число

нуклеотидных замен) оказался высоким (для внутривидового уровня) и изменяется в пределах от 27,0 до 0,0 % (в среднем около $12,5 \pm 2,4$ %). При этом соотношение транзиций и трансверсий (Ts/Tv) равно 14,29 (R), а нуклеотидные частоты составили: для А – 28,62 %, Т – 33,54 %, С – 25,30 %, G – 12,54 %. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов D-петли (ML) с учетом неравномерности скорости эволюционных процессов позволил построить кладограмму и объединить их в группы, соответствующие группировкам в модельных популяциях. Нижняя группировка (GR 1) сформирована последовательностями гена *Cyt b*, которые характеризуют модельную популяцию с. Чириково преимущественно в период 2005–2010 гг. (Ch1); средняя группировка (GR 2) – последовательностями, обнаруженными только в популяции о. Пальцинский (Pal); верхняя группировка (GR 3) – последовательностями, характеризующими популяцию с. Чириково (Ch2) во второй период наблюдений (2018–2019 гг.) (рис. 5).

Рис. 5. Результаты генетического ML-анализа (модель TN93+G) нуклеотидных последовательностей ($n = 44$) гена *Cyt b* мтДНК (1140 пн), показывающие филогенетические отношения между гаплотипами, характеризующими модельные популяции большого суслика. В узлах – результаты бутстреп-анализа (1000 реплик), шкала – генетические дистанции между митотипами, внешняя группа – *Cyt b* европейского суслика (AF100720.1). Популяции: 1 – с. Чириково в 2005–2010 гг. (Ch1), 2 – с. Чириково в 2018–2019 гг. (Ch2), 3 – о. Пальчинский, 2011 г. (Pal). Выявленные гаплогруппы мтДНК: GR 1, GR 2, GR 3

Fig. 5. Results of genetic ML-analysis (model TN93 + G) of nucleotide sequences ($n = 44$) of the *Cyt b* gene of mtDNA (1140 bp), showing phylogenetic relationships between haplotypes characterizing model populations of the russet ground squirrel. In nodes – the results of the bootstrap analysis (1000 replicas), scale – genetic distances between mitotypes, outer group – *Cyt b* of the russet ground squirrel (AF100720.1). Populations: 1 – the village of Chirikovo in 2005-2010 (Ch1), 2 – the village of Chirikovo in 2018–2019 (Ch2), 3 – Paltinsky Island, 2011 (Pal). Identified mtDNA haplogroups: GR 1, GR 2, GR 3

Анализ генетической изменчивости фрагмента гена *Cyt b* мтДНК по группам сравнения последовательностей (Ch1, Ch2, Pal) выявил следующие результаты. Среднее эволюционное разнообразие для всей совокупности последовательностей составило $12,5 \pm 2,4$ %, а средняя эволюционная дивергенция внутри групп – $6,10 \pm 0,13$ %. При этом среднее эволюционное разнообразие между анализируемыми группами было выше группового – $6,4 \pm 1,2$ %, а коэффициент межгрупповой эволюционной дифференциации составил $0,510 \pm 0,021$.

Анализ гаплотипического и нуклеотидного разнообразия популяций большого суслика

(DnaSP 5.10.01) по 44 секвенсам фрагмента гена *Cyt b* выявил, что число сегрегирующих сайтов (S) составило 134, число мутаций – 135. Было выделено 10 гаплотипов (h), гаплотипическое разнообразие (Hd) составило 0,785, нуклеотидное разнообразие (π) – 0,053, среднее число нуклеотидных различий (k) – 60,64 (табл. 3). Генетическая дифференциация популяций большого суслика по оценке показателя G_{ST} составила 0,432 при показателе миграции (число особей в каждой популяции $\times$ долю мигрантов в каждой популяции) N_m – 0,33, а по оценке показателя F_{ST} – 0,606 и 0,16 соответственно.

Таблица 3

Table 3

Гаплотипы мтДНК (*Cyt b*, 1140 пн) большого суслика из модельных популяций большого суслика: 1 – с. Чириково в 2005–2010 гг. (Ch1), 2 – с. Чириково в 2018–2019 гг. (Ch2), 3 – о. Пальцинский, 2011 г. (Pal). Во второй колонке указаны характерные нуклеотидные замены и их позиции в последовательности, в третьей – популяции локализации с указанием номера особи

MtDNA haplotypes (*Cyt b*, 1140 bp) of a russet ground squirrel from model populations of the russet ground squirrel: 1 – the village of Chirikovo in 2005–2010 (Ch1), 2 – the village of Chirikovo in 2018–2019 (Ch2), 3 – Paltsinsky Island, 2011 (Pal). The second column shows the characteristic nucleotide substitutions and their positions in the sequence, the third – the population of localization with the indication of the number of the individual

		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
--	--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Окончание табл. 3

End of Table 3

[illegible]

Для проведения более точной кластеризации анализируемых гаплотипов больших сусликов и выяснения микроэволюционных событий между ними была построена медианная сеть гаплотипов гена *Cyt b* (рис. 6). Сеть построена на основании 134 сегрегирующих и 118 информативных сайтов. Нуклеотидное разнообразие (π) вошедших в сеть последовательностей составило 0,453, коэффициент дифференциации (F_{ST}) – 0,393 ($p = 0,001$), а тест Таджимы достоверно выявил стабилизацию генетической структуры изучаемых генетических групп больших сусликов после резкого роста численности – $T's D = 3,526$, при $p = 0,00000$. В целом она подтверждает данные, полученные при ML-анализе выше. Результаты медианного теста указывают на существование трех генетически близких групп последовательностей гена *Cyt b*: групп гаплотипов, характеризующих два временных периода в существовании популяции больших сусликов с. Чириково (Ch1 и Ch2), и группы гаплотипов, обнаруженных только в изолированной популяции о. Пальцинский (Pal). При этом генетическая дистанция между общим для всех трех анализируемых групп гаплотипов центром расхождения составила для Ch1 – 93 замены, Ch2 – 18 замен, а для Pal – 15 замен.

Таким образом, анализ изменчивости гена *Cyt b* показал, что анализируемые популяции

большого суслика хорошо дифференцированы и различаются друг с другом. Анализ двух временных состояний популяции с. Чириково, также как и в случае с *D-loop*, выявил между ними достоверные различия по гаплотипической структуре.

Обсуждение

Прежде чем приступить к обсуждению динамики населения и генетической структуры популяции большого суслика с зарегистрированными двумя временными состояниями, остановимся на описании популяции *S. major* о. Пальцинский, которая, вследствие своего островного существования, долгое время была изолирована (без притока мигрантов) и возникла, вероятно, от небольшого числа вселенцев или особей-основателей.

Как показал анализ двух митохондриальных маркеров (*D-loop* и *Cyt b*), популяция большого суслика о. Пальцинский (Pal) характеризуется низким нуклеотидным, митотипическим и гаплотипическим разнообразием (табл. 4). По сравнению с «материковой» популяцией у с. Чириково (Ch1, Ch2), она в 7–47 (в среднем 20) раз менее разнообразна (π). При этом значение числа гаплотипов и гаплотипическое разнообразие для популяции Pal оказалось выше для *D-loop*, но было нулевым по маркеру

Сyt b, что, возможно, свидетельствует о формировании этой популяции из небольшой группы особей в результате быстрой изоляции во время

разлива Куйбышевского водохранилища
(1955–1957 гг.).

Рис. 6. Результаты генетического анализа нуклеотидных последовательностей (n=44) гена *Cyt b* (1140 пн) больших сусликов – медианная сеть гаплотипов (Hap). Длина ветвей, соединяющих отдельные гаплотипы, пропорциональна количеству мутационных шагов (указаны цифрами). Ch1 – популяция с. Чириково в период 2005–2010 гг., Ch2 – популяция с. Чириково в период 2018–2019 гг., Pal – популяция о. Пальчинский 2011 г.

Fig. 6. Results of genetic analysis of nucleotide sequences (n = 44) of the Cyt b gene (1140 bp) of the russet ground squirrel – median network of haplotypes (Hap). The length of the branches connecting individual haplotypes is proportional to the number of mutational steps (indicated by numbers). Ch1 – population of the village of Chirikovo in the period of 2005–2010, Ch2 – population of the village of Chirikovo in the period of 2018–2019, Pal – population of Paltsinsky Island, 2011

Таблица 4

Table 4

Показатели генетического разнообразия (π , K , h , H_d) и дифференциации (T 's D , F_u 's F_s) популяций большого сулика (с. Чириково – Ch1 в период 2005–2010 гг., Ch2 в период 2018–2019 гг. и о. Пальцинский – Pal) по двум митохондриальным маркерам – *D-loop* и *Cyt b*

Indicators of genetic diversity (π , K, h, Hd) and differentiation (T's D, Fu's Fs) of populations of the russet ground squirrel (the village of Chirikovo – Ch1 in the period of 2005–2010, Ch2 in the period of 2018–2019, and Paltsinsky Island – Pal) by two mitochondrial markers – *D-loop* and *Cyt b*

Pop	π		K		h				Hd		
	<i>Dloop</i>	<i>Cyt b</i>	<i>Dloop</i>	<i>Cyt b</i>	<i>Dloop</i>		<i>Cyt b</i>		<i>Dloop</i>	<i>Cyt b</i>	
Ch1	0,049	0,047	49,638	53,825	5 in 15	0,33	4 in 19	0,21	0,714	0,573	
Ch2	0,029	0,027	29,372	28,667	4 in 13	0,30	6 in 15	0,40	0,423	0,571	
Pal	0,003	0,000	3,000	0,000	3 in 4	0,75	1 in 10	0,10	0,833	0,000	
T's D	1,195		3,473		Fu's Fs				16,531		35,851
p	>0,100		<0,001		Strobeck's S statistic (p)				0,000		0,000

П р и м е ч а н и е: π – нуклеотидное разнообразие, K – среднее число нуклеотидных различий, h – число гаплотипов, H_d – гаплотипическое разнообразие, T 's D – тест Таджимы, F_u 's F_s – Тест Фу.

Анализ генетической структуры поселения большого суслика с. Чириково в двух временных периодах ее существования (Ch1 – 2005–2010 гг., Ch2 – 2018–2019 гг.) по двум митохондриальным маркерам показал, что популя-

ция испытала значительные изменения численности и прошла состояние «бутылочного горлышка» (см. табл. 4; рис. 7). Так, в период с 2005 по 2019 г. отмечается значительное падение всех показателей генетического разнообра-

зия по маркеру *D-loop*. Показатели нуклеотидного разнообразия (π), среднего числа нуклеотидных различий (K) и гаплотипического разно-

образия (H_d) снизились более чем в 2 раза. Менее значительно изменилось число гаплотипов (h) – на 9 %.

Рис. 7. Сравнение показателей генетического разнообразия (π , K , h , H_d) (DnaSP) и дифференциации ($T's D$, F_{ST}) (PopArt) популяции большого суслика с. Чириково в периоды 2005–2010 гг. (Ch1) и 2018–2019 гг. (Ch2) по двум маркерам мтДНК – *D-loop*, *Cyt b*. Обозначения: π – нуклеотидное разнообразие, K – среднее число нуклеотидных различий ($\times 10^2$), h – число гаплотипов, H_d – гаплотипическое разнообразие, $T's D$ – тест Таджиджи, F_{ST} – F-тест.

Fig. 7. Comparison of indicators of genetic diversity (π , K , h , H_d) (DnaSP) and differentiations ($T's D$, F_{ST}) (PopArt) of the russet ground squirrel population of the village of Chirikovo in the periods of 2005–2010 (Ch1) and 2018–2019 (Ch2) for two mtDNA markers – *D-loop*, *Cyt b*. Signs: π – nucleotide diversity, K – the average number of nucleotide differences ($\times 10^2$), h – the number of haplotypes, H_d – haplotype diversity, $T's D$ – Tajima's test, F_{ST} – F-test

По другому маркеру мтДНК (*Cyt b*) наблюдается несколько другая картина. Если показатели нуклеотидного разнообразия (π) и среднего числа нуклеотидных различий (K) так же, как и в случае с *D-loop*, уменьшились более чем в 2 раза, то гаплотипическое разнообразие (H_d) и число выявленных гаплотипов (h) либо не изменялись, либо немного возросли. Такая неравновесная динамика изменений индексов генетического разнообразия в популяции по этому кодирующему митохондриальному маркеру, по-видимому, связана с более медленной скоростью его микроэволюционных изменений по сравнению с изменчивым фрагментом *D-loop* мтДНК.

Тестирование последовательностей двух временных выборок популяции большого суслика с. Чириково по степени их дифференциации показало, что индексы Таджиджи ($T's D$) имеют положительные значения по обоим маркерам мтДНК. При этом индексы по *D-loop* и *Cyt b* имеют значения, указывающие на действие стабилизирующего отбора после быстрого роста численности, произошедшего по данным наблюдений после сильной депрессии и прохождения популяцией состояния «бутылоч-

ного горлышка». На реальность таких событий указывают и показатели индекса F_{ST} (0,218, 0,393 соответственно маркерам), свидетельствующие о хорошей генетической дифференциации двух разных по времени существования популяционных группировок в поселении большого суслика у с. Чириково.

Таким образом, проведенные генетические исследования динамически меняющихся и надежно изолированных популяций большого суслика показали, что использование маркеров мтДНК позволяет достаточно точно изучить их генетическую структуру и успешно воссоздать историю формирования поселений. Особенно такие исследования актуальны при изучении динамики контактных участков зон симпатрии гибридирующих близкородственных видов. Как показали наши исследования, именно в тех точках ареала, где наблюдается взрывная демографическая ситуация, связанная с прохождением популяциями состояния «бутылочного горлышка» и восстановлением численности, а также отмечается присутствие симпатрического вида, и фиксируются случаи межвидовой гибридизации большого суслика с другими представителями р. *Spermophilus* [22].

Библиографический список

- Алтухов, Ю. П. Генетические процессы в популяциях / Ю. П. Алтухов. – Москва : Академкнига, 2003. – 431 с.
- Хендрик, Ф. Генетика популяций / Ф. Хендрик. – Москва : Техносфера, 2003. – С. 326–340.

3. Абрамсон, Н. И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы / Н. И. Абрамсон // Вестник ВОГиС. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 307–331.
4. Frankham, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: review / R. Frankham // Genetical Research. – 1995. – Vol. 66. – P. 95–107.
5. Ohnishi, S. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells / S. Ohnishi, T. Yasuda, S. Kitamura, N. Nagaya // Stem Cells. – 2007. – Vol. 25. – P. 1166–1177.
6. Бакаева, С. С. Современное состояние популяций крапчатого суслика (*Spermophilus suslicus* Güld.) в восточной части ареала: метапопуляционная структура, биотопическая приуроченность, генетическое разнообразие : дис. ... канд. биол. наук / Бакаева С. С. – Пенза, 2013. – 21 с.
7. Hanski, I. Habitat connectivity, habitat continuity, and metapopulations in dynamic landscapes / I. Hanski // Oikos. – 1999. – P. 209–219.
8. Hanski, I. Genetic structure of cougar populations Across the wyoming basin: metapopulation or megapopulation / I. Hanski // Journal of Mammalogy. – 2004. – Vol. 85 (6). – P. 1207–1214.
9. Rousset, F. Genetic structure and selection in subdivided population / F. Rousset. – Princeton University Press, 2004. – 288 p.
10. Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: implications for conservation / S. Ricanova, J. Bryja, J-Fr. Cosson, Cs. Gedeon, L. Choleva, M. Ambros, Fr. Sedlacek // Conservation Genetics. – 2011. – Vol. 12 (4). – P. 1–15. – DOI 10.1007/s10592-011-0213-1.
11. Титов, С. В. Популяционные и генетические механизмы межвидовой гибридизации млекопитающих (на примере рода *Spermophilus*) : автореф. дис. ... докт. биол. наук / Титов С. В. – Москва : МГУ, 2009. – 48 с.
12. Кузьмин, А. А. Зона гибридизации большого (*Spermophilus major* Pall., 1778) и крапчатого (*S. suslicus* Güld., 1770) сусликов: экологические, поведенческие и генетические особенности : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Кузьмин А. А. – Москва : МГУ, 2009. – 24 с.
13. Arrigi, F. E. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues / F. E. Arrigi, G. Bergendahl, M. Mandel // Exp. Cell. Res. – 1968. – № 50. – P. 47–53.
14. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
15. Исследование гибридизации четырех видов сусликов Поволжья (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) разными молекулярно-генетическими методами / О. А. Ермаков, В. Л. Сурин, С. В. Титов, А. Ф. Тагиев, А. В. Лукьяненко, Н. А. Формозов // Генетика. – 2002. – Т. 38, № 7. – С. 950–964.
16. Кузьмин, Ал. А. Большой суслик (*Spermophilus major*, Pall) на Правобережье Волги: современное состояние и распространение / Ал. А. Кузьмин, А. А. Шмыров, С. В. Титов // Известия ПГПУ. Естественные науки. – 2011. – № 25. – С. 210–215.
17. Titov, S. V. Molecular genetic characteristic of Russet Ground Squirrel's population emerged as a result of introduction in Penza region / S. V. Titov, A. A. Kuzmin, A. A. Shmyrov // Invasion of alien species in Holarctic (Borok-4) : Programme & Book of Abstracts The IV International Symposium (September 22–28, 2013). – Yaroslavl : Filigran' Pub, 2013. – P. 175.
18. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R. C. Edgar // Nucleic acids research. – 2004. – Vol. 32, № 5. – P. 1792–1797.
19. Kumar, S. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Molecular biology and evolution. – 2016. – Vol. 33, № 7. – P. 1870–1874.
20. Leigh, J. PopART (Population Analysis with Reticulate Trees) / J. Leigh, D. Bryant, M. Steel. – 2015.
21. Librado, P. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // Bioinformatics. – 2009. – Vol. 25. – P. 1451–1452.
22. Титов, С. В. Новые данные о гибридизации крапчатого (*Spermophilus suslicus* Güld.) и большого (*Spermophilus major* Pall.) сусликов в широкой зоне симпатрии / С. В. Титов, А. А. Кузьмин, М. Д. Симаков, Н. А. Картавов // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2020. – № 1 (29). – С. 23–35. – DOI 10.21685/2307-9150-2020-1-3.

References

1. Altukhov Yu. P. *Geneticheskie protsessy v populyatsiyakh* [Genetic processes in populations]. Moscow: Akademkniga, 2003, 431 p. [In Russian]
2. Khendrik F. *Genetika populyatsiy* [Populational genetics]. Moscow: Tekhnosfera, 2003, pp. 326–340. [In Russian]
3. Abramson N. I. *Vestnik VOGiS* [Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Selectionists]. 2007, vol. 11, no. 2, pp. 307–331. [In Russian]
4. Frankham R. *Genetical Research*. 1995, vol. 66, pp. 95–107.
5. Ohnishi S., Yasuda T., Kitamura S., Nagaya N. *Stem Cells*. 2007, vol. 25, pp. 1166–1177.
6. Bakaeva S. S. *Sovremennoe sostoyanie populyatsiy krapchatogo suslika (Spermophilus suslicus Güld.) v vostochnoy chasti areala: metapopulyatsionnaya struktura, biotopicheskaya priurochennost', geneticheskoe raznoobrazie: dis. kand. biol. nauk* [Modern state of spotted souslik population (*Spermophilus suslicus* Güld) in

the eastern part of the natural habitat: metapopulational structure, biological confidedness, genetic diversity: thesis of candidate of biological sciences]. Penza, 2013, 21 p. [In Russian]

7. Hanski I. *Oikos*. 1999, pp. 209–219.
8. Hanski I. *Genetic Journal of Mammalogy*. 2004, vol. 85 (6), pp. 1207–1214.
9. Rousset F. *Genetic structure and selection in subdivided population*. Princeton University Press, 2004, 288 p.
10. Ricanova S., Bryja J., Cosson J-Fr., Gedeon Cs., Choleva L., Ambros M., Sedlacek Fr. *Conservation Genetics*. 2011, vol. 12 (4), pp. 1–15. DOI 10.1007/s10592-011-0213-1.
11. Titov S. V. *Populyatsionnye i geneticheskie mekhanizmy mezhvidovoy gibrizatsii mlekopitayushchikh (na primere roda *Spermophilus*): avtoref. dis. dokt. biol. nauk* [Populational and genetic mechanisms of interspecies hybridization of mammals (on the example of *Spermophilus*)]. Moscow: MGU, 2009, 48 p. [In Russian]
12. Kuz'min A. A. *Zona gibrizatsii bol'shogo (*Spermophilus major* Pall., 1778) i krapchatogo (*S. suslicus* Güld., 1770) suslikov: ekologicheskie, povedencheskie i geneticheskie osobennosti: avtoref. dis. kand. biol. nauk* [Hybridization zone of Russet ground squirrel (*Spermophilus major* Pall., 1778) and spotted souslik (*S. suslicus* Güld., 1770): ecological, behavioral and genetic features: abstract of candidate of biological sciences]. Moscow: MGU, 2009, 24 p. [In Russian]
13. Arrigi F. E., Bergendahl G., Mandel M. *Exp. Cell. Res.* 1968, no. 50, pp. 47–53.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
15. Ermakov O. A., Surin V. L., Titov S. V., Tagiev A. F., Luk'yanenko A. V., Formozov N. A. *Genetika* [Genetics]. 2002, vol. 38, no. 7, pp. 950–964. [In Russian]
16. Kuz'min A. A., Shmyrov A. A., Titov S. V. *Izvestiya PGPU. Estestvennye nauki* [Natural sciences]. 2011, no. 25, pp. 210–215. [In Russian]
17. Titov S. V., Kuzmin A. A., Shmyrov A. A. *Invasion of alien species in Holarctic (Borok-4): Programme & Book of Abstracts The IV International Symposium (September 22–28, 2013)*. Yaroslavl: Filigran' Pub, 2013, p. 175.
18. Edgar R. C. *Nucleic acids research*. 2004, vol. 32, no. 5, pp. 1792–1797.
19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. *Molecular biology and evolution*. 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874.
20. Leigh J., Bryant D., Steel M. *PopART (Population Analysis with Reticulate Trees)*. 2015.
21. Librado P., Rozas J. *Bioinformatics*. 2009, vol. 25, pp. 1451–1452.
22. Titov S. V., Kuz'min A. A., Simakov M. D., Kartavov N. A. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki* [University proceedings. Volga region. Natural sciences]. 2020, no. 1 (29), pp. 23–35. DOI 10.21685/2307-9150-2020-1-3. [In Russian]