

УДК [598.115.33:575.22](570.4)

**АСПЕКТЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ
И ТЕХНОЛОГИЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ГАДЮКОВЫХ ЗМЕЙ (REPTILIA: VIPERIDAE, VIPERA)
В ПОВОЛЖЬЕ НА ОСНОВЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ**

Р.В. Ефимов¹, Е.В. Завьялов¹, В.Г. Табачишин²

¹ *Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83
E-mail: zavialov@info.sgu.ru*

² *Саратовский филиал Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Россия, 410028, Саратов, Рабочая, 24
E-mail: hrustovav@forpost.ru*

Поступила в редакцию 24.02.08 г.

Аспекты экологической сегрегации и технология видовой идентификации гадюковых змей (Reptilia: Viperidae, *Vipera*) в Поволжье на основе генотипирования. – Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Табачишин В.Г. – Рассматриваются экологические факторы, определяющие распространение и участвующие в формировании эпигенетического ландшафта географических популяций гадюк (*Vipera nikolskii* и *Vipera berus*). Показано, что область распространения *V. nikolskii* в Поволжье простирается в волжской долине на север до нижней зоны Саратовского водохранилища (южнее г. Хвалынска Саратовской области); в западном направлении граница ареала проходит по территории южных административных районов Пензенской области; волжская долина является восточным пределом распространения вида.

Ключевые слова: *Vipera nikolskii*, *Vipera berus*, генетическая структура, распространение, граница ареала.

Aspects of ecological segregation and technology of specific identification of viper snakes (Reptilia: Viperidae, *Vipera*) in Volga region by genotyping. – Yefimov R.V., Zavialov E.V., Tabachishin V.G. – Ecological factors determining the distribution and participation in the formation of epigenetic landscape of geographical populations of *Vipera nikolskii* and *V. berus* are considered. The habitat of *V. nikolskii* in the Volga region is shown to reach north in the Volga valley to the lower zone of the Saratov reservoir (southward of Khvalynsk City, Saratov region); in western direction the habitat border passes through the territory of several southern districts of the Penza region, the Volga valley being the eastern limit of the habitat.

Key words: *Vipera nikolskii*, *Vipera berus*, genetic structure, distribution, habitat border.

Гадюка Никольского (*Vipera nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva, 1986), обитающая в лесостепной и северной части степной зон Восточной Европы, относится к видам, чей таксономический статус на протяжении длительного времени носит дискуссионный характер. Так, некоторые авторы выделяют гадюку Никольского в качестве самостоятельного вида, а другие рассматривают на уровне подвида обыкновенной гадюки или включают ее в состав комплекса «*Vipera berus*» в качестве черной морфы (Ананьева и др., 1998, 2004; Бакиев и др., 2004; Великов и др., 2006; Кузьмин, Семенов, 2006; Joger et al., 2003; Bakiev et al., 2005; Milto, Zinenko, 2005).

Использование только морфологических, экологических и кариологических методов не позволяет дать однозначные ответы на поставленные вопросы (Табачишин и др., 2002; Бакиев и др., 2004; Завьялов и др., 2006). В связи с этим на современном этапе большое значение приобретают эколого-таксономические приемы и подходы, основанные на анализе молекул ДНК, позволяющие уточнить таксономический статус некоторых видов гадюковых змей, а также значительно приблизиться к пониманию процессов и явлений их морфологической изменчивости под воздействием комплекса абиотических факторов среды. Это является особенно актуальным для Поволжья, поскольку *V. nikolskii* внесена в Красную книгу РФ (Божанский, 2001), а также региональные Красные книги субъектов Федерации (Шляхтин и др., 2006).

В настоящее время сведения о состоянии популяции *V. nikolskii* в Поволжье ограничены: не известен таксономический статус окраинных поселений вида, поэтому с приемлемой точностью не выявлены границы распространения змей. Кроме того, отсутствуют достоверные данные о возможности гибридизации *V. nikolskii* с *V. berus* в природе и их экологической сегрегации в зонах симпатрического обитания, а также не разработаны методы оперативной диагностики видовой принадлежности гадюк в природе и лабораторных условиях.

Изучение биотопической приуроченности гадюк основано на данных полевых исследований, проведенных в весенне-летний период 2003 – 2007 гг. в пределах Саратовской области и на сопредельных территориях. Кроме того, исследовались коллекционные материалы зоологического музея Саратовского государственного университета (ЗМ СГУ) и Зоологического института РАН (ЗИН РАН) (таблица). В качестве материала использовали заспиртованные образцы печени гадюк. Тотальную ДНК из них выделяли по методике (Sambrook et al., 1989), традиционно применяемой в отношении рептилий. Тотальную ДНК из крови извлекали с использованием набора «Diatom Prep 100» (ГенЛаб) в соответствии с методикой фирмы изготовителя.

Географическая и количественная характеристика сборов гадюк, использованных в анализе

№	Код	Место сбора	Вид	Кол-во	Источник
1	Sar	Саратовская область	<i>V. nikolskii</i>	23	ЗМ СГУ, ЗИН РАН
2	Sam	Самарская область	<i>V. nikolskii?</i>	15	То же
3	Chuv	Республика Чувашия	<i>V. berus</i>	5	«
4	Pen	Пензенская область	То же	3	ЗМ СГУ
5	Mor	Республика Мордовия	«	7	То же
6	Per	Пермский край	«	7	ЗИН РАН
7	Udm	Республика Удмуртия	«	6	То же
8	Tul	Тульская область	«	9	«
9	Nov	Новгородская область	«	5	«
10	Vol	Волгоградская область	<i>V. renardi</i>	2	ЗМ СГУ

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали олигонуклеотидные праймеры, подобранные по нуклеотидным последовательностям, имеющимся в базе данных Genbank (Франция). Секвенирование очищенных двухцепочечных ПЦР продуктов митохондриальных генов проводили по методу Сенгера

(Sanger et al., 1977). Электрофоретическое разделение продуктов секвенирующей реакции осуществляли с помощью автоматического 8-капиллярного ДНК-секвенатора SEQ 2000XL (Bekman Coulter). Для выравнивания секвенированных нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов применяли программы Clustal W и BioEdit Sequence Alignment Editor. Для диагностики видов и определения генетической структуры популяций использовали микросателлитный локус 7–87. Для построения дендрограмм применяли пакет прикладных программ MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura et al., 2007).

Выявлено, что большинство «саратовских» образцов имели в своем составе аллель размером 152 п.н. Он является высокоспецифичным для *V. nikolskii*. В то же время практически все экземпляры *V. berus* содержали аллели размером от 176 до 192 п.н. Нельзя не отметить и тот факт, что некоторые экземпляры из Тульской области и Республики Мордовия содержали аллель 152 п.н., характерный для *V. nikolskii* из Саратовской области. Вероятно, данное явление возникает в результате симпатрического обитания и гибридизации между гадюкой Никольского и обыкновенной гадюкой. Это свидетельствует о высоких адаптивных возможностях *V. nikolskii*, которая в условиях внутривековой динамики климата проявляет тенденцию к расселению на север (рис. 1). В отношении изучаемых гадюк из Пермского края, республик Чувашии, Мордовии и Удмуртии выявлено разнообразие аллелей по микросателлитному локусу 7–87. При этом отмечена тенденция увеличения длины аллелей в направлении от Республики Мордовия до Пермского края.

Вероятно, данное явление определяется градиентом экологических условий при смене природных зон: от широколиственных лесов (республики Мордовия и Чувашия) к подтаежным лесам (Республика Удмуртия) и тайге (Пермский край). Кроме того, гадюки с указанных территорий проявляют высокий уровень генетического полиморфизма по сравнению с гадюками из Самарской, Пензенской и Новгородской областей. Это может быть обусловлено значительной амплитудой абиотических факторов, когда при продвижении в пределах ареала гадюковых змей в восточном направлении от Республики Мордовия до Пермского края существенно снижается среднегодовая температура воздуха (от +3.0 до +1.9°C) и повышается среднегодовое количество осадков (от 450 до 600 мм).

Если принять во внимание результаты, полученные при анализе нуклеотидных последовательностей и микросателлитного локуса, то появляется возможность создать гипотетическую модель расселения и формирования современного ареала изучаемых гадюк (см. рис. 1). В четвертичный период, который оказал максимальное влияние на формирование видовой структуры рептилий (Калябина-Хауф и др., 2004), основные колебания климата были приурочены к среднему плейстоцену (700 тыс. лет назад), когда происходило продвижение ледников на юг с цикличностью приблизительно 100 тыс. лет. Принимая во внимание гипотезу о стабильной скорости эволюции митохондриальной ДНК (2.5% на 1 млн лет) (Калябина-Хауф и др., 2004; Wilson et al., 1985; Kocher et al., 1989), можно предположить, что дивергенция гадюк Никольского и обыкновенной происходила во временном интервале около 700 – 750 тыс. лет назад (1.8%). В данной связи можно предположить, что в ходе генезиса герпетофауны гадюка Никольского заняла территорию лесостепной зоны южнее 52 – 54° с.ш., а обыкновенная – зону широколи-

ственных лесов, а затем проникала далее на север и восток. Так как последний из указанных видов находился в условиях циклически глобально изменяющегося климата (смена ледниковых и межледниковых периодов), у него происходило постепенное увеличение длины аллелей микросателлитного локуса, что в последующем привело к проявлению клинальной изменчивости по данному признаку. Напротив, гадюка Никольского в пределах продолжительного промежутка времени эволюционировала в относительно стабильных экологических условиях, что подтверждается наличием у нее коротких аллелей микросателлитного локуса.

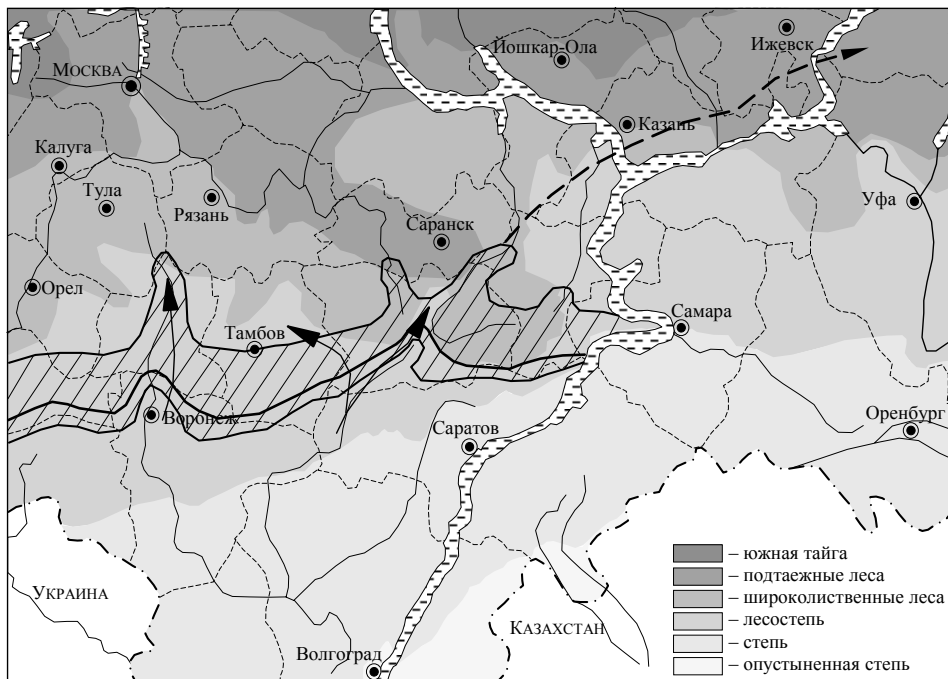


Рис. 1. Гипотетическая схема распространения, динамики границ ареала и направления генетической изменчивости гадюковых змей: — — предполагаемая (на основе генетических исследований) северная граница распространения гадюки Никольского; ↗ — направление расселения гадюки Никольского; ▨ — зона вероятной гибридизации (*V. berus* × *V. nikolskii*); - - - - межпопуляционная клинальная изменчивость в пределах ареала обыкновенной гадюки (направление увеличения длины аллелей)

Дивергенция и экологическая сегрегация *V. nikolskii* и *V. berus* продолжалась и в голоценовый период, о чем свидетельствует анализ митохондриальной ДНК (Ефимов и др., 2007). В основе механизмов адаптации и дифференциации указанных видов в зонах симпатрического обитания предположительно лежит биотопическая приуроченность. Гадюка Никольского в своем распространении в изучаемом регионе связана с пойменными ландшафтами долин малых рек Волжского и Донского бассейнов; она избегает остепненные целинные участки и агроценозы,

АСПЕКТЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ

крайне редко встречается на водораздельных пространствах (Табачишин и др., 2003). Обыкновенная гадюка предпочитает смешанные леса с полянами, болота на водоразделах и в долинах рек. Однако, несмотря на наличие экологической сегрегации, в зонах симпатрического обитания отмечаются особи, характеризующиеся признаками гибридогенного характера (по результатам анализа микросателлитного локуса). Данное обстоятельство свидетельствует о возможности гибридизации между *V. nikolskii* и *V. berus* в ситуациях, когда экологические ниши видов хоть и незначительно перекрываются в пространственном отношении, а также в ходе расселения рептилий.

Идентификацию гадюк, таксономическое положение которых затруднено на основе морфологических и биохимических характеристик, осуществляли методом генотипирования. При конструировании олигонуклеотидных праймеров для аллель-специфичной ПЦР нуклеотидная замена вводилась во второе положение на 3'-конце. При этом для оптимизации условий аллель-специфичной ПЦР были взяты две подряд располагающиеся нуклеотидные замены. В результате были подобраны следующие олигонуклеотидные праймеры для проведения аллель-специфичной ПЦР: 1.1 5'-GGGTTACACCTCGACCTGAC-3', 1.2 5'-GGGTTACACCTCGACCTGTC-3', 2.1 5'-TATGTAGCTCACTTTGTACCGT-3', 2.2 5'-TATGTAGCTCACTTTGTACCAC-3'. В качестве положительного контроля использовались праймеры для амплификации полного фрагмента гена 12S рРНК: 5'-СТСААААСАГТГАСАСАСС-3', 5'-GGTGTGTACGCTCTTCATTGC-3'.

Олигонуклеотидные праймеры 1.1 и 1.2 не позволили идентифицировать гадюк, так как амплификация для обоих праймеров происходила и у *V. nikolskii* и у *V. berus*. Данные результаты, вероятно, связаны с низкой специфичностью праймеров, имеющих в своем составе всего одну нуклеотидную замену. Олигонуклеотидный праймер 2.1 дал положительные результаты проверки, в результате чего были получены продукты амплификации для *V. nikolskii* и отсутствовали продукты амплификации для *V. berus* (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что амплификация не происходит у *V. berus*, в нуклеотидной последовательности которых имеются две нуклеотидные замены, приводящие к неполному отжигу аллель-специфичных праймеров. Однако при данной постановке аллель-специфичной ПЦР не использовался положительный контроль, позволяющий выявить те варианты, когда отсутствуют продукты амплификации в результате низкого качества ДНК в образце. В связи с этим использовали в качестве положительного контроля дополнительный праймер, позволяющий амплифицировать весь фрагмент гена 12S рРНК размером 724 п.н. В этом случае отсутствие продуктов амплификации свидетельствовало о низком качестве ДНК в образце.

В результате амплификации были получены два вида ПЦР-продуктов (рис. 3). Один соответствовал фрагменту размером 510 п.н. Данный продукт образовывался

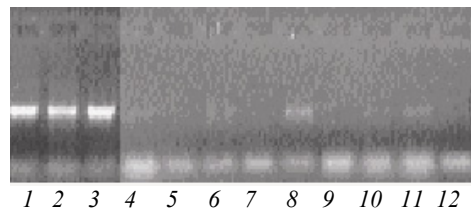
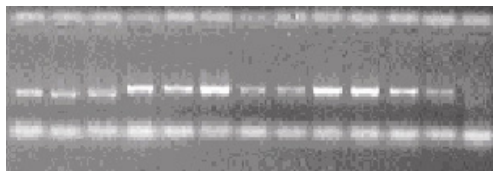


Рис. 2. Продукты аллель-специфичной ПЦР: 1 – 3 – экземпляры гадюки Никольского из Саратовской области, 4 – 12 – экземпляры обыкновенной гадюки из Самарской области

у *V. nikolskii* в результате отжига праймера 2.1, комплементарного ее последовательности. Второй соответствовал фрагменту гена 12S рРНК размером 724 п.н. Данный продукт образовывался у *V. berus* в результате амплификации фрагмента гена 12S рРНК и отсутствия сайта отжига праймера 2.1, специфичного для *V. nikolskii*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Рис. 3. Продукты аллель-специфичной ПЦР: 1 – 3 – экземпляры гадюки Никольского из Саратовской области, 4 – 12 – экземпляры обыкновенной гадюки из Самарской области, 13 – отрицательный контроль

Проведенные экспериментальные исследования показали работоспособность технологии идентификации гадюк. Данная технология позволяет за более короткое время и с меньшими материальными затратами проводить идентификацию гадюк. Вместе с тем при наличии соответствующей приборной базы данные исследования

возможно проводить непосредственно в полевых условиях. Это позволит забирать биологический материал и выпускать животных обратно в среду их обитания, что будет способствовать сохранению гадюковых змей и биологического разнообразия региона в целом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьева Н.Б., Боркин Л.Я., Даревский И.С., Орлов Н.Л. Земноводные и пресмыкающиеся: Энциклопедия природы России. М.: АБФ, 1998. 374 с.
- Ананьева Н.Б., Орлов Н.Л., Халиков Р.Г., Даревский И.С., Рябов С.А., Барабанов А.В. Атлас пресмыкающихся Северной Евразии (таксономическое разнообразие, географическое распространение и природоохранный статус) / Зоол. ин-т РАН. СПб., 2004. 232 с.
- Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Изд-во Самар. науч. центра РАН, 2004. 192 с.
- Божанский А.Т. Гадюка Никольского *Vipera nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva, 1986 // Красная книга Российской Федерации (Животные). М.: Изд-во АСТ, 2001. С. 348 – 349.
- Великов В.А., Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Кузнецов П.Е., Табачишин В.Г., Шляхтин Г.В., Кайбелева Э.И. Генетическая дивергенция некоторых видов гадюк (Reptilia: Viperidae, *Vipera*) по результатам секвенирования генов НАДН-дегидрогеназы и 12S рибосомной РНК // Современная герпетология. 2006. Т. 5/6. С. 41 – 49.
- Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Великов В.А., Табачишин В.Г. Предварительные данные о генетической дифференциации нижеволжских популяций гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*, Viperidae) по результатам секвенирования генов 12S рибосомной РНК и цитохромоксидазы III // Современная герпетология. 2007. Т. 7, вып. 1/2. С. 69 – 75.
- Завьялов Е.В., Кайбелева Э.И., Табачишин В.Г. Сравнительная кариологическая характеристика гадюки Никольского (*Vipera (Pelias) nikolskii*) из пойм малых рек Волжского и Донского бассейнов // Современная герпетология. 2006. Т. 5/6. С. 100 – 103.
- Калябина-Хауф С.А., Ананьева Н.Б. Филогеография и внутривидовая структура широкоареального вида ящериц *Lacerta agilis* L. 1758 (Lacertidae, Sauria, Reptilia) (опыт использования митохондриального гена цитохрома b). СПб., 2004. 108 с.
- Кузьмин С.Л., Семенов Д.В. Конспект фауны земноводных и пресмыкающихся России. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2006. 139 с.

АСПЕКТЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ

Табачишин В.Г., Табачишина И.Е., Завьялов Е.В. Современное распространение и некоторые аспекты экологии гадюки Никольского на севере Нижнего Поволжья // Поволж. экол. журн. 2003. №1. С. 82 – 86.

Табачишин В.Г., Табачишина И.Е., Завьялов Е.В. Сравнительный межпопуляционный анализ гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) по комплексу морфологических признаков // Фундаментальные и прикладные проблемы популяционной биологии: Тез. докл. VI Всерос. популяционного семинара. Нижний Тагил: Изд-во Нижнетагильск. гос. пед. ин-та, 2002. С. 169 – 171.

Шляхтин Г.В., Табачишин В.Г., Завьялов Е.В., Табачишина И.Е. Редкие и исчезающие виды амфибий и рептилий, рекомендуемые к внесению во второе издание Красной книги Саратовской области // Поволж. экол. журн. 2006. Вып. спец. С. 78 – 83.

Bakiev A., Bohme W., Joger U. *Vipera (Pelias) [berus] nikolskii* – Waldsteppenotter // Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Wiebelsheim: AULA-Verlag, 2005. S. 293 – 309.

Joger U., Kalyabina-Hauf S.A., Schweiger S., Mayer W., Orlov N.L., Wink M. Phylogeny of Eurasian *Vipera* (subgenus *Pelias*) // Programme and Abstracts of 12 Ordinary General Meeting of the Soc. Europ. Herpetologica (SEH). Saint-Petersburg, 2003. P. 77.

Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers // Proc. of the National Academy of Sciences USA. 1989. Vol. 86. P. 6196 – 6200.

Milto K.D., Zinenko O.I. Distribution and morphological variability of *Vipera berus* in Eastern Europe // Herpetologia Petropolitana: Proc. of 12th Ordinary General Meeting of the Soc. Europ. Herpetologica (SEH) / Eds. N. Ananjeva, O. Tsinenko. Saint-Petersburg, 2005. P. 64 – 73.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, 1989. 381 p.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA Sequencing with Chain-Termination Inhibitors // Proc. of the National Academy of Sciences USA. 1977. Vol. 74. P. 5436–5467.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. 2007. Vol. 24, №8. P. 1596 – 1599.

Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics // Biol. J. Linn. Soc. 1985. Vol. 26. P. 375 – 400.