

УДК 575.86:599.322.2  
doi: 10.17223/19988591/20/13

**М.В. Цвирка, В.П. Кораблёв**

*Биолого-почвенный институт ДВО РАН (г. Владивосток)*

## **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ДЛИННОХВОСТОГО СУСЛИКА (*Spermophilus undulatus*) ПО ДАННЫМ RAPD-PCR-АНАЛИЗА**

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ДВО РАН (грант № 12-I-П6-02).

*Методом RAPD-PCR-анализа суммарной клеточной ДНК с использованием десяти произвольных олигонуклеотидных праймеров впервые проведено сравнение генетической изменчивости и выяснен уровень генетической дифференциации четырех подвидов длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus* (Pallas 1773), которые по аллозимным данным относятся к двум разобитным географическим формам – западной (*S. u. evermanni*) и восточной (*S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*, *S. u. jacutensis*). Идентифицированы 288 признаков, включая таксон-специфичные маркерные фрагменты для отдельных подвидов, а также для двух географических форм. Рассчитаны значения параметров генетического разнообразия и построены NJ-филогенетическая реконструкция и UPGMA-дендрограмма генетического сходства популяций. Показаны высокий уровень генетической дифференциации западной и восточной форм длиннохвостого суслика ( $D = 0,24–0,27$ ;  $p = 0,00$ ) и близость восточных подвидов между собой ( $D = 0,005–0,008$ ;  $p = 1,00$ ). Проведена таксономическая оценка их молекулярных различий.*

**Ключевые слова:** *Spermophilus undulatus*; RAPD-PCR-анализ; RAPD-маркеры; генетическая изменчивость; внутривидовая дифференциация; филогения.

### **Введение**

Длиннохвостый суслик *Spermophilus undulatus* (Pallas 1778) – политипический вид голарктического рода *Spermophilus* (F. Cuvier 1825), населяющий горные и предгорные районы Северо-восточной Азии (от Джунгарского Алатау до Приамурья и Якутии). Широкое географическое распространение обусловило значительную изменчивость фенотипических характеристик входящих в его состав форм. На основании морфологических и биоэкологических особенностей были выделены и описаны 6 современных подвидов длиннохвостого суслика: *S. undulatus undulatus* (Pallas 1778), *S. u. stramineus* (Obolensky 1927), *S. u. evermanni* (Brandt 1841), *S. u. intercedens* (Ognev 1937), *S. u. jacutensis* (Brandt 1843) и *S. u. menzbieri* (Ognev 1937) [1–3]. Получены обширные данные по географической изменчивости длиннохвостого

суслика по разным системам признаков: морфологическим [4–5] и аллозимным [6]. Показано, что подвиды, распространенные в западной части ареала (*S. u. stramineus*, *S. u. evermanni*), отличаются от подвидов из восточной части (*S. intercedens*, *S. u. menzbieri* и *S. u. jacutensis*), *S. u. undulatus* занимает промежуточное положение между ними. Степень различий между группами западных и восточных подвидов по разным данным достигает уровня полувидов [6] или видов [5].

С развитием и освоением новых молекулярных технологий существенно расширился спектр методов, привлекаемых, наряду с классическими морфологическим и биохимическим подходами, для решения таксономических проблем [7–9]. Одним из доступных методов является полимеразная цепная реакция (PCR) с использованием произвольных праймеров (RAPD – случайно амплифицированная полиморфная ДНК). С её помощью выявляется генетическая изменчивость по множеству независимых признаков, разбросанных по всему геному. Причем в последнее время было показано, что среди продуктов амплификации представлены все типы последовательностей ДНК. Благодаря считыванию информации с разных функциональных участков молекулы ДНК метод RAPD-PCR позволяет выявить «скрытую» генетическую изменчивость и более точно оценить полиморфизм по сравнению с аллозимным анализом [7]. Наряду с положительными сторонами метода существует ряд технически преодолимых сложностей и концептуальных ограничений, которые следует учитывать при работе [10–12]. Несмотря на известные недостатки метода, он остается популярным, успешно применяется в исследованиях систематики животных и наиболее адекватен для внутри- и межвидовых сравнений [13–15]. Перспективность использования RAPD-PCR-маркёров в сравнительных молекулярно-генетических, таксономических и филогенетических исследованиях палеарктических сусликов рода *Spermophilus* показана нами в предыдущих работах [16–20].

Цель настоящей работы – изучить генетическую изменчивость и внутривидовую дифференциацию длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus* с помощью метода полимеразной цепной реакции со случайными праймерами (RAPD-PCR). Использование характеристик ядерного генома позволит на более высоком уровне оценить масштаб географической изменчивости популяций длиннохвостого суслика, определить генетическую структуру и уточнить степень генетической дифференциации подвидов из разных частей ареала.

### Материалы и методики исследования

Материалом для данной работы послужили образцы тканей длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus*: *S. u. evermanni*, *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri* и *S. u. jacutensis* из экспедиционных сборов 1992, 2004–2005 гг., а также 1977–1982 гг., исследованные ранее морфометрическими и алло-

зимними методами (табл. 1, рис. 1). Для межвидовых парных сравнений в анализ включили образцы *S. parryi* (Richardson 1825) из того же подрода (*Urocitellus*), что и *S. undulatus*, а также *S. dauricus* (Brandt 1843) и *S. relictus* (Kaschkarov 1923), относящихся к другому подроду *Citellus*. В качестве внешней группы использовали азиатского бурундука *Tamias sibiricus* (Laxmann 1769).

ДНК исследуемых сусликов выделяли по стандартному методу фенольной депротенизации с использованием протеиназы К и последующим осаждением изопропиловым и этиловым спиртами [21] из свежемороженых и фиксированных в спирте печени и скелетных мышц.

Для анализа использовали 10 из 26 предварительно протестированных декамерных олигонуклеотидных праймеров, инициировавших синтез различных продуктов амплификации (OPA-02, OPC-02, OPC-05, OPC-09, OPC-10, OPC-12, OPC-16, OPC-20, OPD-05, OPE-20, «Operon Technologies Inc.», США). Во избежание методических ошибок предварительно проводили оптимизацию условий PCR-реакции с каждым праймером: уточняли активность Taq-полимеразы, подбирали оптимальную концентрацию ионов магния  $Mg^{2+}$  и количество ДНК-мишени.

Т а б л и ц а 1

## Характеристика использованного материала

№ места сбора	Вид / подвид	Число особей (n)	Место сбора
1	<i>S. undulatus intercedens</i>	4	РФ, Читинская обл., Ононский р-н, с. Верхний Цасучей (долина р. Онон)
2	-/-	1	Там же, Читинский р-н, станция «Новая» (60 км на восток от Читы)
3	<i>S. u. menzbieri</i>	6	РФ, Амурская обл., Михайловский р-н, окр. с. Безозёрное
4	<i>S. u. jacutensis</i>	6	РФ, Якутия, пос. Тулагино (22 км от Якутска)
5	<i>S. u. eversmanni</i>	1	РФ, Республика Алтай, Онгудайский р-н, пос. Онгудай
6	-/-	1	Там же, Онгудайский р-н, пос. Каракоп
7	<i>S. dauricus dauricus</i>	3	РФ, Читинская обл., Ононский р-н, пос. Усть-Ималка
8	-/-	3	РФ, Читинская обл., Ононский р-н, окр. пос. Усть-Ималка
9	-/-	6	Там же, окр. пос. Усть-Ималка, кордон «Булум»
10	<i>S. relictus relictus</i>	4	Узбекистан, Тянь-Шань, Кураминский хр., Ангренское плато, перевал Чапанкуйды
11	<i>S. parryi leucostictus</i>	3	РФ, Магаданская обл., Хасынский р-н, окр. пос. Атка

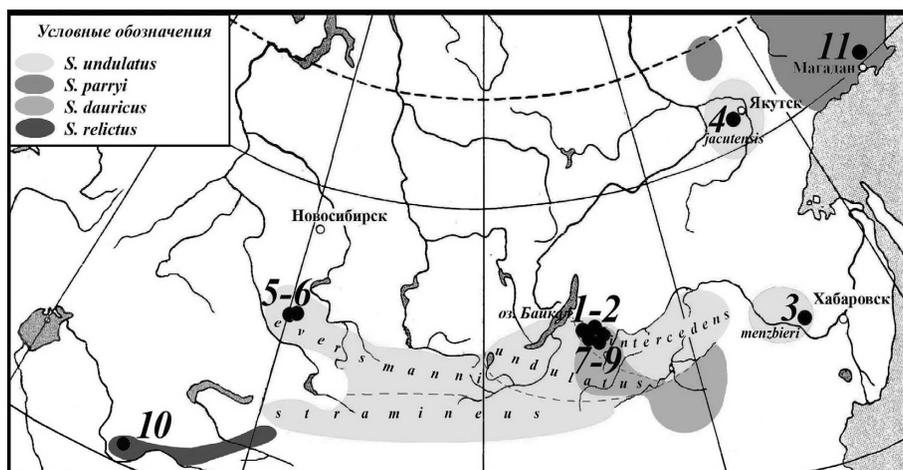


Рис. 1. Видовые ареалы сусликов и места сбора материала в соответствии с табл. 1

Для исключения артефактных полос вследствие образования вторичных структур в праймере или контаминации ставили контрольную пробу с полной амплификационной смесью без добавления ДНК. Воспроизводимость результатов амплификации (идентичность полос в спектрах) проверяли троекратно с праймерами OPC-02, OPC-16, OPD-05 и двукратно с каждым из остальных праймеров.

Полимеразную цепную реакцию (RAPD-PCR) проводили в амплификаторе «BioRad» (США) в следующих условиях: денатурация – 2 мин/94°C, затем 41 цикл: денатурация – 1 мин/94°C, отжиг – 30 сек/37°C, 15 сек/45°C, синтез – 2 мин/72°C. Стадию синтеза на конечном этапе проводили при 72°C в течение 6 мин. Реакционная смесь (25 мкл) содержала 60 нг тотальной ДНК, 1 × буфер (67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20, 0,01 М 2-меркаптоэтанол), по 0,2 мМ каждого dNTP, 25 пкмоль праймера, 1 ед. *Taq*-полимеразы.

Продукты амплификации разгоняли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1× ТВЕ-буфере, в течение 1–1,5 ч до полного разделения фрагментов. В качестве маркера молекулярной массы использовали рестрицированную *Pst* I ДНК фага лямбда ( $\lambda$ ) известного размера. Гели фотографировали в отраженном УФ-свете с помощью гель-документирующей системы «BioRad» (США).

Для статистической обработки результатов по электрофореграммам составляли бинарные матрицы «1 – 0» (присутствие – отсутствие фрагмента), учитывая все визуально выявляемые полосы. С помощью программ POP-GENE ver. 1.31 [22] и TFGA-ver. 1.3 [23] рассчитывали параметры генетической изменчивости и дифференциации популяций. Оценку генетической изменчивости проводили по числу полиморфных признаков ( $Np$ ), частоте

фрагментов ( $A$ ) и доле полиморфных фрагментов в отдельных ( $P$ ) и совокупной выборках ( $P_{об}$ ). Для оценки генетических различий между популяциями использовали индексы сходства  $I$  ( $I=2N_{ab}/(N_a+N_b)$ ), где  $N_a$  и  $N_b$  – числа амплифицированных фрагментов у образцов  $a$  и  $b$ ;  $N_{ab}$  – число фрагментов с одинаковой электрофоретической подвижностью), и межпопуляционные генетические дистанции  $D$  ( $D = -\ln I$ ) [24]. Также проводили точный тест на дифференциацию популяций [23]. Дендрограмма генетического сходства построена посредством невзвешенного парно-группового метода с арифметическим усреднением UPGMA [25]. Филогенетическая реконструкция выполнялась методом ближайшего связывания NJ с бутстрепными оценками степени надежности порядка ветвления [26].

### Результаты исследования и обсуждение

*Описание RAPD-профилей.* В суммарной выборке, включающей все исследованные виды, идентифицировано 288 признаков, в выборке *Spermophilus undulatus* – 141 признак. Число амплифицированных фрагментов в спектрах PCR-продуктов варьировало от 6 до 21. Молекулярный вес фрагментов находился в пределах от 250 пар нуклеотидов (пн) до 2150 пн.

RAPD-спектры продуктов амплификации, полученные с каждым из 10 исследованных праймеров, показали уникальный тип распределения амплифицированных фрагментов. Праймеры ОРА–02, ОРС–02, ОРС–05, ОРС–09, ОРС–12, ОРС–20, ОРД–05, ОРЕ–20 инициировали синтез полиморфных, а ОРС–10 и ОРС–16 – мономорфных профилей у особей длиннохвостого суслика *S. undulatus*. В целом выборки *S. undulatus* имели похожие спектры продуктов амплификации, отличаясь от других видов – *S. parryi*, *S. dauricus* и *S. relictus*. RAPD-профили особей трех восточных подвидов длиннохвостого суслика (*S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri* и *S. u. jacutensis*) оказались наиболее сходными между собой. Особи подвида *S. u. evermanni* отличались от них набором отдельных фрагментов, что позволяло их идентифицировать визуально (рис. 2, а–д). Так, *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri* и *S. u. jacutensis* имеют одни и те же фрагменты в спектрах PCR-продуктов ДНК (ОРА–02<sub>1159</sub>, ОРС–02<sub>790</sub>, ОРС–09<sub>1700</sub>, ОРС–09<sub>1230</sub>, ОРС–09<sub>301</sub>, ОРС–09<sub>253</sub>, ОРД–05<sub>1700</sub>), отсутствующие у *S. u. evermanni*. В свою очередь, последний подвид имеет наибольшее количество уникальных фрагментов (ОРА–02<sub>514</sub>, ОРС–09<sub>264</sub>, ОРД–05<sub>350</sub>, ОРЕ–20<sub>1700</sub>), отличающих его от трёх других подвидов длиннохвостого суслика. С помощью праймера ОРС–02 выявлены фрагменты, маркирующие подвиды *S. u. intercedens* (1843 пн) и *S. u. jacutensis* (2 100 пн) (рис. 2, б). Три праймера (ОРС–20, ОРД–05, ОРЕ–20) показали количественные различия между выборками (подвидами) длиннохвостого суслика, определяемые по яркости отдельных фрагментов. Так, *S. u. menzbieri* отличается от остальных подвидов яркостью фрагмента ОРЕ–20<sub>660</sub>, а *S. u. evermanni* – «мажорностью» фрагмента ОРЕ–20<sub>1260</sub>. Фрагменты ОРС–20<sub>920</sub>

(данные не приведены) и OPD-05<sub>1490</sub> наиболее ярки сразу у трех выборок из восточной части ареала – *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*, *S. u. jacutensis* (рис. 2, з, д).

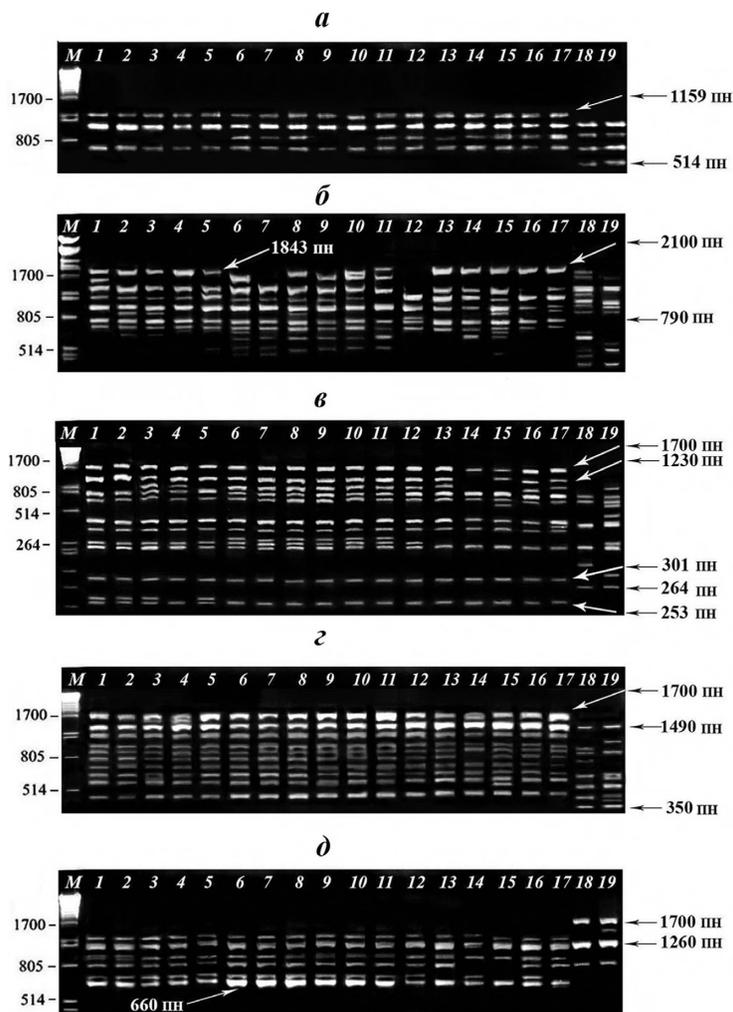


Рис. 2. RAPD-PCR-спектры сусликов: *Spermophilus undulatus intercedens* (дорожки 1–5), *S. u. menzbieri* (дорожки 6–11), *S. u. jacutensis* (дорожки 12–17) и *S. u. evermanni* (дорожки 18–19), инициированные праймерами ОРА-02 (а), ОРС-02 (б), ОРС-09 (в), OPD-05 (з) и ОРЕ-20 (д); М – маркер молекулярного веса (*Pst*I)

*Генетическая изменчивость и дифференциация.* В табл. 2 представлены параметры генетической изменчивости *Spermophilus undulatus*. Вследствие невысокой изменчивости RAPD-PCR-спектров выборки длиннохвостого

суслика имеют сходные значения частот фрагментов ( $A$ ). В целом по всем праймерам значения данного показателя изменяются в пределах 0,38–0,48. По отдельным праймерам разброс значений несколько шире, например 0,3–0,43 (ОРС–02), 0,36–0,63 (ОРС–16), 0,35–0,64 (ОРЕ–20). Наибольшие различия по частотам фрагментов (0,11–0,63) между всеми выборками длиннохвостого суслика *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*, *S. u. jacutensis*, *S. u. evermanni* выявлены с помощью праймера ОРС–09.

Таблица 2

Генетическая изменчивость *S. undulatus* Pallas, 1773,  
выявляемая с помощью десяти праймеров (141 признак)

Прай-мер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	$N/Nn$	$P_{об}$	$A/P$			
				<i>S. u. intercedens</i>	<i>S. u. menzbieri</i>	<i>S. u. jacutensis</i>	<i>S. u. evermanni</i>
ОРА–02	TGCCGAGCTG	6/4	0,67	0,5/0	0,61/0,83	0,67/0	0,67/0,33
ОРС–02	GTGAGGCGTC	21/21	1	0,31/0,1	0,36/0,48	0,3/0,38	0,43/0,43
ОРС–05	GATGACCGCC	20/16	0,8	0,56/0,15	0,5/0,15	0,66/0,35	0,38/0,05
ОРС–09	CTCACCGTCC	19/16	0,84	0,11/0,11	0,63/0	0,53/0,16	0,42/0,32
ОРС–10	TGTCTGGCTG	16/10	0,63	0,31/0,31	0,29/0,31	0,29/0,25	0,19/0,13
ОРС–12	TGTCATCCCC	20/7	0,35	0,32/0,25	0,11/0,1	0,21/0,25	0,13/0,05
ОРС–16	CACACTCCAG	14/3	0,21	0,47/0,07	0,63/0,07	0,44/0,5	0,36/0
ОРС–20	ACTTCGCCAC	19/19	1	0,35/0,32	0,42/0,21	0,26/0,21	0,5/0,16
ОРД–05	TGAGCGGACA	21/19	0,9	0,58/0,05	0,57/0	0,57/0,24	0,4/0,14
ОРЕ–20	AACGGTGACC	10/9	0,9	0,64/0,1	0,63/0,1	0,52/0,3	0,35/0,1
В целом по всем праймерам		16,6/13,6	0,82	0,42/0,15	0,48/0,23	0,45/0,27	0,38/0,17

Примечание.  $N$  – общее число признаков;  $Nn$  – число полиморфных признаков;  $A$  – частота фрагментов;  $P_{об}$  и  $P$  – доля полиморфных признаков в совокупной и в отдельных выборках соответственно.

Для выявления внутривидового полиморфизма наиболее эффективными оказались 6 праймеров: ОРС–02, ОРС–05, ОРС–09, ОРС–20, ОРД–05 и ОРЕ–20 ( $P_{об} = 0,79–1$ ). Самые низкополиморфные амплификанты были получены с помощью праймеров ОРС–12 и ОРС–16 ( $P_{об} = 0–21–0–35$ ). Среднее значение  $P_{об}$  для выборки *S. undulatus* в целом, рассчитанное по всем праймерам, составляет 0,82. С помощью показателя генетического полиморфизма ( $P$ ) мы также оценивали внутривидовую изменчивость разных подвидов длиннохвостого

суслика. Значения генетического полиморфизма, рассчитанные по всем праймерам, у подвидов *S. undulatus* в целом низки: близкие значения выявлены для *S. u. jacutensis* и *S. u. menzbieri* (0,27 и 0,23 соответственно), *S. u. evermanni* и *S. u. intercedens* (0,17 и 0,15 соответственно). Значения данного показателя, выявленные с помощью отдельных праймеров, внутри каждой выборки варьируют незначительно у *S. u. intercedens* (0–0,32), *S. u. jacutensis* (0–0,38) и *S. u. evermanni* (0–0,43), и более широко – у *S. u. menzbieri* (0–0,83).

Для выявления степени генетической дифференциации между подвидами длиннохвостого суслика и видами *S. parryi*, *S. dauricus* и *S. relictus* были рассчитаны коэффициенты генетических дистанций (*D*) и сходства (*I*) (табл. 3). Наименьшие значения *D* и, соответственно, наибольшие значения *I* обнаружены между двумя популяциями *S. u. intercedens* (0,04 и 0,96). Между подвидами длиннохвостого суслика коэффициенты генетических дистанций изменяются в широком диапазоне от 0,05 (*S. u. intercedens* – *S. u. menzbieri*) до 0,27 (*S. u. intercedens* – *S. u. evermanni*), т.е. различаются более чем в 5 раз, что свидетельствует о разной степени генетической дифференциации подвидов длиннохвостого суслика между собой. Наименьшие значения выявлены между подвидами из восточной части ареала, *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*, *S. u. jacutensis*, (0,05–0,08), наибольшие – между подвидом из западной части ареала (*S. u. evermanni*) с каждым из «восточных» подвидов (0,24–0,27). Значения генетических дистанций между популяциями видов одного подрода *Urocitellus* (*S. undulatus* – *S. parryi*) изменялись от 0,33 до 0,44, между видами разных подродов *Urocitellus* – *Citellus* (*S. undulatus* – *S. dauricus*, *S. undulatus* – *S. relictus*, *S. parryi* – *S. dauricus* и *S. parryi* – *S. relictus*) были выше: от 0,37 до 0,59.

Таблица 3

**Генетическое сходство (*I*, выше диагонали) и различия (*D*, ниже диагонали) популяций сусликов рода *Spermophilus* по 288 RAPD-признакам**

Виды <i>D/I</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>S. dauricus</i> (7)	–	0,96	0,96	0,61	0,58	0,61	0,66	0,64	0,66	0,64
2. <i>S. dauricus</i> (8)	0,04	–	0,95	0,61	0,57	0,60	0,64	0,63	0,66	0,62
3. <i>S. dauricus</i> (9)	0,04	0,05	–	0,58	0,55	0,58	0,62	0,62	0,65	0,63
4. <i>S. undulatus intercedens</i> (1)	0,49	0,50	0,54	–	0,96	0,95	0,95	0,77	0,66	0,66
5. <i>S. u. intercedens</i> (2)	0,54	0,56	0,59	0,04	–	0,93	0,92	0,77	0,64	0,64
6. <i>S. u. menzbieri</i> (3)	0,49	0,51	0,55	0,05	0,07	–	0,94	0,77	0,66	0,65
7. <i>S. u. jacutensis</i> (4)	0,42	0,44	0,47	0,06	0,08	0,06	–	0,79	0,68	0,69
8. <i>S. u. evermanni</i> (5)	0,45	0,47	0,48	0,26	0,27	0,26	0,24	–	0,69	0,72
9. <i>S. relictus</i> (10)	0,41	0,41	0,44	0,41	0,45	0,42	0,39	0,37	–	0,66
10. <i>S. parryi</i> (11)	0,45	0,47	0,46	0,40	0,44	0,43	0,37	0,33	0,41	–

Примечание. В скобках указано место сбора в соответствии с табл. 1.

Максимальные значения попарных генетических дистанций, рассчитанных для каждой пары сусликов по общим для них признакам (табл. 4), выявлены между *S. u. intercedens* – *S. u. evermanni*, *S. u. menzbieri* – *S. u. evermanni*, *S. u. jacutensis* – *S. u. evermanni* ( $D = 0,39-0,41$ ), минимальные – между *S. u. intercedens* – *S. u. menzbieri* ( $D = 0,06$ ). *S. u. intercedens* – *S. u. jacutensis* и *S. u. menzbieri* – *S. u. jacutensis* имеют средние значения данного параметра (0,26 и 0,24 соответственно). Генетические расстояния между двумя географическими формами длиннохвостого суслика (восточной и западной) равняется 0,48, между близкими видами *S. undulatus* и *S. parryi* – 0,53, *S. dauricus* и *S. relictus* – 0,88. Точный тест на дифференциацию с высокой достоверностью ( $p = 0,00$ ) различил две пары подвидов длиннохвостого суслика *S. u. menzbieri* – *S. u. evermanni* и *S. u. jacutensis* – *S. u. evermanni*, а также восточную – западную формы длиннохвостого суслика и пару видов *S. undulatus* – *S. parryi*.

Т а б л и ц а 4

Параметры генетической дифференциации исследованных выборок сусликов рода *Spermophilus*

Выборки		n	N	D	Точный тест (p)
<i>S. undulatus</i>	<i>intercedens</i> / <i>menzbieri</i>	10	138	0,06	1,00
	<i>menzbieri</i> / <i>jacutensis</i>	12	141	0,24	1,00
	<i>intercedens</i> / <i>jacutensis</i>	10	143	0,26	1,00
	<i>menzbieri</i> / <i>evermanni</i>	8	152	0,39	0,00
	<i>jacutensis</i> / <i>evermanni</i>	8	127	0,39	0,00
	<i>intercedens</i> / <i>evermanni</i>	6	157	0,41	1,00
	формы восточная / западная	19	141	0,48	0,00
<i>S. undulatus</i> / <i>S. parryi</i>		22	167	0,53	0,00
<i>S. dauricus</i> / <i>S. relictus</i>		16	158	0,88	1,00

На UPGMA-дендрограмме генетического сходства популяций, построенной на основании данных сходства и различия ( $I/D$ ), три подвида длиннохвостого суслика *Spermophilus undulatus* – *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*, *S. u. jacutensis* образовали единую группу, от которой последовательно отделены ветви *S. u. evermanni*, *S. parryi* и *S. relictus*. *S. dauricus* образовал самостоятельный кластер и значительно удален от трёх других видов. Внутри основного кластера генетическое расстояние между тремя подвидами *S. undulatus* неодинаково: *S. u. menzbieri* и *S. u. jacutensis* ближе друг к другу, чем к *S. u. intercedens*. Две популяции *S. u. intercedens* наиболее близки. Подвид *S. u. evermanni*, географически удаленный от других подвидов своего вида, высоко дифференцирован, а его ответвление от основного кластера произошло на уровне, близком к межвидовому узлу.

На NJ-филогенетической реконструкции наиболее близки между собой три восточных подвида длиннохвостого суслика – *S. u. intercedens*, *S. u. men-*

*zbieri* и *S. u. jacutensis*, западный подвид *S. u. evermanni* значительно удален от них и образует самостоятельный подкластер со 100%-ной бутстреп-поддержкой (рис. 3).

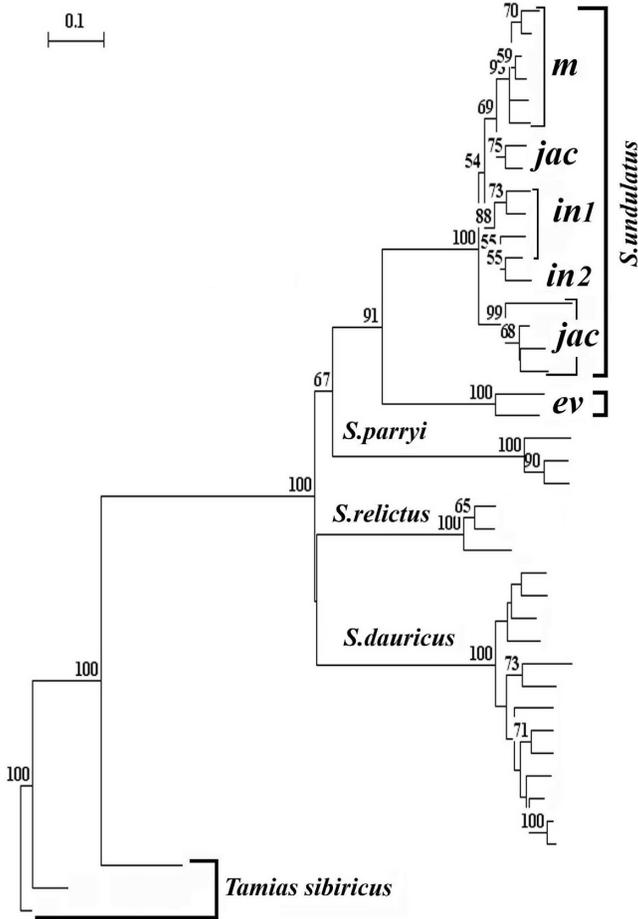


Рис. 3. Филогенетическая реконструкция (NJ) сусликов *Spermophilus undulatus intercedens* (*in1*, *in2*), *S. u. menzbieri* (*m*), *S. u. jacutensis* (*jac*), *S. u. evermanni* (*ev*), *S. parryi*, *S. dauricus* и *S. relictus*, полученная на основе 1 000 бутстреп-репликаций. Указаны значения бутстрепа выше 50%

Длиннохвостый суслик *Spermophilus undulatus* – сравнительно молодой вид голарктического подрода *Urocitellus*, предки которого мигрировали из Северной Америки и заселили Северо-восточную Азию в позднем плиоцене – раннем эполейстоцене [2, 27]. История расселения и становление ареала длиннохвостого суслика, основанные на хромосомных данных, подробно описаны Н.Н. Воронцовым и Е.А. Ляпуновой [28, 29]. Формирование ареала

и внутривидовая дифференциация *S. undulatus* шли под воздействием климатических изменений, происходивших в позднем плейстоцене. Многократные периодические похолодания способствовали распространению тундростепных биотопов – основному местообитанию длиннохвостого суслика, и широкому расселению данного вида в пределах Северной Евразии. Потепление и увлажнение климата в межледниковые периоды приводили к восстановлению лесистости, регрессу тундростепей, сокращению площадей открытых ландшафтов. Последствия этих изменений – деградация видового ареала, разобщение и исчезновение длиннохвостых сусликов с ряда занимаемых территорий (оптимальные условия для обитания сохранились в горах Алтая, Саян, в Юго-Восточной Сибири и на Дальнем Востоке) – способствовали независимому развитию популяций и накоплению генетических различий между ними.

В настоящее время длиннохвостый суслик распространен на значительной территории Северо-Восточной Азии: в Центральной Сибири и Дальнем Востоке России (от Алтая до Центральной Якутии и Приамурья), Казахстане, Монголии и северо-восточной части Китая. Современный ареал сильно фрагментирован. От основной его части, расположенной в Центральной Сибири и в основном имеющей сплошной характер, отделены множество мелких полуизолированных и изолированных участков в Восточной Сибири и два крупных обособленных участка в Якутии и Приамурье. Интенсивное заселение Сибири и Дальнего Востока, развитие промышленности и хозяйственное освоение земель в XX в. привели к сокращению ареала длиннохвостого суслика и частичному исчезновению этого вида с указанных территорий. В то же время строительство авто- и железнодорожных мостов и магистралей привело к расселению сусликов в местах, недоступных ранее [30]. К сожалению, на данный момент численность и динамика изменения ареала длиннохвостого суслика прослеживается лишь в отдельных регионах России [31–35], и полная картина нам неизвестна.

В современную эпоху процесс формообразования у длиннохвостого суслика продолжается [4–6]. Авторы цитируемых работ увязывали значительную изменчивость морфологических и аллозимных характеристик данного вида с палеогеологическими событиями и его современным географическим распространением, подчеркивая тем самым ведущую роль указанных факторов в микроэволюции данного вида. К этому следует добавить, что заметное влияние на характер генетической и морфологической изменчивости длиннохвостого суслика также оказывают особенности пространственно-этологической структуры популяций вида, динамика его расселения и адаптивные возможности.

У длиннохвостого суслика отмечены клинальный характер изменчивости морфометрических и морфотипических признаков и высокий уровень дифференциации между западными подвидами *S. u. evermanni*, *S. u. stramineus* и восточными *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*, *S. u. jacutensis* [4, 5, 36]. *S. u. undulatus* занимает промежуточное положение между группами за-

падных и восточных подвидов. Краевые подвиды различаются между собой не менее, чем разные виды *S. undulatus* и *S. parryi* [2, 5]. Прежде некоторые из них были описаны как самостоятельные виды [37, 38]. Кроме того, установлен высокий уровень морфологической дифференциации между восточными подвидами длиннохвостого суслика, в то время как дифференциация между западными подвидами между собой незначительна [4, 36]. Пространственная неравномерность морфологической дифференциации подтверждается иммунологическими данными [39] и особенностями строения зубной системы [40].

Исследования географической изменчивости и внутривидовой дифференциации *S. undulatus* на генетическом уровне были продолжены с помощью электрофоретического анализа водорастворимых белков [4, 6, 41]. В серии указанных работ на основе количественных различий по генетическим вариантам белков крови трансферрина и постальбумина установлены достоверные отличия длиннохвостых сусликов западной (*S. u. stramineus*, *S. u. evermanni*) и восточной (*S. u. jacutensis*, *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*) частей ареала. Кроме того, между ними выявлена гибридная зона, охватывающая большую часть ареала *S. u. undulatus* в Забайкалье [4, 6], которая, предположительно, образовалась вследствие вторичного контакта данных форм в ксеротермическую фазу четвертичного оледенения и свидетельствует о незавершенности расхождения исследованных внутривидовых форм. К сожалению, исследования сусликов из гибридной зоны не имели продолжения, что не позволило авторам корректно оценить таксономическую значимость их аллозимных отличий.

В настоящей работе были изучены только 4 подвида длиннохвостого суслика (*S. u. evermanni*, *S. u. intercedens*, *S. u. menzbieri*, *S. u. jacutensis*) из 6 ныне существующих [2, 3] и исследованных ранее с помощью аллозимного анализа [6]. Тем не менее их географическое распространение охватывает значительную российскую часть видового ареала, и это позволило получить представление о внутривидовой генетической дифференциации *S. undulatus* на основе RAPD-PCR-маркёров. RAPD-PCR-анализ длиннохвостых сусликов из различных участков ареала позволил отличить нам западную (в данной работе представленную одним подвидом, *S. u. evermanni*) и восточную (*S. u. intercedens*, *S. u. jacutensis*, *S. u. menzbieri*) формы. Восемь праймеров из десяти (кроме OPC-10 и OPC-16) инициировали амплификацию специфических фрагментов, с помощью которых легко идентифицировать особей этих форм на электрофореграммах. Все проведенные на основе этих данных анализы (распределение частот полиморфных признаков, оценка генетического полиморфизма и генетических дистанций, точный тест на дифференциацию популяций) также дискриминировали эти формы. Однако, несмотря на высокую генетическую дифференциацию данных пар, все же генетические дистанции между ними  $D = 0,24-0,27$  и  $D = 0,48$  (см. табл. 3 и 4 соответственно) ниже значений, обнаруженных при сравнении высокодифференци-

рованных видов подрода *Urocitellus*: *S. undulatus* – *S. parryi* ( $D = 0,33–0,44$  и  $D = 0,53$ ) и *Citellus*: *S. dauricus* – *S. relictus* ( $D = 0,41–0,44$  и  $D = 0,88$ ) [19, 42]. По результатам аллозимного анализа 14 белковых систем крови генетическая дифференциация западной и восточной форм длиннохвостого суслика ( $D = 0,187–0,192$ ) даже превышает таковую между парами близких видов *S. suslicus* – *S. odessanus*, *S. pygmaeus* – *S. musicus* и близка к наблюдаемой в надвидовой группе *major* [41, 43, 44]. По результатам сравнения последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК восточная и западная географические формы длиннохвостого суслика ( $D = 0,116$ ) различаются как высокодифференцированные виды *S. undulatus* – *S. parryi* ( $D = 0,134$ ) [45].

### Заключение

По нашим данным, подвиды *S. u. intercedens*, *S. u. jacutensis*, *S. u. menzbieri*, относящиеся к восточной форме, несмотря на пространственную географическую разобщенность, мало отличаются между собой. Высокое сходство RAPD-PCR-профилей, низкие генетические дистанции ( $D = 0,05–0,08$ ), результаты теста на генетическую однородность популяций ( $p = 1,00$ ) и их объединение на NJ-филогенетической реконструкции и UPGMA-дендрограмме генетического сходства мы склонны рассматривать как результат общности их происхождения. Близость подвидов восточной формы между собой поддерживается данными по цитогенетическому анализу сусликов из Читинской (*S. u. intercedens*) и Амурской областей (*S. u. menzbieri*), обладающих идентичными кариотипами [46]. Более тесные родственные связи сусликов «восточной» формы показаны также при сравнении генетических дистанций и полученных по результатам аллозимного анализа ( $D = 0–0,021$ ) [41] и сравнения последовательностей гена цитохрома b митохондриальной ДНК ( $D = 0,022–0,05$ ) [45].

Сравнение значений генетических дистанций, полученных по 288 RAPD-PCR-признакам для популяций (0,04), подвидов (0,05–0,08), географических форм (0,24–0,27) и видов подрода *Urocitellus* (0,33–0,44), показало существование хиатуса между каждым из перечисленных уровней дивергенции (табл. 3). Как видно из приведенных данных, разрыв между значениями двух последовательных уровней подвиды – географические формы более значителен (в среднем в 3 раза), чем между уровнями географические формы – виды (в среднем почти в 1,7 раза).

В целом, характер генетической дифференциации длиннохвостого суслика на молекулярном уровне согласуется с данными морфологического, морфометрического и аллозимного исследований о значительной степени отличий восточной и западной форм. Высокий уровень аллозимной и молекулярной дифференциации географических форм длиннохвостого суслика позволяет с равной долей обоснованности рассматривать их либо в качестве самостоятельных таксонов видового уровня в рамках надвида *S. undulatus*,

либо в рамках единого вида, обладающего максимальной внутривидовой географической изменчивостью. Для решения данного вопроса необходимо провести комплексное исследование гибридной зоны этих форм в Прибайкалье и западной части Забайкалья. В любом случае существующая структура палеарктического вида *Spermophilus undulatus* является результатом продолжающегося процесса видообразования, географические формы которого, по всей видимости, сформировались сравнительно недавно, во время последнего гляциального (ледникового) периода.

Авторы благодарят д-ра биол. наук, проф., зав. лабораторией цитогенетики Института биологии развития Е.А. Ляпунову и канд. биол. наук, старшего научного сотрудника лаборатории цитогенетики Института биологии развития (г. Москва) О.В. Брандлера за любезное предоставление образцов тканей реликтового и длиннохвостого сусликов, д-ра биол. наук, ведущего научного сотрудника Института геологии алмаза и благородных металлов СО РАН (г. Якутск) Г.Г. Боескорова и младшего научного сотрудника Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток) Ю.В. Татонову – за помощь в сборе и обработке материала.

### Литература

1. Громов И.М., Гуреев А.А., Новиков Г.А. и др. Млекопитающие фауны СССР. Ч. 1. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1963. 638 с.
2. Громов И.М., Бибиков Д.И., Калабухов Н.Н., Мейер М.Н. Фауна СССР. Млекопитающие. Наземные Белычьи (Marmotinae). М. ; Л. : Наука, 1965. Т. 3. Вып. 2. 468 с.
3. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб. : ЗИН РАН, 1995. С. 104–136.
4. Vorontsov N.N., Frisman L.V., Lyapunova E.A. et al. The effect of isolation on the morphological and genetical divergence of populations // *Genetica* (Neth). 1980. Vol. 52–53. P. 339–359.
5. Линецкая О.Н., Линецкий А.И. Видовые различия в характере краниометрической изменчивости у сусликов Восточной Палеарктики (подрод *Urocitellus*) // Современные подходы к изучению изменчивости. Владивосток : ДВО АН СССР, 1989. С. 99–105.
6. Фрисман Л.В., Воронцов Н.Н. Геногеографическая изменчивость длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* Pallas // Современные подходы к изучению изменчивости. Владивосток : ДВО АН СССР, 1989. С. 43–60.
7. Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // *Генетика*. 2002. Т. 38, № 9. С. 1173–1195.
8. Гречко В.В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // *Генетика*. 2002. Т. 38, № 8. С. 1013–1033.
9. Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution. N.Y. : Chapman and Hall, 1994. 511 p.
10. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и филогенетика млекопитающих // *Журнал общей биологии*. 2004. Т. 65, № 4. С. 278–305.
11. Lamboy W.F. Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: correcting for the effects of PCR artifacts caused by variation in experimental conditions // *Genome Research*. 1994. Vol. 4. P. 38–43.
12. Backeljau T., De Bruyn L., De Wolf H., et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods // *Cladistics*. 1995. Vol. 11, № 2. P. 119–130.

13. *Потапов С.Г., Васильев В.А., Самарина О.Г., Рысков А.П.* Молекулярно-генетическое маркирование геномов представителей рода *Phodopus* // Генетика. 1994. Т. 30, № 5. С. 615–621.
14. *Lavrenchenko L.A., Potapov S.G., Lebedev V.S., Ryskov A.P.* The phylogeny and systematics of the endemic Ethiopian *Lophuromys flavopunctatus* species complex based upon random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis // Biochemical Systematics and Ecology. 2001. Vol. 29, № 11. P. 1139–1151.
15. *Wasko A.P., Galletti P.M.* RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species // Hydrobiology. 2002. Vol. 474. P. 131–137.
16. *Цвирка М.В.* Генетическое разнообразие, филогенетические связи и систематика палеарктических сусликов рода *Spermophilus* (подроды *Citellus* и *Colobotis*) : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток : БПИ ДВО РАН, 2005. 24 с.
17. *Цвирка М.В., Корablёв В.П., Челомина Г.Н.* Генетическая дифференциация близких видов сусликов *Spermophilus musicus*, *S. pygmaeus*, *S. suslicus* (Rodentia, Sciuridae) // Материалы междунар. конф. «Систематика, филогения и палеонтология мелких млекопитающих». СПб. : ЗИН РАН, 2003. С. 228–230.
18. *Цвирка М.В., Челомина Г.Н., Корablёв В.П.* Генетическая дифференциация, филогенетика и систематика пустынных сусликов подрода *Colobotis* (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) // Зоологический журнал. 2006. Т. 86, № 5. С. 629–640.
19. *Цвирка М.В., Спиридонова Л.Н., Корablёв В.П.* Молекулярно-генетические связи некоторых восточно-палеарктических сусликов рода *Spermophilus* (Sciuridae, Rodentia) // Генетика. 2008. Т. 44, № 8. С. 1108–1116.
20. *Tsvirka M.V., Chelomina G.N., Korablev V.P.* Genetic differentiation between two Palearctic groups of Ground-Squirrels, Subgenera *Citellus* and *Colobotis* (*Spermophilus*, Sciuridae, Rodentia), based on RAPD-PCR assay // 1st European Ground Squirrel Meeting. Felsőtárkány. Hungary, 2006. P. 56.
21. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М. : Мир, 1984. 474 с.
22. *Yeh F.C., Boyle T.J.B.* Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits // Belgian Journal of Botany. 1997. Vol. 129. P. 157.
23. *Miller M.P.* Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author, 1997.
24. *Nei M.* Genetic distance between populations // American Naturalist. 1972. Vol. 106, № 949. P. 283–292.
25. *Sneath P.H.A., Sokal R.R.* Numerical Taxonomy. San Francisco : W.H. Freeman and Co., 1973. P. 442.
26. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution. 1987. Vol. 4. P. 406–425.
27. *Агаджанян А.К.* Этапы эволюции сусликов Северной Евразии // Бюллетень МОИП. Отд. Биол. 2006. Т. 111, вып. 5. С. 4–16.
28. *Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А.* Строение хромосом *Citellus undulatus* и история становления ареалов *C. undulatus* и *C. parryi* // Доклады АН СССР. 1969. Т. 187, № 1. С. 207–210.
29. *Ляпунова Е.А.* Видообразование и филогения некоторых видов млекопитающих на основе молекулярно-генетических подходов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М. : ИБР АН РФ, 2002. 60 с.
30. *Соломонов Н.Г., Ануфриев А.И., Седалищев В.Т.* О причинах снижения численности суслика *Citellus undulatus* в Якутии // Териофауна России и сопредельных территорий : матер. междунар. совещ. Москва ; Тула : ИПИ «Гриф и К», 2003. С. 334–335.

31. Попков А.Ф., Чипанин Е.В. Эколого-фенетические исследования основных носителей чумы в сибирских природных очагах // Териофауна России и сопредельных территорий : матер. междунар. совещ. Москва ; Тула : ИПП «Гриф и К», 2003. С. 272–273.
32. Попов В.В., Вержуцкий Д.Б., Ткаченко В.А. Миграционная активность длиннохвостого суслика при низкой численности // Териофауна России и сопредельных территорий : матер. междунар. совещ. Москва ; Тула : ИПП «Гриф и К», 2003. С. 273–274.
33. Винокуров В.Н. Численность и изменения ареалов длиннохвостых сусликов Якутии // Суслики Евразии (роды *Spermophilus*, *Spermophilopsis*): происхождение, систематика, экология, сохранение видового разнообразия : мат-лы рос. науч. конф. М. : КМК, 2005. С. 24–25.
34. Минаков И.А., Смирнов М.Н., Никитенко Б.В. Распространение и численность длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus* Pall.) в Красноярском крае // Суслики Евразии (роды *Spermophilus*, *Spermophilopsis*): происхождение, систематика, экология, сохранение видового разнообразия : мат-лы рос. научн. конф. М. : КМК, 2005. С. 63–65.
35. Скалон Н.В., Гагина Т.Н., Сергеев В.Е. Ареологические особенности и современное состояние популяций краснощекого и длиннохвостого сусликов в Кемеровской области // Суслики Евразии (роды *Spermophilus*, *Spermophilopsis*): происхождение, систематика, экология, сохранение видового разнообразия : мат-лы рос. научн. конф. М. : КМК, 2005. С. 96–98.
36. Воронцов Н.Н., Межова О.Н. Клинальный характер изменчивости морфометрических признаков у *Citellus undulatus* – вида с дизъюнктивным ареалом // Зоологический журнал. 1982. Т. 61, № 10. С. 1697–1703.
37. Оболенский С.И. Предварительный обзор палеарктических сусликов (q.q. *Citellus* и *Spermophilopsis*) // Доклады АН СССР. 1927. С. 188–193.
38. Пляттер-Плохоцкий К.А. Вредные и полезные животные в сельском хозяйстве ДВК. Хабаровск : Дальгиз, 1934. 143 с.
39. Воронцов Н.Н., Жолнеровская Е.Н., Баранов О.К. Иммуносистематика сусликов Палеарктики (*Citellus*, Sciuridae, Rodentia). Серологическая дифференциация сусликов Палеарктики и подродовое членение рода // Зоологический журнал. 1981. Т. 60. С. 1070–1077.
40. Попков А.Ф. Внутривидовая изменчивость эколого-физиологических признаков сибирского длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* Pallas : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток : БПИ ДВНЦ АН СССР, 1978. 159 с.
41. Крюков А.П., Шереметьева И.Н., Картавцева И.В. и др. Генетические исследования ресурсных видов наземных позвоночных Российского Дальнего Востока // «Биологические ресурсы Дальнего Востока России: комплексный региональный проект ДВО РАН» / под ред. Ю.Н. Журавлёва. М. : КМК, 2007. С. 271–294.
42. Цвирка М.В. Молекулярно-генетические связи восточно-палеарктических сусликов рода *Spermophilus* (Sciuridae, Rodentia) // Териофауна России и сопредельных территорий (VIII съезд ТО). М. : КМК, 2007. С. 535.
43. Кораблев В.П., Фрисман Л.В., Цвирка М.В. и др. Цитологическое и аллозимное исследование сусликов группы «таюг» (*Spermophilus*, Sciuridae, Rodentia) // Проблемы эволюции. Владивосток : Дальнаука, 2003. Т. 5. С. 151–166.
44. Frisman L., Korablev V., Tsvirka M. et al. Genetic differentiation of ground squirrels (*Spermophilus*, Sciuridae, Rodentia) in major-erythrocytogenys-pallidicauda species group // Evolution, genetics, ecology and biodiversity: international conference. Vladivostok, 2001. P. 59.
45. Tsvirka M., Korablev V., Pang J. Genetic differentiation and systematics of long-tailed ground squirrels *Spermophilus undulatus* Pallas, 1773 (Rodentia, Sciuridae) based on the molecular genetics analysis // Modern Achievements in Population, Evolutionary, and Ecological Genetics: International Symposium. Vladivostok, 2009. P. 48.

46. Корablёв В.П. Цитогенетическое изучение изменчивости гетерохроматина и районов ядрышкового организатора у сусликов фауны СССР : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. : ИБР АН СССР, 1989. 26 с.

Поступила в редакцию 21.09.2012 г.

*Tomsk State University Journal of Biology. 2012. № 4 (20). P. 145–161*

doi: 10.17223/19988591/20/13

**Marina V. Tsvirka, Vladimir P. Korablev**

*Institute of Biology and Soil Science of Far Eastern Branch of the  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok (Russia)*

### **GENETIC VARIABILITY AND DIFFERENTIATION OF LONG-TAILED GROUND SQUIRREL (*Spermophilus undulatus*) BASED ON RAPD-PCR ANALYSIS**

*The manuscript of Tsvirka M.V. and Korablev V.P. «Genetic variability and differentiation of long-tailed ground squirrel (*Spermophilus undulatus*) based on RAPD-PCR analysis» devoted to clarify the intraspecific taxonomy using the methods of molecular genetics. The study contributes to the processes of microevolution and speciation in Mammals, and studies of biodiversity in Siberia and Russian Far East.*

*Long-tailed ground squirrel *Spermophilus undulatus* (Pallas 1778) is the polytypic species of Holarctic genus *Spermophilus* (F. Cuvier 1825). It is distribute in the mountainous and foothill regions of the North-East Asia (from the Tien Shan to the Amur region and Yakutia). Wide geographical spread caused the considerable variability of phenotypic characteristics of its component forms. Six subspecies of modern long-tailed ground squirrel: *S. undulatus undulatus* (Pallas 1778); *S. u. stramineus* (Obolensky 1927); *S. u. eversmanni* (Brandt 1841); *S. u. intercedens* (Ognev 1937); *S. u. jacutensis* (Brandt 1843); *S. u. menzbieri* (Ognev 1937) (Gromov et al, 1963; Gromov et al, 1965; Gromov, Erbaeva, 1995) were described on the basis of bio-ecological and morphological features. Despite of this fact the intraspecific systematics of *S. undulatus* based on classical morphological data is controversial and requires confirmation with using modern molecular genetic techniques.*

*To clarify the intraspecific taxonomy of *S. undulatus* comparison of genetic polymorphism of four subspecies (*S. u. intercedens*, *S. u. eversmanni*, *S. u. menzbieri* and *S. u. jacutensis*) by RAPD-PCR analysis of total cellular DNA using ten arbitrary oligonucleotide primers. For the first time identified features showing significant differences between “western” and “eastern” forms, as well as taxon-specific marker fragments for individual subspecies. The values of the parameters of genetic diversity and phylogenetic NJ-tree and UPGMA-dendrogram of genetic similarity of populations were obtained. High level of genetic differentiation between the “western” and “eastern” forms of long-tailed ground squirrel ( $D = 0.24–0.27$ ,  $p = 0.00$ ) and the proximity of the eastern subspecies of each to other ( $D = 0.005–0.008$ ,  $p = 1.00$ ) were showed. The obtained results allow to consider the validity of an equal share of two long-tailed ground squirrel geographical forms, either as separate taxa within the species level *nadvida S. undulatus*, or within a single species, which has a maximum intraspecific geographical variability.*

**Key words:** *Spermophilus undulatus*; RAPD-PCR analysis; RAPD-markers; genetic variability; intraspecific differentiation; phylogeny.

Received September 21, 2012