

УДК 599.32: 591.158.1 DOI 10.21685/2500-0578-2022-3-1

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ КРАПЧАТОГО СУСЛИКА (*Spermophilus suslicus* GÜLD.) В ПРАВОБЕРЕЖНОМ ПОВОЛЖЬЕ

С. В. Титов¹, Н. А. Картавов², М. Д. Симаков³, О. В. Чернышова⁴, А. А. Кузьмин⁵^{1, 2, 3, 4} Пензенский государственный университет, Россия, 440026, Пенза, ул. Красная, 40⁵ Пензенский государственный технологический университет, Россия, 440039, Пенза, пр. Байдукова / ул. Гагарина 1а/11¹svtitov@yandex.ru, ²nikitakartavov@yandex.ru, ³maksimakov@bk.ru, ⁴oliarabbit@yandex.ru, ⁵kuzmin-puh@yandex.ru

Аннотация. Актуальность и цели. Долговременная изоляция популяций приводит к ограничению потока генов, снижению уровня гетерозиготности, повышению уровня инбридинга и к потере генетического разнообразия. Зачастую это ведет к полному вымиранию популяций или сильной перестройке их структуры. Последний процесс связан, прежде всего, с прохождением популяциями состояния «бутылочного горлышка» или восстановлением численности при ограниченном числе первопоселенцев. Целью работы было изучение в модельном поселении крапчатого суслика (*Spermophilus suslicus* GÜld.) особенностей многолетней динамики генетической структуры популяции в связи с сильной изоляцией и волнообразными изменениями численности на фоне существующей симпатрии с большим (*S. major* Pall.) сусликом. **Материалы и методы.** Аналитические выборки для генетического анализа составили: 8 экз. – популяция *S. suslicus* близь с. Трубетчина (Tr1) в 2016 г.; 20 экз. – популяция *S. suslicus* близь с. Трубетчина (Tr2) в 2021–2022 гг. Сбор образцов тканей, взятых прижизненно в результате биопсии на ушной раковине, проводили неинвазивными методами с учетом Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (ст. 9 и 42), и рекомендаций ASAB/ABS, Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. Проведен анализ изменчивости двух маркеров мтДНК – контрольный регион (C-регион, D-loop) и ген *Cyt b*, а также микросателлитной ДНК по четырем локусам – Xм C10, Xм D116, Igs-bm и Ssu 17. Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 13$) и гена *Cyt b* ($n = 16$), а также фрагментов микросателлитной ДНК ($n = 33$) проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности были изучены с помощью программ BioEdit 7.0, Mega7.0.21, PopArt и DnaSP 5.10.01. Полученные последовательности выделенных гаплотипов мтДНК (D-loop и *Cyt b*) были размещены в GeneBank NCBI (OR896081–OR896085; OR896086–OR896090). Все результаты были проверены статистическими тестами (STATISTICA 13.3). **Результаты.** Особенности изменений генетической структуры популяции крапчатого суслика близь с. Трубетчина во времени по митохондриальным маркерам указывают как на факт прохождения популяцией состояния «бутылочного горлышка» (изменение частотного соотношения аллелей), так и на формирование обновленной генетической структуры популяции при участии мигрантов (появление новых аллелей в популяции). Анализ динамики генетической структуры временных состояний популяций крапчатого суслика по более эволюционно «быстрым» микросателлитным маркерам подтверждает полученные данные по мтДНК. **Выводы.** Проведенные генетические исследования выявили медленные перестройки структуры популяции крапчатого суслика, которые указывают на низкую пластичность вида и подверженность его депрессивным явлениям. Такая уязвимость крапчатого суслика к действиям внешних факторов объясняет его неблагоприятное состояние в пределах восточной части ареала и вымирание большого числа современных поселений. Поэтому изучение генетического состояния сохранившихся поселений этого вида является важным в рамках мероприятий по его охране. Особенно такие исследования актуальны при изучении динамики контактных участков зон симпатрии гибридизирующих близкородственных видов.

Ключевые слова: крапчатый суслик, генетическая структура популяции, временная динамика, изменчивость, митохондриальные маркеры, правобережное Поволжье

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00108. URL: <https://rscf.ru/project/22-24-00108/>

Для цитирования: Титов С. В., Картавов Н. А., Симаков М. Д., Чернышова О. В., Кузьмин А. А. Особенности динамики генетической структуры популяций крапчатого суслика (*Spermophilus suslicus* GÜld.) в правобережном Поволжье // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2022. Vol. 7 (3). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2022-3-1>

FEATURES OF THE DYNAMICS OF THE GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS OF SPECKLED GROUND SQUIRREL (*SPERMOPHILUS SUSLICUS* GÜLD.) IN THE RIGHT-BANK VOLGA REGION

S. V. Titov¹, N. A. Kartavov², M. D. Simakov³, O. V. Chernyshova⁴, A. A. Kuzmin⁵

^{1, 2, 3, 4} Penza State University, 40 Krasnaya street, Penza, 440026, Russia

⁵ Penza State Technological University, 1a/11 Baydukova passage / Gagarin street, Penza, 440039, Russia

¹svtitov@yandex.ru, ²nikitakartavov@yandex.ru, ³maksimakov@bk.ru, ⁴oliarabbit@yandex.ru, ⁵kuzmin-puh@yandex.ru

Abstract. *Background.* Long-term isolation of populations leads to a restriction of gene flow, a decrease in the level of heterozygosity, an increase in the level of inbreeding and a loss of genetic diversity. This often leads to the complete extinction of populations or a strong restructuring of their structure. The latter process is associated with the overcoming of populations of the "bottleneck" state or the restoration of density with a limited number of migrants. The aim of the article was to study in a model colony of the speckled ground squirrel (*Spermophilus suslicus* Güld.) the features of the long-term dynamics of the genetic structure of the population due to strong isolation and wave-like changes in density against the background of existing sympatry with the russet (*S. major* Pall.) ground squirrel. *Materials and methods.* Analytical samples for genetic analysis were: 8 specimens – the population of *S. suslicus* of the village of Trubetchina (Tr1) in 2016; 20 specimens – the population of *S. suslicus* of the village of Trubetchina (Tr2) in 2021-2022. Tissue samples were collected in vivo (biopsy on the auricle) by non-invasive methods, taking into account Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes (Articles 9 and 42) and the recommendations of ASAB/ABS, Guidelines for the treatment of animals in behavioral research and teaching. The variability of two mtDNA markers was analyzed: the control region (C-region, D-loop) and the Cyt *b* gene. Microsatellite DNA was also studied at 4 loci – Xm C10, Xm D116, Igs-bm and Ssu 17. Fragments of the mtDNA control region ($n = 13$) and the Cyt *b* gene ($n = 16$), as well as fragments of microsatellite DNA ($n = 33$) were sequenced using an ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems). The nucleotide sequences were analyzed using the programs BioEdit 7.0, Mega 7.0.21, PopArt and DnaSP 5.10.01. Sequences of isolated mtDNA haplotypes (D-loop and Cyt *b*) were placed in GeneBank NCBI (OP896081–OP896085; OP896086–OP896090). All results were verified by statistical tests (STATISTICA 13.3). *Results.* The peculiarities of changes in the genetic structure of the speckled ground squirrel population of the village of Trubetchina by mitochondrial markers indicate that it has overcome the "bottleneck" state (a change in the frequency ratio of alleles), and a new genetic structure of the population has been formed with the participation of migrants (the appearance of new alleles in the population). Analysis of the dynamics of the genetic structure of the temporal states of speckled ground squirrel populations by more evolutionarily "fast" microsatellite markers confirms the obtained mtDNA data. *Conclusions.* Genetic studies have revealed slow restructuring of the speckled ground squirrel population structure, which indicate low plasticity of the species and its susceptibility to depression. Such vulnerability of the speckled ground squirrel to the actions of external factors explains its unfavorable state within the eastern part of its range and the extinction of a large number of modern colonies. Therefore, the study of the genetic condition of the preserved colonies of this species is important in the framework of measures for its protection. Such studies are especially relevant when studying the dynamics of contact areas of sympatric zones of hybridizing closely related species.

Keywords: speckled ground squirrel, genetic structure of the population, temporal dynamics, variability, mitochondrial markers, right-bank Volga region

Acknowledgments: the study was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-24-00108. URL: <https://rscf.ru/project/22-24-00108/>

For citation: Titov S.V., Kartavov N.A., Simakov M.D., Chernyshova O.V., Kuzmin A.A. Features of the dynamics of the genetic structure of populations of speckled ground squirrel (*Spermophilus suslicus* Güld.) in the right-bank Volga region. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2022;7(3). (In Russ.). Available from: <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2022-3-1>

Введение

Проблема изучения динамики популяций различных по экологическим предпочтениям видов животных, в особенности редких и исчезающих, является актуальной и вызывает широкий интерес у зарубежных и отечественных исследователей. Это направление научных ис-

следований, связанное с изучением генетической структуры популяционных систем в пространстве и времени, является перспективным как для теоретической науки, так и для прикладных задач. Изучение генетической структуры популяций стало современным направлением экологических исследований [1–5]. Его целью является решение ряда фундаменталь-

ных биологических проблем и прикладных задач, связанных с сохранением видов и биологического разнообразия. К таким фундаментальным проблемам относятся проблемы целостности биологического вида и микроэволюционной изменчивости, проблема границ внутривидовой дифференциации и проблема динамики популяций. В качестве прикладных стоит отметить задачи по оценке продуктивности вида в ареале и изучению риска вымирания и перспектив восстановления природных популяций [6–10]. Долговременная изоляция популяций приводит к ограничению потока генов, снижению уровня гетерозиготности, повышению уровня инбридинга и к потере генетического разнообразия. Зачастую это приводит к полному вымиранию популяций или сильной перестройке их структуры. Последний процесс связан, прежде всего, с прохождением популяциями состояния «бутылочного горлышка» или восстановлением численности при ограниченном числе первопоселенцев. В условиях такой разнонаправленной динамики населения в ареале постоянно происходят популяционные перестройки. В условиях симпатрического обитания близкородственных видов в тех или иных точках контактов возникают ситуации, при которых наблюдаются преодоление симпатрическими видами изоляционных барьеров и появление межвидовых гибридов в случайных контактах неконспецификов [11, 12].

Не менее важным для решения прикладных задач является изучение особенностей измененной структуры и численности популяций исчезающих и находящихся под угрозой вымирания видов [13]. Одним из таких видов является крапчатый суслик, признанный эдификатором европейских разнотравных степей.

Целью работы было изучение в модельном поселении крапчатого суслика (*Spermophilus suslicus* Güld.) особенностей многолетней динамики генетической структуры популяции в связи с сильной изоляцией и волнообразными изменениями численности на фоне существующей симпатрии с большим (*S. major* Pall.) сусликом.

Материал и методы

Материалом для работы послужил биоматериал, собранный в ходе полевых исследований в 2016–2022 гг. в прошедшей цикл волнообразной динамики численности популяции крапчатого суслика (*S. suslicus* Güld.), расположенной близ с. Трубетчина (Кузоватовский р-н, Ульяновская обл.; N53.6429, E47.8695) (рис. 1). Аналитические выборки для генетического анализа составили: 8 экз. – популяция *S. suslicus* близ с. Трубетчина (Tr1) в 2016 г.; 20 экз. – популяция *S. suslicus* близ с. Трубетчина (Tr2) в 2021–2022 гг.

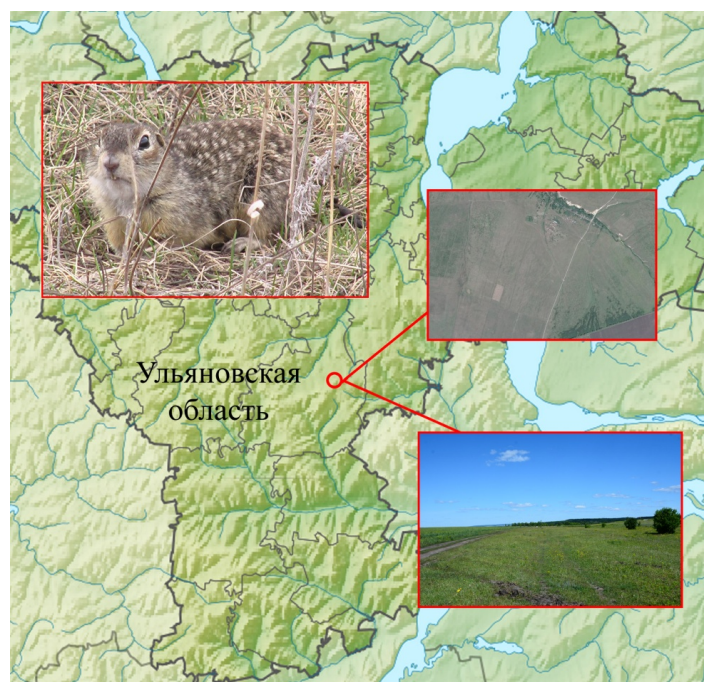


Рис. 1. Популяция крапчатого суслика, в которой был собран генетический материал для исследований: с. Трубетчина, Кузоватовский р-н, Ульяновская обл. (N53.6429, E47.8695)

Fig. 1. Population of speckled ground squirrel, in which the genetic material for research was collected: village of Trubetchina, Kuzovatovsky district, Ulyanovsk region (N53.6429, E47.8695)

Молекулярно-генетические исследования проводили с целью выявления генетического полиморфизма и генетического разнообразия в двух сформированных выборках, используя результаты анализа изменчивости двух маркеров мтДНК – контрольный регион (С-регион, *D-loop*) и ген *Cyt b*, а также микросателлитной ДНК по четырем локусам – *Xm C10* (СТТТ-повтор), *Xm D116* (СТАТ-повтор), *Igs-bm* (САА-повтор) и *Ssu 17* (САТ-повтор).

Сбор образцов тканей, взятых прижизненно в результате биопсии на ушной раковине, проводили неинвазивными методами с учетом Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (ст. 9 и 42). Используемые методы соответствовали рекомендациям ASAB/ABS, Guidelines for the treat-

ment of animals in behavioural research and teaching [14].

ДНК выделяли из образцов тканей, зафиксированных в 96 % этаноле, по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции после обработки материала протеиназой К и SDS [15, 16].

Полимеразную цепную реакцию (PCR) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl (рН 8,9), 20 мМ сульфата аммония, 20 мМ ЭДТА, 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (200 мМ каждого из четырех), 2 мМ хлористого магния, 15 пмоль каждого из праймеров, 2 ед. активности Таq-полимеразы и 0,1–0,2 мкг ДНК с использованием разработанных специфических праймеров [17–19] (табл. 1).

Таблица 1

Праймеры, использованные в анализе митохондриальной и микросателлитной ДНК крапчатых сусликов

Table 1

Primers used in the analysis of mitochondrial and microsatellite DNA of speckled ground squirrels

Маркер	Праймеры	T° _{отж}	Последовательность 5' – 3'	Фрагмент, п.н.
Митохондриальная ДНК				
С-регион	MDL 1 H00651	60°	TCCACCTTCAACTCCCAAAGC TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAAACCT	1051
Cyt b	GlCbSt D GlCbend R	62°	AATGACATGAAAAATCATCGTTGT GTTTCATTTTTGGTTTACAAGACCA	1140
Микросателлитная ДНК				Повтор
XmC10	XmohC10 Dm XmohC10 Rm	58°	AGCACCCCTGAAATCAATCT TAGGCAGAAAAGTGAGAGC	СТТТ
XmD116	XmohD116 Dm XmohD116 Rm	58°	TGGCAGAAAGGATGGGAG TTGGCAGATGGGACCTCC	СТАТ
Igs-bm	IGS-bm D IGS-bm R	58°	AAGCAGAGAAGTGGTACTAC AACATTGTTTCCCTTGCTATC	САА
Ssu 17	Ssu17N D Ssu17 R	60°	ATATGAAGTTCCTAGTAAGTCC TGATTCAAAGATGCAAACATCC	САТ

Специфичность и индивидуальность фрагментов ДНК, полученных в ходе PCR, определяли по различиям масс этих фрагментов при электрофоретическом разделении в 6 % (для фрагментов митохондриальных генов) и 8 % (для фрагментов микросателлитной ДНК) полиакриламидном геле (ПААГ).

Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 13$), гена *Cyt b* ($n = 16$), а также типизирующих аллельное разнообразие фрагментов микросателлитной ДНК ($n = 33$) проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) с использованием набора реактивов BigDye® Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kits при первоначальной подготовке проб в ампли-

фикаторе SimpliAmp™ Thermal Cycler. Нуклеотидные последовательности были прочитаны и отредактированы с помощью программы BioEdit 7.0 [20]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли по алгоритму MUSCLE [21] в программе Mega 7.0.21 [22] с обязательной доводкой вручную. Для реконструкции филогенетических отношений использовали методы максимального правдоподобия (ML) и максимальной экономии (MP), а также метод построения медианной сети (Median Joining) в программе PopArt [23]. Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие было изучено с помощью программы DnaSP 5.10.01 [24]. Полученные последовательности выделенных

гаплотипов мтДНК крапчатого суслика (*D-loop*, $n = 5$ и *Cyt b*, $n = 5$) были размещены в GeneBank NCBI (OP896081–OP896085; OP896086–OP896090).

Анализ генетических данных по фрагментам микросателлитной ДНК осуществляли стандартными статистическими процедурами и при использовании программ Arlequin 3.5.2 [25] и Structure 2.3.4 [26].

Для статистической обработки результатов для всех статистических тестов был установлен уровень значимости $p < 0,05$. Статистическая обработка данных проведена в STATISTICA 13.3 (©StatSoftRussia, SN: AXA908I943629FAACD-A).

Результаты

Изучение нуклеотидной и гаплотипической изменчивости в модельных популяциях *S. suslicus*

(Tr1, Tr2) было проведено в ходе ML-анализа (метод максимального правдоподобия) последовательностей фрагментов *D-loop* мтДНК крапчатого суслика ($n = 13$). Для этого была использована эволюционная модель НКУ (модель Хасегава – Кишино – Яно; максимальный логарифм правдоподобия –1843,94), выбор которой определялся минимальными значениями Байесового информационного критерия (BIC = 3986,63). Уровень изменчивости митохондриальных фрагментов *D-loop* крапчатого суслика (число нуклеотидных замен) оказался низким (для внутривидового уровня) и изменяется в пределах от 1,1 до 0,0 % (в среднем около $0,4 \pm 0,01$ %). Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов *D-loop* (ML) с учетом неравномерности скорости эволюционных процессов позволил построить кладограмму и объединить их в группы выявленным в модельных популяциях (рис. 2).

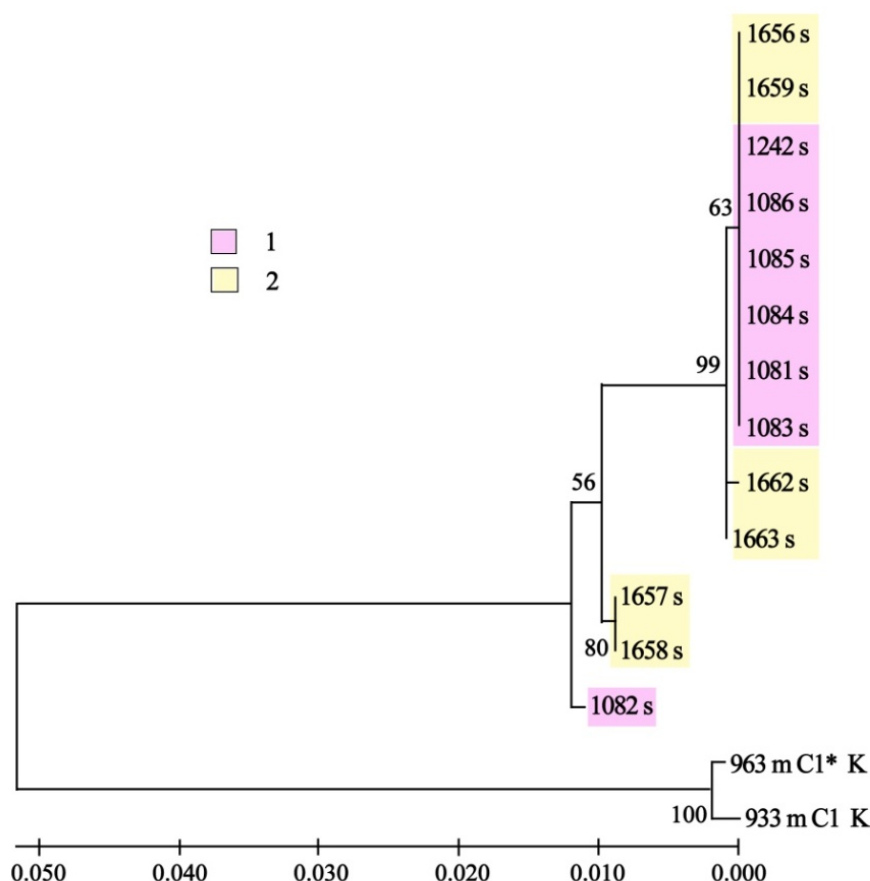


Рис. 2. Результаты генетического ML-анализа (модель НКУ) нуклеотидных последовательностей ($n = 13$) участка D-петли мтДНК (1036 пн), показывающие филогенетические отношения между митотипами, характеризующими модельные популяции крапчатого суслика. В узлах – результаты бутстреп-анализа (1000 реплик), шкала – генетические дистанции между митотипами, К – последовательности внешней группы (большой суслик, *S. major*). Популяции: 1 – с. Трубетчина в 2016 г. (Tr1); 2 – с. Трубетчина в 2021 г. (Tr2)

Fig. 2. Results of genetic ML analysis (HKY model) of nucleotide sequences ($n = 13$) of the mtDNA D-loop region (1036 bp), showing phylogenetic relationships between mitotypes that characterize model populations of the speckled ground squirrel. In nodes – the results of bootstrap analysis (1000 replicates), scale – genetic distances between mitotypes, K – outgroup sequences (large ground squirrel, *S. major*). Populations: 1 – village of Trubetchina in 2016 (Tr1); 2 – village of Trubetchina in 2021 (Tr2)

Анализ гаплотипического и нуклеотидного разнообразия популяций крапчатого суслика (DnaSP 5.10.01) по 13 секвенсам фрагмента *D-loop* выявил, что число сегрегирующих сайтов (S) составило 13, число мутаций – 13. Было выделено 5 гаплотипов (h), гаплотипическое разнообразие (Hd) составило 0,628, нуклеотидное разнообразие (π) – 0,0043, среднее число

нуклеотидных различий (k) – 4,55 (табл. 2). Генетическая дифференциация популяций большого суслика по оценке показателя G_{ST} составила 0,110, при показателе миграции (число особей в каждой популяции $\times$ долю мигрантов в каждой популяции) N_m – 4,02, а по оценке показателя F_{ST} – 0,031 и 15,42 соответственно.

Таблица 2

Гаплотипы мтДНК (*D-loop*, 1036 пн) крапчатого суслика из модельных популяций: с. Трубетчина в 2016 г. (Tr1), с. Трубетчина в 2021 г. (Tr2). Во второй колонке указаны характерные нуклеотидные замены и их позиции в последовательности, в третьей – популяции локализации с указанием номера особи

Table 2

MtDNA haplotypes (*D-loop*, 1036 bp) of the speckled ground squirrel from model populations: village of Trubetchina in 2016 (Tr1), village of Trubetchina in 2021 (Tr2). The second column contains characteristic nucleotide substitutions and their positions in the sequence, the third – population of localization with indication of the number of the individual

	1 1 2 2 2 2 2 3 4 4 9	N	
	7 8 5 8 2 2 3 6 6 3 1 9 6	SE	Популяция, номер особи
	4 5 8 1 1 9 8 1 6 0 0 4 5	Q	
Hap U1	T G A C T G A A T C T G A	8	Tr1 – 1081, 1083–1086, 1242; Tr2 – 1656, 1659
Hap U2	C A G T C A G T C T C . .	1	Tr1 – 1082
Hap U3	. A G T C A G . C T C . G	2	Tr2 – 1657, 1658
Hap U4	 A G	1	Tr2 – 1662
Hap U5	 G	1	Tr2 – 1663

Для проведения уточненной кластеризации анализируемых гаплотипов крапчатых сусликов и выяснения микроэволюционных событий

между ними была построена медианная сеть гаплотипов мтДНК (рис. 3).

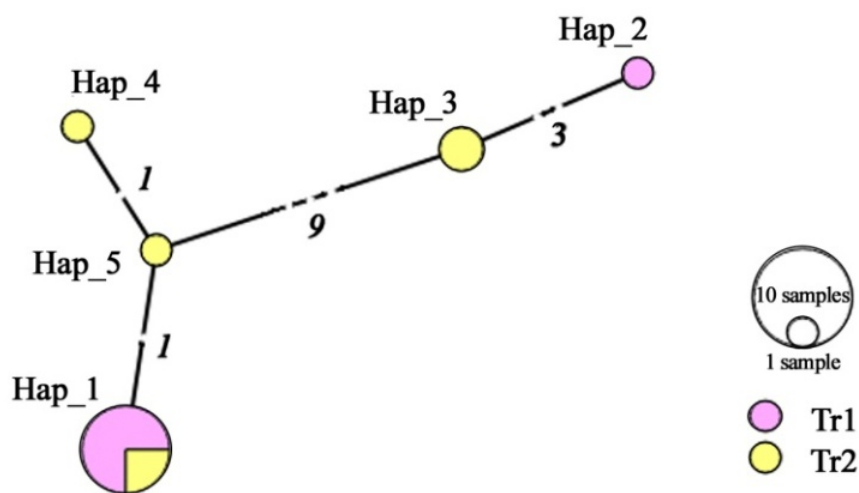


Рис. 3. Результаты генетического анализа нуклеотидных последовательностей ($n = 13$) участка мтДНК (*D-loop*, 1036 пн) крапчатых сусликов – медианная сеть гаплотипов (Hap). Длина ветвей, соединяющих отдельные гаплотипы, пропорциональна количеству мутационных шагов (указаны цифрами): с. Трубетчина в 2016 г. (Tr1); с. Трубетчина в 2021 г. (Tr2)

Fig. 3. Results of genetic analysis of nucleotide sequences ($n = 13$) of mtDNA region (*D-loop*, 1036 bp) of speckled ground squirrels – median haplotype network (Hap). The length of the branches connecting individual haplotypes is proportional to the number of mutational steps (indicated by numbers): village of Trubetchina in 2016 (Tr1); village of Trubetchina in 2021 (Tr2)

Сеть построена на основании 13 сегрегирующих и 10 парсимони-информативных сайтов. Нуклеотидное разнообразие (π) вошедших в сеть последовательностей составила 0,337, коэффициент дифференциации (F_{ST}) – 0,001 ($p = 0,192$), а тест Таджимы выявил стабилизацию генетической структуры изучаемых генетических групп крапчатых сусликов – $T's D = 0,192$, при $p = 0,836$. В целом она подтверждает данные, полученные при ML-анализе выше. Результаты медианного теста указывают на отсутствие какой-либо заметной генетической дивергенции двух временных популяций крапчатого суслика по данному генетическому маркеру.

Для проведения ML-анализа последовательностей фрагментов гена *Cyt b* мтДНК *S. suslicus*

($n = 13$) была использована эволюционная модель TN93 (модель Тамуры – Нея, максимальный логарифм правдоподобия –2334,89), выбор которой определялся результатами теста (BIC = 5003,37). Уровень изменчивости митохондриальных фрагментов гена *Cyt b* крапчатого суслика (число нуклеотидных замен) оказался, как и в случае с *D-loop*, низким (для внутривидового уровня) и изменяется в пределах от 1,1 до 0,0 % (в среднем около $0,30 \pm 0,08$ %). Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов *Cyt b* (ML) с учетом неравномерности скорости эволюционных процессов позволил построить кладограмму и объединить их в группы, соответствующие группировкам в модельной популяции (рис. 4).

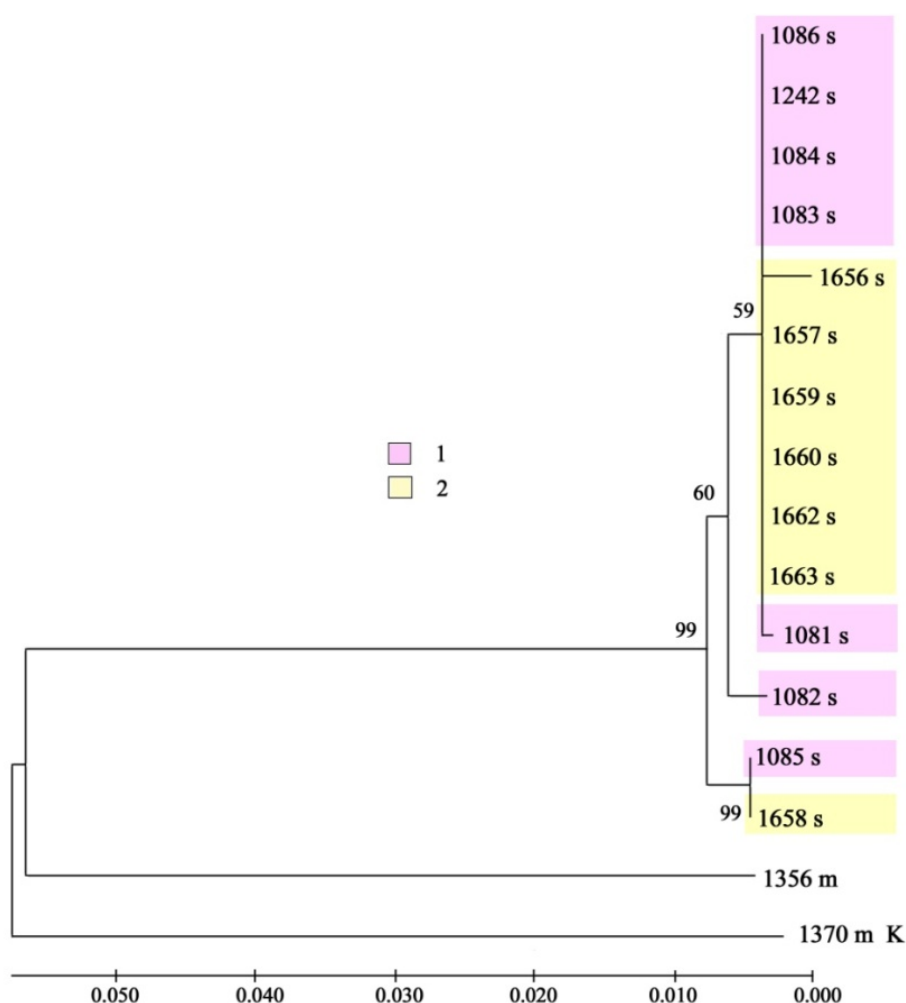


Рис. 4. Результаты генетического ML-анализа (модель TN93) нуклеотидных последовательностей ($n = 16$) участка *Cyt b* мтДНК (1140 пн), показывающие филогенетические отношения между митотипами, характеризующими модельные популяции крапчатого суслика. В узлах – результаты бутстреп-анализа (1000 реплик), шкала – генетические дистанции между митотипами, К – последовательности внешней группы (большой суслик, *S. major*). Популяции: 1 – с. Трубетчина в 2016 г. (Tr1); 2 – с. Трубетчина в 2021 г. (Tr2)

Fig. 4. Results of genetic ML analysis (model TN93) of nucleotide sequences ($n = 16$) of the *Cyt b* region of mtDNA (1140 bp), showing phylogenetic relationships between mitotypes that characterize model populations of the speckled ground squirrel. In nodes – the results of bootstrap analysis (1000 replicates), scale – genetic distances between mitotypes, K – outgroup sequences (large ground squirrel, *S. major*). Populations: 1 – village of Trubetchina in 2016 (Tr1); 2 – village of Trubetchina in 2021 (Tr2)

Анализ генетической изменчивости фрагмента гена *Cyt b* мтДНК по группам сравнения последовательностей (Tr1, Tr2) выявил, что среднее эволюционное разнообразие для всей совокупности последовательностей составило $0,31 \pm 0,08$ %, а средняя эволюционная дивергенция внутри групп – $0,32 \pm 0,09$ %. При этом эволюционное разнообразие между анализируемыми группами имеет почти такие же значения – $0,30 \pm 0,08$ %, а коэффициент межгрупповой эволюционной дифференциации неопределим, что указывает на довольно выровненную генетическую структуру анализируемых временных популяций крапчатого суслика.

Анализ гаплотипического и нуклеотидного разнообразия популяций крапчатого суслика (DnaSP 5.10.01) по 14 секвенсам фрагмента гена *Cyt b* выявил, что число сегрегирующих сайтов (S) составило 15, число мутаций – 15. Было выделено 5 гаплотипов (h), гаплотипическое разнообразие (Hd) составило 0,593, нуклеотидное разнообразие (π) – 0,003, среднее число нуклеотидных различий (k) – 3,52 (табл. 3). Генетическая дифференциация популяций большого суслика по оценке показателя G_{ST} составила –0,040, при показателе миграции (число особей в каждой популяции $\times$ долю мигрантов в каждой популяции) Nm –13,0, а по оценке показателя F_{ST} –0,076 и –7,09 соответственно.

Таблица 3

Гаплотипы мтДНК (*Cyt b*, 1140 пн) крапчатого суслика из модельных популяций: с. Трубетчина в 2016 г. (Tr1), с. Трубетчина в 2021 г. (Tr2). Во второй колонке указаны характерные нуклеотидные замены и их позиции в последовательности, в третьей – популяции локализации с указанием номера особи

Table 3

MtDNA haplotypes (*Cyt b*, 1140 bp) of the speckled ground squirrel from model populations: village of Trubetchina in 2016 (Tr1), village of Trubetchina in 2021 (Tr2). The second column shows the characteristic nucleotide substitutions and their positions in the sequence, the third – populations of localization with indication of the number of the individual

	1 2 4 5 6 7 8 8 8 8 8 8 9 0	1 N SEQ	Локалитет
	1 4 3 6 3 0 4 5 5 6 6 9 9 4 7		
	2 3 2 4 0 7 1 7 8 1 3 1 4 2 4		
Нап U1	G T C C C T A A C A T G C C C	1	Tr1 – 1081
Нап U2	A C T T T	1	Tr1 – 1082
Нап U3	 C	9	Tr1 – 1083–1086, 1242; Tr2 – 1657, 1659, 1660, 1662, 1663
Нап U4	. C . T T C C A T T T	2	Tr2 – 1662
Нап U5	 C C A T A	1	Tr2 – 1663

Для проведения кластеризации анализируемых гаплотипов крапчатых сусликов и выяснения микроэволюционных событий между ними была построена медианная сеть гаплотипов гена *Cyt b* (рис. 5). Сеть построена на основании 15 сегрегирующих и 4 парсимони-информативных сайтов. Нуклеотидное разнообразие (π) вошедших в сеть последовательностей составило 0,235, коэффициент дифференциации (F_{ST}) –0,026 ($p = 0,428$), а тест Таджимы выявил возможный рост численности населения в популяции после прохождения «бутылочного горлышка» в период депрессии численности – $T's D = -1,028$, при $p = 0,428$. В целом она подтверждает данные, полученные

при ML-анализе выше. Результаты медианного теста указывают на отсутствие какой-либо заметной генетической дивергенции двух временных популяций крапчатого суслика и по данному генетическому маркеру.

Таким образом, анализ изменчивости маркеров мтДНК (контрольного региона, *D-loop* и гена *Cyt b*) показал, что анализируемые временные популяции крапчатого суслика слабо дифференцированы и почти не различаются друг с другом. Выявленные различия затрагивают лишь перестройку гаплотипической структуры, что не отвергает возможности прохождения изученной популяцией *S. suslicus* «бутылочного горлышка».

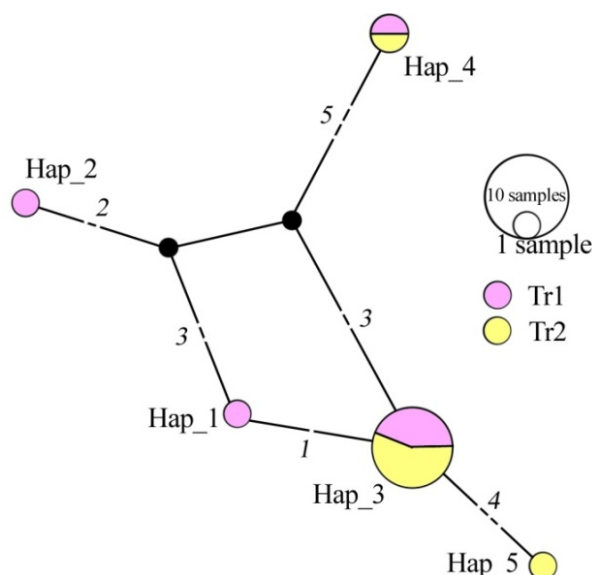


Рис. 5. Результаты генетического анализа нуклеотидных последовательностей ($n = 14$) участка мтДНК (Cyt *b*, 1140 пн) крапчатых сусликов – медианная сеть гаплотипов (Hap). Длина ветвей, соединяющих отдельные гаплотипы, пропорциональна количеству мутационных шагов (указаны цифрами): с. Трубетчина в 2016 г. (Tr1), с. Трубетчина в 2021 г. (Tr2)

Fig. 5. Results of genetic analysis of nucleotide sequences ($n = 14$) of mtDNA region (Cyt *b*, 1140 bp) of speckled ground squirrels – median haplotype network (Hap). The length of the branches connecting individual haplotypes is proportional to the number of mutational steps (indicated by numbers): village of Trubetchina in 2016 (Tr1), village of Trubetchina in 2021 (Tr2)

Анализ генетической структуры популяций большого суслика в разные временные периоды

в программе *Arlequin* выявил следующие результаты (табл. 4).

Таблица 4

Генетические показатели полиморфизма микросателлитной ДНК популяций крапчатого суслика (*Spermophilus suslicus*)

Table 4

Genetic indicators of microsatellite DNA polymorphism of Speckled ground squirrel (*Spermophilus suslicus*) populations

Популяция	n	N_a	H_{obs}	H_{exp}	AR	GW	Theta (H)
Tr1	7	$4 \pm 1,414$	$0,5 \pm 0,357$	$0,59 \pm 0,22$	$6,75 \pm 3,112$	$0,55 \pm 0,113$	$1,57 \pm 0,163$
Tr2	8	$4,5 \pm 1,118$	$0,65 \pm 0,22$	$0,68 \pm 0,08$	$5,5 \pm 2,598$	$0,75 \pm 0,165$	$1,803 \pm 0,163$

П р и м е ч а н и е. Tr1 – популяция с. Трубетчина в 2016 г.; Tr2 – популяция с. Трубетчина в 2021 г.; n – размер выборки; N_a – среднее число аллелей на локус; H_{obs} – наблюдаемая гетерозиготность; H_{exp} – ожидаемая гетерозиготность; AR (allelerange) – диапазон (разброс) аллелей; GW – средний индекс аллельных «потерь» Garza – Williams; Theta (H) – ожидаемая гетерозиготность по локусу (θ_H).

Анализ частоты микросателлитных аллелей в двух временных популяциях крапчатого суслика (*S. suslicus*) по четырем микросателлитным локусам – Xm C10 (CTTT-повтор), Xm D116 (CTAT-повтор), Igs-bm (CAA-повтор) и Ssu17 (CAT-повтор) – выявил 4, 6, 2 и 4 аллели соответственно для популяции 2016 г.; 5, 6, 3 и 4 аллели соответственно для популяции 2021 г. (рис. 6). Среднее число аллелей на локус N_a варьируется от 2,5 до 6 ($4 \pm 1,414$, $n = 7$ – у популяции 2016 г., $4,5 \pm 1,118$, $n = 8$ – у популяции 2021 г.). Наблюдаемая гетерозиготность

H_{exp} варьируется от 0,59 до 0,68, наблюдаемая гетерозиготность H_{obs} имеет примерно те же значения: от 0,5 до 0,65. Средний индекс аллельных «потерь» Garza – Williams изменяется от 0,55 до 0,75. Ожидаемая гетерозиготность по локусу (θ_H) варьирует от 1,57 до 1,8. Таким образом, во временных популяциях крапчатого суслика мы видим примерно равные значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности и относительно небольшую потерю числа аллелей в локусе.

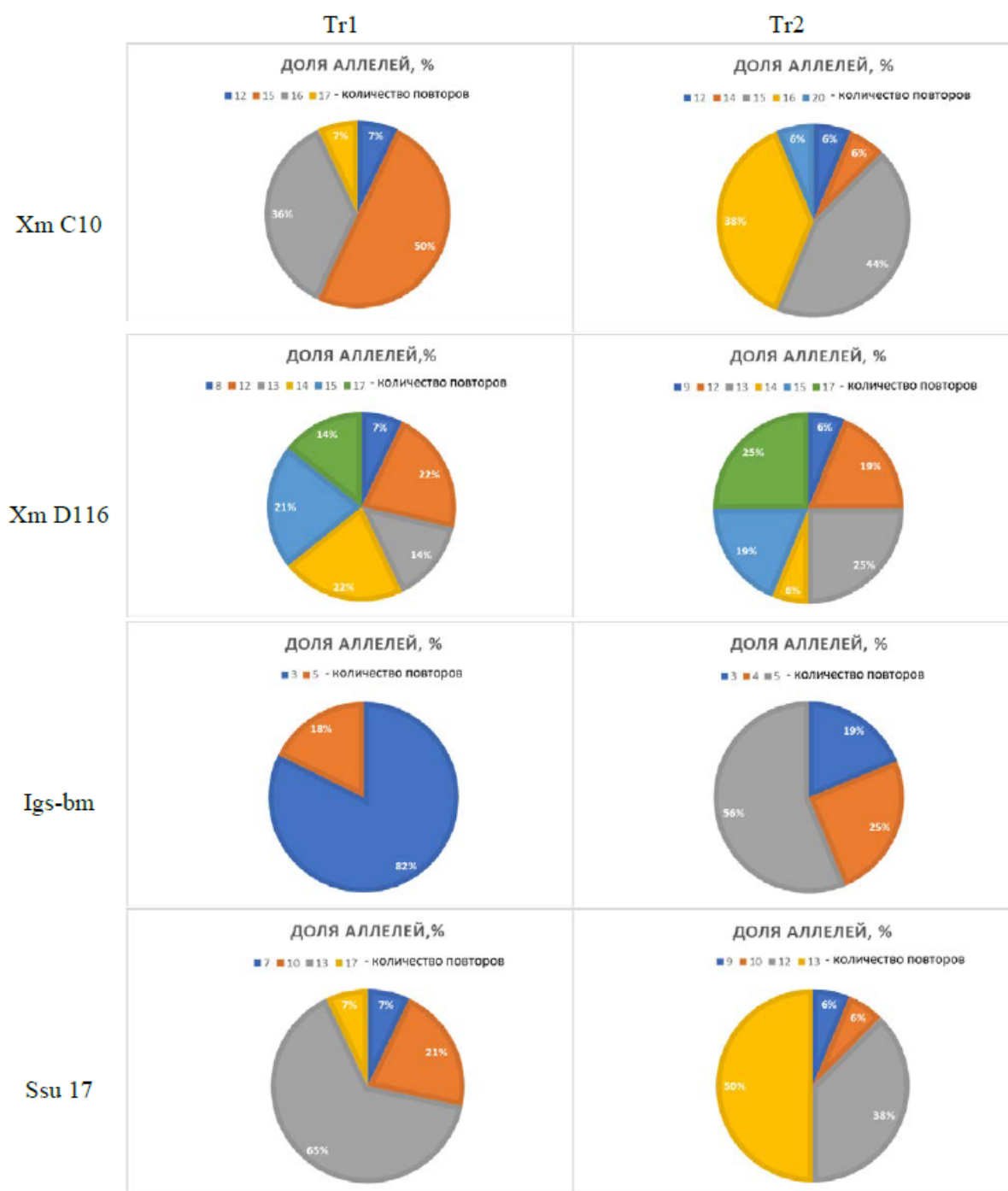


Рис. 6. Результаты анализа частот аллелей микросателлитной ДНК в популяциях крапчатого суслика (*S. suslicus*) по четырем локусам – Xm C10 (CTTT-повтор), Xm D116 (CTAT-повтор), Igs-bm (CAA-повтор) и Ssu 17 (CAT-повтор). Tr1 – популяция с. Трубетчина в 2016 г.; Tr2 – популяция с. Трубетчина в 2021 г.

Fig. 6. Results of the analysis of allele frequencies of microsatellite DNA in populations of the speckled ground squirrel (*S. suslicus*) at four loci – Xm C10 (CTTT repeat), Xm D116 (CTAT repeat), Igs-bm (CAA repeat) and Ssu 17 (CAT-repeat). Tr1 – population of the village of Trubetchina in 2016; Tr2 – population of the village of Trubetchina in 2021

Для полученных по двум временным популяциям большого суслика аллельным выборкам был проведен анализ генетической структуры популяций в программе STRUCTURE 2.3.4 (число предполагаемых кластеров от 2 до 10). При этом количество генераций марковских цепей Монте-Карло составило 50 000, а отбра-

сывание (burn-in) – 5000 первых генераций. Для определения оптимального числа кластеров (K) применяли приложение STRUCTURE HARVESTER по методу Эванно [27], основанному на анализе изменений функции правдоподобия при изменении количества кластеров (K).

Для оценки генетической структуры популяций крапчатого суслика методом кластеризации было определено наиболее вероятное число кластеров (K). Оптимальное число кластеров

равно 2 при ближайших показателях по вероятности $K = 3$, $K = 4$ и $K = 5$, а по результатам кластерного анализа видна смешанная дифференциация по кластерам (рис. 7).

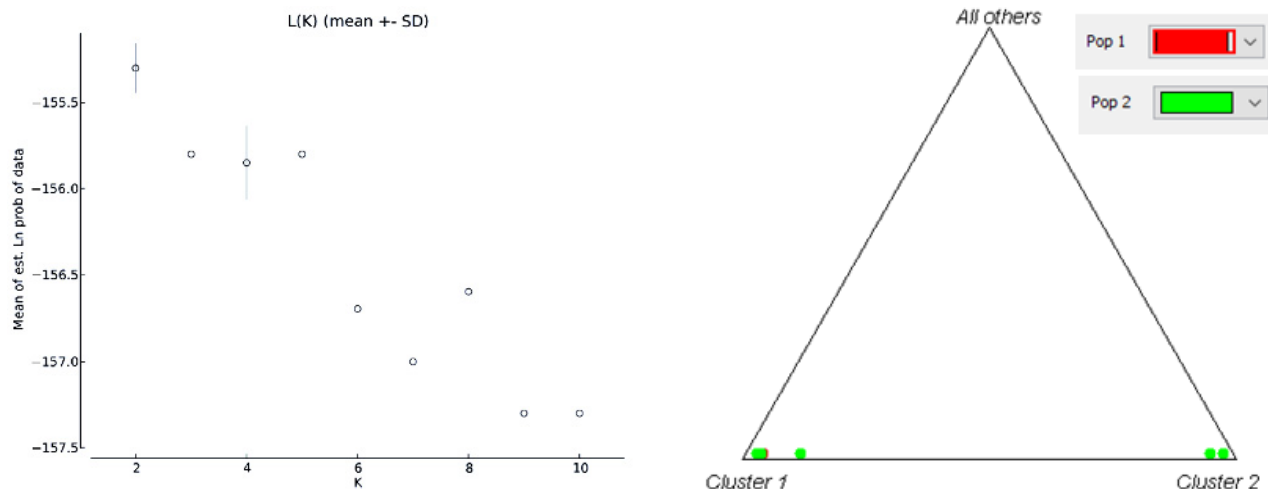


Рис. 7. Результаты и достоверность кластеризации (ΔK) для двух популяций крапчатого суслика (*S. suslicus*): Tr1 – популяция с. Трубетчина в 2016 г. (Pop1); Tr2 – популяция с. Трубетчина в 2021 г. (Pop2)

Fig. 7. Results and reliability of clustering (ΔK) for two populations of the speckled ground squirrel (*S. suslicus*): Tr1 – population of the village of Trubetchina in 2016 (Pop1); Tr2 – population of the village of Trubetchina in 2021 (Pop2)

Кластерный анализ, проведенный для популяций крапчатого суслика при $K = 2$, выявил четкое их разделение по кластерам. Однако

у популяции 2021 г. выделен смешанный генотип с хорошей дифференциацией по кластерам (рис. 8).

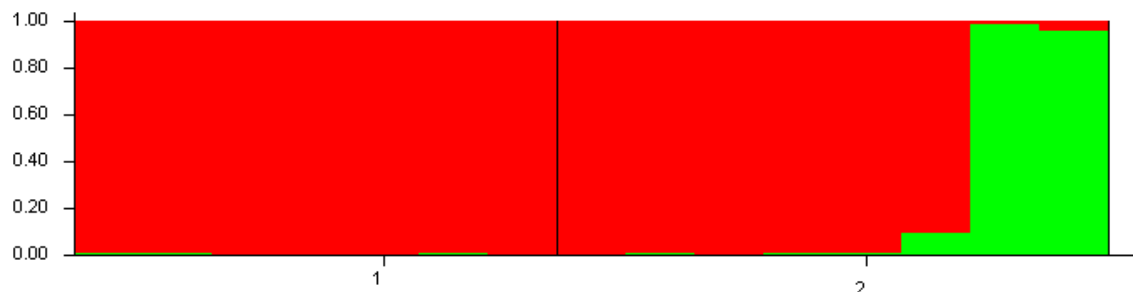


Рис. 8. Структура двух популяций крапчатого суслика (*S. suslicus*) при $K = 2$: Tr1 – популяция с. Трубетчина в 2016 г.; Tr2 – популяция с. Трубетчина в 2021 г.

Fig. 8. Structure of two populations of the speckled ground squirrel (*S. suslicus*) at $K = 2$: Tr1 – population of the village of Trubetchina in 2016; Tr2 – population of the village of Trubetchina in 2021

Таким образом, анализ временных изменений генетической структуры популяции крапчатого суслика близ с. Трубетчина по микросателлитным маркерам подтверждает полученные данные по мтДНК. Выявленные особенности указывают как на факт прохождения «бутылочного горлышка», так и на формирование обновленной генетической структуры популяции при участии мигрантов.

Обсуждение

Анализ генетической структуры поселения крапчатого суслика с. Трубетчина в двух вре-

менных срезах ее существования (Tr1 – 2016 г., Tr2 – 2021 г.) по двум митохондриальным маркерам показал, что в популяции даже при медленном росте численности заметны изменения генетической структуры (табл. 5; рис. 9). В период с 2016 по 2021 г. по маркеру *D-loop* отмечается заметное увеличение всех показателей генетического разнообразия. Показатели нуклеотидного разнообразия (π), среднего числа нуклеотидных различий (K) и число гаплотипов (h) увеличились в более чем 2 раза. Более значительно изменилось гаплотипическое разнообразие (Hd) – в 3 раза. По второму маркеру мтДНК (*Cyt b*) наблюдается другая ситуация.

Показатели нуклеотидного разнообразия (π) и среднего числа нуклеотидных различий (K) остаются стабильными, в то время как значения

числа выявленных гаплотипов (h) и гаплотипического разнообразия (Hd) значительно снижаются – в 1,3 раза.

Таблица 5

Показатели генетического разнообразия (π , K , h , Hd) и дифференциации ($T's D$, $Fu's Fs$) популяции крапчатого суслика с. Трубетчина ($Tr1$ – в 2016 г., $Tr2$ – в 2021 г.) по двум митохондриальным маркерам – $D-loop$ и $Cyt b$

Table 5

Indicators of genetic diversity (π , K , h , Hd) and differentiation ($T's D$, $Fu's Fs$) of populations of speckled ground squirrel of the village of Trubetchina ($Tr1$ – in 2016, $Tr2$ – in 2021) by two mitochondrial markers – $D-loop$ and $Cyt b$

Pop	π		K		h				Hd	
	$Dloop$	$Cyt b$	$Dloop$	$Cyt b$	$Dloop$		$Cyt b$		$Dloop$	$Cyt b$
Tr1	0,003	0,003	3,14	3,90	2 из 5	0,400	4 из 5	0,800	0,286	0,714
Tr2	0,006	0,003	5,67	3,43	4 из 5	0,800	3 из 5	0,600	0,867	0,524
T's D	0,192		-1,028		Fu's Fs		2,040		1,589	
p	$p>0,10$		$p>0,10$		Strobeck's S statistic (p)		$p>0,10$		$p>0,10$	

Примечание: π – нуклеотидное разнообразие, K – среднее число нуклеотидных различий, h – число гаплотипов, Hd – гаплотипическое разнообразие, $T's D$ – тест Таджимы, $Fu's Fs$ – тест Фу.

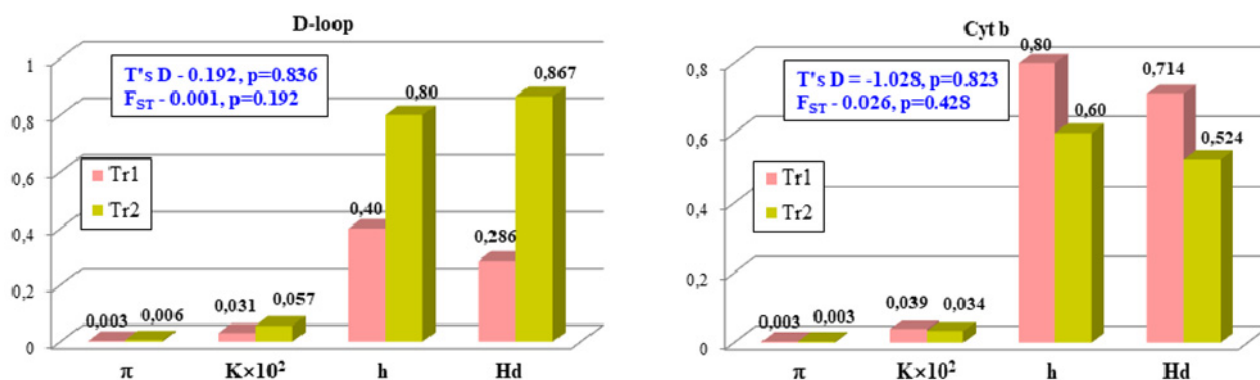


Рис. 9. Сравнение показателей генетического разнообразия (π , K , h , Hd) (DnaSP) и дифференциации ($T's D$, F_{ST}) (PopArt) популяции крапчатого суслика в окр. с. Трубетчина в 2016 г. ($Tr1$) и в 2021 г. ($Tr2$) по двум маркерам мтДНК – $D-loop$, $Cyt b$: π – нуклеотидное разнообразие, K – среднее число нуклеотидных различий ($\times 10^2$), h – число гаплотипов, Hd – гаплотипическое разнообразие, $T's D$ – тест Таджимы, F_{ST} – F-тест

Fig. 9. Comparison of genetic diversity indicators (π , K , h , Hd) (DnaSP) and differentiation ($T's D$, F_{ST}) (PopArt) of the speckled ground squirrel population in the vicinity of the village of Trubetchina in 2016 ($Tr1$) and in 2021 ($Tr2$) by two mtDNA markers – $D-loop$, $Cyt b$: π – nucleotide diversity, K – average number of nucleotide differences ($\times 10^2$), h – number of haplotypes, Hd – haplotype diversity, $T's D$ – Tajima test, F_{ST} – F-test

Анализ изменчивости фрагмента $D-loop$ и гена $Cyt b$ мтДНК показал, что анализируемые временные популяции крапчатого суслика слабо дифференцированы и почти не различаются друг с другом. Выявленные различия затрагивают лишь перестройку гаплотипической структуры, что не отвергает возможности прохождения изученной популяцией *S. suslicus* «бутылочного горлышка». При этом более «чутким» для фиксации этой популяционной динамики оказался ген $Cyt b$, подверженный, по сравнению с C -регионом, действию отбора.

Анализ динамики генетической структуры временных состояний популяций крапчатого суслика по более эволюционно «быстрым» микросателлитным маркерам подтверждает полученные данные по мтДНК. Выявленные особенности микросателлитной генетической структуры модельных популяций крапчатого суслика указывают на факт прохождения популяциями состояния «бутылочного горлышка», который подтверждается изменением частотного соотношения аллелей. В результате происходит формирование обновленной генетиче-

ской структуры популяции, которая при участии мигрантов характеризуется появлением новых аллелей в популяции.

При сравнении полученных данных с результатами проведенного нами ранее изучения генетических особенностей популяций большого суслика в правобережных районах Поволжья в границах зоны симпатрии *S. major* и *S. suslicus* [28] отмечается сходный характер временной динамики генетической структуры популяций у обоих симпатрических видов. При этом у большого суслика, как наиболее экологического, пластичного и склонного к миграционной активности вида, популяционно-генетические процессы проходят сильнее и в более короткие сроки.

Таким образом, проведенные генетические исследования динамически меняющейся и надежно изолированной популяции крапчатого суслика выявили медленные перестройки ее структуры, которые указывают на низкую пла-

стичность вида и подверженность его депрессивным явлениям. Такая уязвимость крапчатого суслика к действиям внешних факторов объясняет его неблагоприятное состояние в пределах восточной части ареала и вымирание большого числа современных поселений. Поэтому изучение генетического состояния сохранившихся поселений этого вида является важным в рамках мероприятий по его охране. 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 представителей рода *Spermophilus* [29].

Список литературы

1. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. М. : Академкнига, 2003. 431 с.
2. Хендрик Ф. Генетика популяций. М. : Техносфера, 2003. 592 с.
3. Абрамсон Н. И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11, № 2. С. 307–331.
4. Frankham R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: review // Genetical Research. 1995. Vol. 66. P. 95–107.
5. Ohnishi S., Yasuda T., Kitamura S., Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells // 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 : 03.02.08. Пенза, 2013. 21 с.
7. Hanski I. Habitat connectivity, habitat continuity, and metapopulations in dynamic landscapes // Oikos. 1999. Vol. 87. P. 209–219.
8. Hanski I. Genetic structure of cougar populations Across the wyoming basin: metapopulation or megapopulation // Journal of Mammalogy. 2004. Vol. 85. P. 1207–1214.
9. Rousset F. Genetic structure and selection in subdivided population. Princeton : Princeton University Press, 2004. 288 p.
10. Ricanova S., Bryja J., Cosson J.-Fr. et al. Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: implications for conservation // Conserv Genet. 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. дисс. ... докт. биол. наук : 03.00.08. М. : 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. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.08. М. : МГУ, 2009. 24 с.
13. Красная книга Российской Федерации. Том «Животные». 2-е изд. М. : ВНИИ Экология, 2021. 1128 с.
14. Buchanan K., Burt de Perera T., Carere C. et al. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching // Anim. Behav. 2012. Vol. 83. P. 301–309.
15. Arrigi F. E., Bergendahl G., Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues // Exp. Cell. Res. 1968. № 50. P. 47–53.
16. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. URL: www.cshlpress.com
17. Ермаков О. А., Сурин В. Л., Титов С. В. [и др.]. Исследование гибридизации четырех видов сусликов Поволжья (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) разными молекулярно-генетическими методами // Генетика. 2002. Т. 38, № 7. С. 950–964.
18. Титов С. В., Кузьмин А. А., Наумов Р. В. [и др.]. Динамика ареалов и современное состояние поселений наземных беличьих в правобережных районах Поволжья : монография. Пенза : Изд-во ПГУ, 2015. 124 с.

19. Titov S. V., Batova O. N., Vasilieva N. A. et al. Development and characterization of new polymorphic microsatellite markers for Eurasian ground squirrel *Spermophilus fulvus* (Lichtenstein, 1823) // Russian Journal of Theriology. 2020. Vol. 19, № 2. P. 131–135. doi:10.15298/rusjtheriol.19.2.03
20. URL: <https://bioedit.software.informer.com>
21. Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic acids research. 2004. Vol. 32, № 5. P. 1792–1797.
22. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Molecular biology and evolution. 2016. Vol. 33, № 7. P. 1870–1874.
23. Leigh J., Bryant D., Steel M. PopART (Population Analysis with Reticulate Trees). 2015. URL: <http://popart.otago.ac.nz>
24. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.
25. Excoffier L., Lischer H. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. 1995–2015.
26. Pritchard J. K., Wen X., Falush D. Documentation for structure software: Version 2.3. 2010. 38 p.
27. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Molecular Ecology. 2005. Vol. 14. P. 2611–2620.
28. Титов С. В., Симаков М. Д., Чернышова О. В. [и др.]. Генетические особенности популяционной структуры большого суслика (*Spermophilus major* Pall.) в связи с динамикой населения во времени // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2020. Vol. 5 (4). С. 27–42. doi:10.21685/2500-0578-2020-4-3
29. Титов С. В., Кузьмин А. А., Симаков М. Д., Картавов Н. А. Новые данные о гибридизации крапчатого (*Spermophilus suslicus* Güld.) и большого (*Spermophilus major* Pall.) сусликов в широкой зоне симпатрии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2020. № 1. 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: Akademiya, 2003:431. (In Russ.)
2. Khendrik F. *Genetika populyatsiy* = Population genetics. Moscow: Tekhnosfera, 2003:592. (In Russ.)
3. Abramson N.I. Phylogeography: results, problems, prospects. *Vestnik VOGiS* = Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders. 2007;11(2):307–331. (In Russ.)
4. Frankham R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: review. *Genetical Research*. 1995;66:95–107.
5. Ohnishi S., Yasuda T., Kitamura S., Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells*. 2007;25:1166–1177.
6. Bakaeva S.S. *The current state of the population of the speckled ground squirrel (*Spermophilus suslicus* Güld.) in the eastern part of the range: metapopulation structure, biotopic confinement, genetic diversity*. PhD dissertation. Penza, 2013:21. (In Russ.)
7. Hanski I. Habitat connectivity, habitat continuity, and metapopulations in dynamic landscapes. *Oikos*. 1999;87:209–219.
8. Hanski I. Genetic structure of cougar populations Across the wyoming basin: metapopulation or megapopulation. *Journal of Mammalogy*. 2004;85:1207–1214.
9. Rousset F. *Genetic structure and selection in subdivided population*. Princeton: Princeton University Press, 2004:288.
10. Ricanova S., Bryja J., Cosson J.-Fr. et al. Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: implications for conservation. *Conserv Genet*. 2011;12(4):1–15. doi:10.1007/s10592-011-0213-1
11. Titov S.V. *Population and genetic mechanisms of interspecific hybridization of mammals (on the example of the genus *Spermophilus*)*. DSc abstract. Moscow: MGU, 2009:48. (In Russ.)
12. Kuz'min A.A. Zone of hybridization of large (*Spermophilus major* Pall., 1778) and speckled (*S. suslicus* Güld., 1770) ground squirrels: ecological, behavioral and genetic features. PhD abstract. Moscow: MGU, 2009:24. (In Russ.)
13. *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii. Tom "Zhivotnye". 2-e izd.* = Red Book of the Russian Federation. Volume "Animals". 2nd ed. Moscow: VNIi Ekologiya, 2021:1128. (In Russ.)
14. Buchanan K., Burt de Perera T., Carere C. et al. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Anim. Behav*. 2012;83:301–309.
15. Arrigi F.E., Bergendahl G., Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues. *Exp. Cell. Res*. 1968;(50):47–53.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Available at: www.cshlpress.com
17. Ermakov O.A., Surin V.L., Titov S.V. et al. Study of hybridization of four species of ground squirrels of the Volga region (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) by different molecular genetic methods. *Genetika* = Genetics. 2002;38(7):950–964. (In Russ.)

18. Titov S.V., Kuz'min A.A., Naumov R.V. et al. *Dinamika arealov i sovremennoe sostoyanie poseleniy nazemnykh belich'ikh v pravoberezhnykh rayonakh Povolzh'ya: monografiya* = Dynamics of ranges and the current state of settlements of ground squirrels in the right-bank regions of the Volga region: monograph. Penza: Izd-vo PGU, 2015:124. (In Russ.)
19. Titov S.V., Batova O.N., Vasilieva N.A. et al. Development and characterization of new polymorphic microsatellite markers for Eurasian ground squirrel *Spermophilus fulvus* (Lichtenstein, 1823). *Russian Journal of Theriology*. 2020;19(2):131–135. doi:10.15298/rusjtheriol.19.2.03
20. Available at: <https://bioedit.software.informer.com>
21. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 2004;32(5):1792–1797.
22. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*. 2016;33(7):1870–1874.
23. Leigh J., Bryant D., Steel M. *PopART (Population Analysis with Reticulate Trees)*. 2015. Available at: <http://popart.otago.ac.nz>
24. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451–1452.
25. Excoffier L., Lischer H. *An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis*. 1995–2015.
26. Pritchard J.K., Wen X., Falush D. *Documentation for structure software: Version 2.3*. 2010:38.
27. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14:2611–2620.
28. Titov S.V., Simakov M.D., Chernyshova O.V. et al. Genetic features of the population structure of the large ground squirrel (*Spermophilus major* Pall.) in connection with the dynamics of the population over time. *Russian Journal of Ecosystem Ecology = Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2020;5(4):27–42. (In Russ.). doi:10.21685/2500-0578-2020-4-3
29. Titov S.V., Kuz'min A.A., Simakov M.D., Kartavov N.A. New data on hybridization of speckled (*Spermophilus suslicus* Güld.) and large (*Spermophilus major* Pall.) ground squirrels in a wide zone of sympatry. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki* = University proceedings. Volga region. Natural Sciences. 2020;(1):23–35. (In Russ.). doi:10.21685/2307-9150-2020-1-3