

и кишечного иерсиниоза, сыворотками крови от больного ОКИ и здорового человека, с качественными пищевыми продуктами).

ЛИТЕРАТУРА

1. Загоскина Т.Ю., Балахонов С.В., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Субычева Е.Н., Чапоргина Е.А., Михайлов Е.П., Бодрых О.Б., Попова Ю.О. Апробация диагностических тест-систем с использованием наночастиц серебра в качестве маркеров специфических антител для скрининга исследуемого материала на наличие антигенов возбудителей чумы, бруцеллеза, туляремии и ботулотоксина в дот-иммуноанализе. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014, 4: 61-64.
2. Загоскина Т.Ю., Голубинский Е.П., Меринов С.П., Полтавченко А.Г., Марков Е.Ю. Современные подходы к конструированию диагностических тест-систем с использованием неорганических корпускулярных меток. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. 2004, 1 (2): 176-180.
3. Загоскина Т.Ю., Калиновский А.И., Марков Е.Ю., Докорина А.А., Голубинский Е.П. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного серебра, для выявления антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа. Клиническая лабораторная диагностика. 2002, 6: 38-39.
4. Загоскина Т.Ю., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Старикова О.А. Конструирование тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в дот-иммуноанализе. Журн. микробиол. 2017, 1: 55-61.
5. Картужанский А.Л., Красный-Адмони Л.В. Химия и физика фотографического процесса. Л., Химия, 1987.
6. Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Гриднева Л.Г., Михайлов Е.П. Применение дот-иммуноанализа для выявления антигенов чумного микроба в полевом материале. Проблемы особо опасных инфекций. 2014, 3: 69-71.
7. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. J. Immunol. Meth. 1987, 96 (2): 271-278.
8. Panfilova E., Shirokov A., Khebtsov B. et al. Multiplexed dot immunoassay using Ag nanocubes, Au/Ag alloy nanoparticles, and Au/Ag nanocages. Nano Research. 2012, 5 (2): 124-134.

Поступила 10.03.17

Контактная информация: Загоскина Татьяна Юрьевна, д.м.н., 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78, р.т. (3952)22-01-39

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*М.Л.Леденева¹, А.С.Водопьянов², Г.А.Ткаченко¹,
С.О.Водопьянов², С.С.Савченко¹, И.М.Шпак¹*

ВЫЯВЛЕНИЕ INDEL-МАРКЕРОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ДЛЯ ВНУТРИВИДОВОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

¹Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, ²Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт

Цель. Поиск потенциальных INDEL-маркеров в геномах штаммов Burkholderia pseudomallei, а также оценка возможности их использования для внутривидового генотипирования. *Материалы и методы.* Изучены полногеномные последовательности 25 штаммов B. pseudomallei с известными географическими регионами выделения из базы данных GenBank. Поиск INDEL-маркеров осуществляли с использованием авторского программного обеспечения GeneExpert. Кластерный анализ проводили с помощью генетической дистанции по R. Sokal и C. Michener и метода ближайшего связывания. *Результаты.* Выявлено 11 INDEL- маркеров, которые позволили разделить исследуемые штаммы на

13 генотипов. Определен спектр INDEL-паттернов, характерный для австралийских штаммов. Показана возможность существования определенных филогеографических паттернов тайландских изолятов. *Заключение.* Выявлена возможность INDEL-маркеров дифференцировать изоляты *B. pseudomallei* на две географические популяции (австралийского и юго-восточноазиатского происхождения), которая позволит определять источник вспышки мелиоидоза и пути распространения возбудителя.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 35—41

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, INDEL-маркеры, генотипирование

*M.L.Ledeneva*¹, *A.S.Vodopianov*², *G.A.Tkachenko*¹,
*S.O.Vodopianov*², *S.S.Savchenko*¹, *I.M.Shpak*¹

DETECTION OF INDEL-MARKERS IN GENOMES OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* STRAINS FOR INTRA-SPECIES GENOTYPING

¹Volgograd Research Institute for Plague Control, ²Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control, Russia

Aim. Search for potential INDEL-markers in genomes of *Burkholderia pseudomallei* strains, as well as evaluation of the possibility of their use for intra-species genotyping. *Materials and methods.* Full-genome sequences of 25 *B. pseudomallei* strains with known geographic regions of isolation from GenBank database were studied. INDEL-marker search was carried out using authors' program GeneExpert. Cluster analysis was carried out using genetic distance by R. Sokal and C. Michener and neighbor joining method. *Results.* 11 INDEL-markers were detected that allowed to split the studied strains into 13 genotypes. Spectrum of INDEL-patterns characteristic for Australian strains was determined. A possibility of existence of certain phylogeographic patterns of Thailand isolates is shown. *Conclusion.* A possibility of INDEL-markers to differentiate isolates of *B. pseudomallei* into 2 geographic populations (Australian and South-eastern Asia origin) that allows to determine the source of melioidosis outbreak and transmission routes of the pathogen is detected.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 35—41

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, INDEL-markers, genotyping

ВВЕДЕНИЕ

Возбудитель мелиоидоза — *Burkholderia pseudomallei* — естественный обитатель водных и почвенных биоценозов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии, а также ряда других тропических и субтропических регионов мира [9]. Регистрация случаев мелиоидоза в странах умеренного климатического пояса определяет возможности возникновения спорадических случаев этой инфекции в любом регионе мира [4, 6]. Возбудитель мелиоидоза в национальных системах классификации особо опасных бактериальных патогенов России, США и ряда европейских стран включен в список потенциальных агентов террористической угрозы [3]. В связи с этим, одним из наиболее важных вопросов, который необходимо решать всякий раз при возникновении вспышек мелиоидоза как естественного характера, так и связанных с возможными актами биотерроризма является вопрос о происхождении и путях распространения возбудителя. С этой целью используют методы генетического типирования, позволяющие осуществлять выявление степени сходства между штаммами микроорганизмов.

Одним из таких методов является молекулярное INDEL-типирование, в основе которого лежит феномен спонтанных вставок/делеций (insertion/deletion) нескольких нуклеотидов. Данный метод был успешно применен для

генотипирования как микроорганизмов [2, 7], так и человека [10]. Для филогенетического анализа штаммов *B. pseudomallei*, принадлежащих к одному сиквенс-типу, A. Sawana et al. впервые использовали комбинированный набор однонуклеотидных и INDEL-полиморфизмов [13]. Однако большинство выявленных в данном исследовании INDEL-маркеров было представлено локусами с тандемными повторами (VNTR — variable number tandem repeat). Высокий полиморфизм VNTR-локусов лежит в основе метода мультилокусного анализа числа вариабельных тандемных повторов MLVA (multiple-locus variable number tandem repeat analysis), являющегося эффективным для изучения микроэволюционных событий и исключения клонального характера вспышек. Однако подверженность VNTR-локусов гомоплазии исключает их использование для выявления филогенетического родства географически отдаленных штаммов.

Целью настоящей работы являлся поиск потенциальных INDEL-локусов с помощью компьютерного анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей штаммов *B. pseudomallei* и оценка возможности их использования в качестве маркеров генотипирования, позволяющих выявлять географическую приуроченность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись полногеномные последовательности 25 штаммов *B. pseudomallei* с известными географическими регионами выделения из базы данных Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>): 13 штаммов *B. pseudomallei* из Австралии (в скобках указан идентификационный номер) — MSHR491 (NZ_CP009485.1; NZ_CP009484.1), MSHR733 (KN323063.1; KN323064.1), PFGE_B T6 (KN150983.1; KN150984.1), TSV 48 (NZ_CP009161.1; NZ_CP009160.1), NAU35A-3 (NZ_CP004377.1; NZ_CP004378.1), BED (KN150913-KN150925), MSHR146 (NZ_CP004042.1; NZ_CP004043.1), NAU20B-16 (NZ_CP004003.1; NZ_CP004004.1), BEB (KN150858.1; KN150859.1), MSHR5848 (NZ_CP008909.1; NZ_CP008910.1), BDP (NZ_CP009209.1; NZ_CP009210.1), MSHR520 (NZ_CP004368.1; NZ_CP004369.1), NCTC 13178 (NZ_CP004001.1; NZ_CP004002.1); 7 штаммов *B. pseudomallei* из Таиланда — K96243 (NZ_CP009538; NZ_CP009537), 3921g (NZ_LK936442.1; NZ_LK936443.1), 406e (NZ_CP009298.1; NZ_CP009297.1), 576 (NZ_CP008777.1; NZ_CP008778.1), 1710b (NC_007434.1; NC_007435.1), 1026b (NC_017831.1; NC_017832.1), 1106a (NZ_CP008758.1; NZ_CP008759.1); 2 штамма из Малайзии — M1 (NZ_CP016638.1; NZ_CP016639.1), 982 (NZ_CP012576.1; NZ_CP012577.1); 2 штамма из Тайваня — vgh16R (NZ_CP012515.1; NZ_CP012516.1), vgh07 (NZ_CP010973.1; NZ_CP010974.1) и 1 штамм из Китая — BPC006 (NC_018527.1; NC_018529.1).

Поиск INDEL-маркеров проводили с использованием авторского программного обеспечения GeneExpert, написанного на языке Java. Подбор праймеров к найденным локусам осуществляли с помощью компьютерного моделирования полимеразной цепной реакции *in silico* [1]. Кластерный анализ выполняли методом ближайшего связывания (neighbor-joining) на основе коэффициента генетической дистанции по R. Sokal и C. Michener с помощью программы Treecon for Windows v.1.3b [11, 14]. Для оценки достоверности топологии полученной дендрограммы использовали бутстрэп-анализ (bootstrap analysis) для 1000 репликаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ геномов 25 штаммов *B. pseudomallei*, проведенный по каждому гену (или открытой рамке считывания) с использованием программы GeneExpert, позволил выявить ряд генов, отличающихся по длине у различных штаммов за счет вставок/делений. Для последующего изучения

нами были отобраны 11 таких локусов, к которым были сконструированы праймеры, фланкирующие области INDELs (табл. 1).

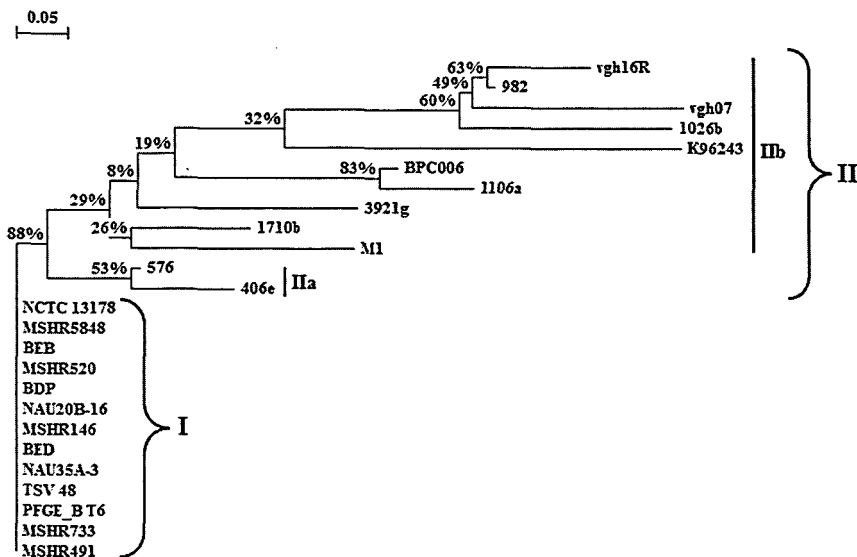
Установлено, что все выявленные локусы являлись вариабельными и со-держали по два аллельных варианта. Результаты INDEL-типирования 25

Таблица 1. INDEL-локусы, выявленные в геномах штаммов *Burkholderia pseudomallei* при проведе-нии компьютерного анализа

Локус	Кодируемый признак	Праймеры для проведения амплификации	Размеры аллелей (п.о.)
RS30420	ABC транспортер сульфоната (Sulfonate ABC transporter)	ATGACAACGACGCACTCG GAATTTCCACGCGAGCAC	114/102
RS22905	Субъединица SecA белка-транслоказы (Protein translocase subunit SecA)	GAGTTCAGCAGCCCGATT ATCGCGTGGCCAACCATCT	98/86
RS29185	Гипотетический белок (Hypothetical protein)	GCAGGCGCGTTTTCTCGT GGGCGGCGAAAATCATAGC	116/106
RS11930	Гипотетический белок (Hypothetical protein)	AAGTCGACGGCAGCTGAG ACGGATAGCGCTCGAACCG	153/141
RS23965	Белок MutL репарации ДНК (DNA mismatch repair protein MutL)	GTTCGGCCGCAAGGACAC CGGCATGGTCGCGTAGAG	127/118
RS12365	Гидролаза (Hydrolase)	GATCTCGCCTCCGATCTTGC CGGCGTGTGCGCATCGTC	81/75
RS07305	Ацилтрансфераза (Acyltransferase)	ATCTGGCCGATGCTTTC TGCGACACATGATCTCGAC	79/70
RS16330	Субстрат-связывающий катион ABC транспортера (Cation ABC transporter substrate-binding)	ACGCATGTTTTGCCTTGTT ATTTTGAGTGTGCGGTTCTG	153/135
RS26065	Субъединица С экзонуклеазы ABC (Excinuclease ABC subunit C)	CTCGCGGGCGATATCGAAG TCACGGTCTTCGCCTCAGTC	136/124
RS12945	Нерибосомальная пептид-синтетаза (Non-ribosomal peptide synthetase)	CCGAGGTCGAACCTGGGAAC GGCCCTGAACCCGACCTC	74/62
RS27835	Трансфераза (Transferase)	CCGTTACGCCGCAACCG CGAGATCTGCACGAATTGC	146/140

Таблица 2. Результаты INDEL-типирования штаммов *Burkholderia pseudomallei*

Штаммы	INDEL-спектры штаммов <i>B. pseudomallei</i> (размер ампликона, п.н.)											INDEL-генотип
	RS 30420	RS 22905	RS 29185	RS 11930	RS 23965	RS 12365	RS 07305	RS 16330	RS 26065	RS 12945	RS 27835	
MSHR491	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
MSHR733	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
PFGE_B T6	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
TSV 48	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
NAU35A-3	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
BED	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
MSHR146	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
NAU20B-16	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
BEB	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	G1
MSHR5848	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
BDP	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
MSHR520	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
NCTC 13178	114	98	116	153	118	75	79	153	136	62	146	
576	114	86	116	153	118	75	79	153	136	62	146	G2
406e	114	86	116	153	127	75	79	153	136	62	146	G3
K96243	114	98	116	141	127	81	70	135	124	62	146	G4
3921g	114	98	116	153	118	75	70	153	124	74	146	G5
1710b	114	98	116	153	118	75	70	153	136	62	140	G6
1026b	102	86	106	141	127	81	79	153	136	62	146	G7
1106a	102	98	106	153	127	75	79	153	136	74	146	G8
M1	114	98	116	153	127	75	79	153	124	62	140	G9
982	102	86	106	153	118	81	79	153	136	62	146	G10
vgh16R	102	86	106	153	118	81	79	153	136	62	140	G11
vgh07	102	86	106	153	118	81	70	135	136	62	146	G12
BPC006	102	98	106	153	118	75	79	153	136	74	146	G13



Дендрограмма, построенная на основе данных INDEL-типирования *B. pseudomallei*. Кластеры — римские цифры: I — австралийский кластер, II — юго-восточноазиатский кластер. В узлах дендрограммы показаны значения индексов бутстрепа.

штаммов *B. pseudomallei* по 11 локусам RS30420, RS22905, RS29185, RS11930, RS23965, RS12365, RS07305, RS16330, RS26065, RS12945 и RS27835 продемонстрировали наличие 13 генотипов (табл. 2).

В результате исследованные штаммы образовали два четко разделенных кластера: австралийский и юго-восточноазиатский (рис.). В первый кластер вошли 13 штаммов *B. pseudomallei* из различных регионов Австралии с одинаковым спектром аллелей INDEL-маркеров (INDEL-генотип G1). Второй кластер, включающий штаммы юго-восточноазиатского происхождения, представлен двумя субкластерами — IIa и IIb. Субкластер IIa содержал штаммы *B. pseudomallei* 576 (INDEL-генотип G2) и *B. pseudomallei* 406e (INDEL-генотип G3), географически приуроченные к территории Таиланда, с внутригрупповым коэффициентом генетической дистанции 0,091. Основу субкластера IIb также составили изоляты таиландского происхождения, сформировавшие отдельные группы со штаммами из Малайзии, Тайваня и Китая (INDEL-генотипы G4-G13). При попарном сравнении INDEL-спектров таиландских штаммов из субкластера IIb величина генетической дистанции варьировала от 0,273 до 0,818, такого же порядка дистанции были получены при сравнении этих штаммов с изолятами из Малайзии (0,182 — 0,727), Тайваня (0,364 — 0,636) и Китая (0,364 — 0,818). Исключением являлись штаммы *B. pseudomallei* 1106a и *B. pseudomallei* BPC006, коэффициент генетической дистанции между которыми составил 0,091. Средние значения попарных генетических расстояний между выявленными кластерами/субкластерами составили: 0,341 (пара I — II), 0,136 (пара I — IIa), 0,382 (пара I — IIb) и 0,409 (пара IIa — IIb).

Полученные результаты свидетельствовали о существовании определенного спектра INDELs, характерного для австралийских изолятов возбудителя мелиоидоза. Присутствие штаммов *B. pseudomallei*, приуроченных к территории Таиланда, во всех группах юго-восточноазиатского кластера свидетель-

ствуется о значительной генетической гетерогенности их популяции и затрудняет оценку эволюционных взаимоотношений при проверке достоверности данных с помощью бутстрэп-анализа, что выражается снижением бутстрэп-индексов от «предка к потомку». Вместе с тем, при анализе дендрограммы можно отметить, что штаммы *V. pseudomallei* 576, *V. pseudomallei* 406e и *V. pseudomallei* 1710b, обладающие соответствующими INDEL-генотипами G2, G3 и G6, возможно, имеют более раннее в эволюционном плане происхождение и способствовали формированию субкластеров IIa и IIb. При этом дивергенция генотипов данных штаммов от общего предка происходила по разным INDEL-локусам, что предполагает существование определенных филогеографических паттернов тайландских изолятов возбудителя мелиоидоза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Вид *V. pseudomallei* имеет длительную эволюционную историю, сопряженную с высокой скоростью рекомбинации по отношению к скорости мутаций и значительными темпами горизонтального переноса генов, способными приводить к гомоплазии [8, 12]. В связи с этим, для определения принадлежности штаммов *V. pseudomallei* к определенным филогенетическим линиям требуется использование генетических маркеров, полиморфизм которых минимизирует потенциальную возможность конвергентной эволюции. Поиск подобных локусов является насущной проблемой, решение которой позволит с большей степенью достоверности осуществлять выявление источника и региона происхождения вновь выделяемых штаммов *V. pseudomallei*. Очевиден и значительный теоретический интерес, поскольку генетические маркеры с низким уровнем гомоплазии позволяют выявлять основные пути формирования современных границ ареала возбудителя мелиоидоза, имевших место в период образования вида *V. pseudomallei*.

Несмотря на традиционное использование данных MLVA-типирования при расшифровке вспышек мелиоидоза, сложное и непредсказуемое эволюционное поведение снижают полезность VNTR-маркеров для выявления возможного географического региона происхождения изолятов *V. pseudomallei*. Если тандемные повторы изменчивы в числе копий и динамичны, то вставки/делеции нескольких нуклеотидов являются гораздо более стабильными элементами генома, что свидетельствует о перспективе их применения в филогенетическом аспекте. Кластеризация 25 штаммов *V. pseudomallei*, выявленная в ходе проведенного INDEL-типирования *in silico*, свидетельствует о потенциальной возможности разработки системы амплификационных маркеров, позволяющих учитывать географическую локализацию. Дендрограмма, построенная с использованием 11 INDEL-локусов, продемонстрировала наличие австралийского и юго-восточноазиатского кластера, включающего штаммы из Таиланда, Малайзии, Тайваня и Китая. Австралийский кластер, общей численностью 13 штаммов, обладал 100% гомологией INDEL-профилей. Тайландские штаммы характеризовались значительной генетической вариабельностью и вместе с изолятами из других географических регионов Юго-Восточной Азии сформировали гетерогенный кластер с коэффициентами генетической дистанции от 0,091 до 0,818. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными, которые свидетельствовали о более высоком уровне рекомбинации тайландских штаммов по сравнению с австралийскими изолятами [8].

Таким образом, выявленные INDEL-локусы подтверждают разделение изолятов *V. pseudomallei* на две географические популяции, соответствующие

штаммам из Австралии и Юго-Восточной Азии. Конструирование на основе изученных INDEL-маркеров амплификационных систем и их комбинирование с существующей 4-локусной схемой MLVA-типирования [5] позволит определять источник вспышки мелиоидоза и пути распространения возбудителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе неполных сиквентов ДНК-штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 г. ЗНиСО. 2013, 3: 28-30.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Зубкова Д.А., Ежова М.И. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. ЗНиСО. 2015, 5: 41-44.
3. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник РАМН. 2003, 3: 195-204.
4. Badran S., Pedersen T.I., Roed C. et al. Imported melioidosis in Danish travellers: a diagnostic challenge. *Scand. J. Infect. Dis.* 2010, 42: 445-449.
5. Currie B.J., Haslem A., Pearson T. et al. Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, 15: 169-174.
6. Hesstvedt L., Wilhelmsen M., Mengshoel A.G. et al. Two Norwegian patients with melioidosis presenting with bacteraemia and splenic and prostatic abscesses. *J. Travel. Med.* 2011, 18: 418-421.
7. Larsson P., Svensson K., Karlsson L. et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13: 1725-1732.
8. Liguori A.P., Warrington S.D., Ginther J.L. et al. Diversity of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in *Burkholderia pseudomallei* and its near-neighbors. *PLoS One.* 2011, 6: e29323.
9. Limmathurotsakul D., Golding N., Dance D.A. et al. Predicted global distribution of and burden of melioidosis. *Nat. Microbiol.* 2016, 1: 15008.
10. Oka K., Asari M., Omura T. et al. Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR. *Mol. Cell. Probes.* 2014, 28: 13-18.
11. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4: 406-425.
12. Santos E.P., Vinuesa P., Martínez-Aguilar L. et al. Phylogenetic analysis of *Burkholderia* species by multilocus sequence analysis. *Curr. Microbiol.* 2013, 67: 51-60.
13. Sawana A., Adeolu M., Gupta R.S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species. *Front. Genet.* 2014, 5: 1-22.
14. Sokal R.R., Michener C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin.* 1958, 38: 1409-1438.

Поступила 15.01.17

Контактная информация: Леденева Маргарита Леонтьевна,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)39-33-48