

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ РЕДКИХ И ОХРАНЯЕМЫХ ВИДОВ ГАДЮКОВЫХ ЗМЕЙ ПОВОЛЖЬЯ

© 2009 Р.В. Ефимов, Е.В. Завьялов, В.Г. Табачишин, О.А. Помазенко
Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

Проведены сравнительные исследования микросателлитного локуса 7-87 для гадюковых змей рода *Vipera* из Саратовской области и других территорий европейской части России. Выявлена высокая видоспецифическая связь гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) с территории Саратовской области с аллелем 152 п.н. Показана значительная генетическая обособленность «саратовских» популяций от змей (*Vipera berus*) из других регионов по локусу 7-87. Высокий уровень полиморфизма этого локуса не позволяет выявить дискретных аллелей, характеризующих отдельные популяции гадюк на изучаемой территории.

Ключевые слова: молекулярно-генетический анализ, популяция, гадюковые змеи, охраняемые виды

Одной из групп позвоночных животных, обитающих на территории Нижнего Поволжья и нуждающихся в природоохранных мероприятиях, являются рептилии. К одному из таких видов относится гадюка Никольского (*Vipera (Pelias) nikolskii* Vedmederja, Grubant, Rudaeva, 1986), занесенная в Красную книгу Саратовской области [1]. Змея обитает в лесостепной и северной части степной зон Восточной Европы от юго-востока Подольской возвышенности на западе до саратовского Правобережья на востоке [2-7]. В целом распространение гадюки Никольского приурочено к территории Харьковской области Украины и нескольких областей России южнее линии Канев – Курск – Тамбов – Бузулук [8]. В Нижнем Поволжье данный вид встречается лишь на севере региона, здесь южная граница

распространения змеи проходит по территории Саратовской и северным районам Волгоградской областей [2].

В связи с природоохранным статусом вида в регионе большой интерес представляет изучение его популяционной структуры, однако данные исследования затруднены из-за отсутствия единого мнения в отношении таксономического статуса этих рептилий. Некоторые авторы выделяют гадюку Никольского в качестве самостоятельного вида. Другие исследователи рассматривают лесостепные популяции этих змей на уровне подвида обыкновенной гадюки или включают их в состав комплекса «*Vipera berus*» в качестве черной морфы [2, 8-14]. Результаты анализа морфологических признаков выявили сложный переход от обыкновенной гадюки к гадюке Никольского в пределах обширной зоны их гибридизации (интерградации) [9]. Использование только морфологических, экологических и кариологических методов не позволяет дать однозначные ответы на поставленные вопросы [9, 15]. В связи с этим на современном этапе большое значение приобретают эколого-таксономические приемы и подходы, основанные на методах молекулярной генетики, в частности анализе молекул ДНК. В последнее время широкое распространение для оценки

Ефимов Роман Вячеславович, кандидат биологических наук, научный сотрудник. E-mail: efimovrv@rambler.ru

Завьялов Евгений Владимирович, доктор биологических наук, профессор, кафедра морфологии и экологии животных. E-mail: zavialov@info.sgu.ru

Табачишин Василий Григорьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры морфологии и экологии животных

Помазенко Олеся Алексеевна, старший лаборант. E-mail: pomazenko-olesya@mail.ru

внутривидовых и межпопуляционных взаимоотношений приобрели методы, основанные на анализе сателлитных последовательностей. Они представляют собой некодирующие участки высокоповторяющейся ДНК, распространенной в геноме в виде многократно повторяющихся коротких последовательностей. Обладая высокой скоростью мутирования, сателлитные последовательности играют важную роль в поддержании гетерогенности природных популяций [16-18].

Высокая воспроизводимость, кодоминантный тип наследования и значительная степень полиморфизма микросателлитных локусов позволяет отнести их к молекулярно-генетическим маркерам. В отличие от всех остальных маркеров, микросателлиты позволяют проводить анализ генетической дивергенции на уровне видов, подвидов, популяций и даже отдельных особей. Это делает их одним из основных генетических инструментов популяционных исследований. Анализу микросателлитных локусов предшествует подбор подходящих олигонуклеотидных праймеров для амплификации необходимых участков ДНК. Однако у змей на данный момент найдено достаточно ограниченное число микросателлитных локусов. Наиболее информативным представляется микросателлитный локус 7-87, с помощью которого исследовались выборки гадюк.

Результаты, полученные при сравнении секвенированных последовательностей митохондриальных генов особей на исследуемой территории, позволили разделить изучаемые экземпляры на две группы (*Vipera berus* и *V. nikolskii*), однако данные исследования не позволили оценить полиморфизм на уровне отдельных популяций. В связи с этим большой интерес представляет анализ различий между отдельными популяциями гадюк Никольского и обыкновенной. Данная проблема связана с вероятностью гибридизации номинативного подвида обыкновенной гадюки и монотипической гадюки Никольского.

При исследовании экземпляров гадюк с территории Саратовской области

(Sar) было выявлено, что большинство экземпляров в своем генотипе содержат аллель размером 152 п.н. Саратовская область на севере граничит с Пензенской (Pen) и Самарской (Sam) областями. На их территории обитает обыкновенная гадюка, а близость границ ареала гадюк Никольского и обыкновенной может способствовать межвидовой гибридизации между ними. Для проверки высказанного предположения было проведено исследование обыкновенной гадюки Пензенской и Самарской областей с использованием микросателлитного локуса 7-87. Совокупный генетический профиль для гадюк из Пензенской и Самарской областей по микросателлитному локусу 7-87 был представлен только двумя вариантами – 176 и 184 п.н. Отсутствие аллели размером 152 п.н., широко представленной в популяциях гадюки Никольского из Саратовской области, может свидетельствовать об отсутствии широкой гибридизации между изучаемыми видами на данном участке их ареалов.

На следующем этапе анализировался микросателлитный локус 7-87 для гадюк из Республик Чувашия (Chuv), Удмуртия (Udm), Тульской (Tul) и Новгородской (Nov) областей, а также Пермского края (Per). Совокупный генетический профиль для гадюк из Республики Чувашия по микросателлитному локусу 7-87 был представлен следующими вариантами: 176, 180, 184, 186 и 188 п.н. Для гадюк из Республики Удмуртия – 176, 184, 188 п.н., для Пермского края – 184, 186, 188 и 192 п.н. Совокупный генетический профиль для змей из Тульской области представлен вариантами 152, 176, 184, 188 п.н., для Новгородской области – 176 и 184 п.н.

Полученные результаты анализа микросателлитного локуса 7-87 показали значительную обособленность «саратовских» гадюк. На рисунке представлено «филогенетическое дерево», построенное по результатам исследования микросателлитного локуса 7-87, на котором гадюки Никольского сформировали обособленный высоко специфичный кластер по отношению к обыкновенным гадюкам с других территорий.

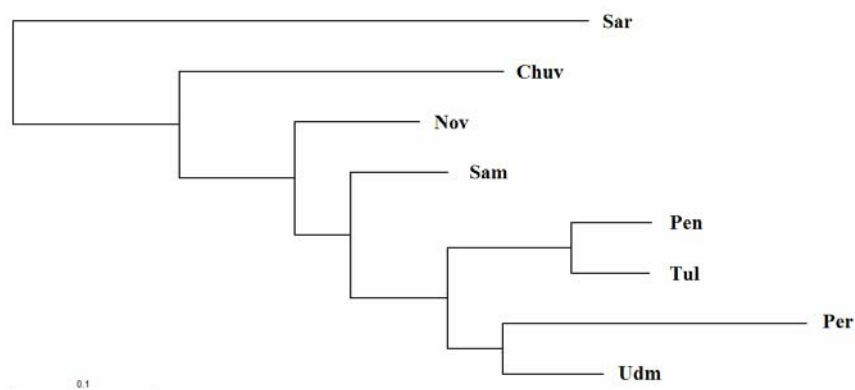


Рис. Филогенетические связи исследованных гадюк по микросателлитному локусу 7–87: усл. обозн. см. в тексте

По результатам исследования у саратовских гадюк была выявлена высокая ассоциация с аллелем 152 п.н. Данный аллель с большой вероятностью позволяет идентифицировать гадюку Никольского. Вместе с этим высокий уровень полиморфизма микросателлитного локуса 7-87 не дает возможности выявлять дискретные аллели, характеризующие отдельные популяции гадюки Никольского Саратовской области. Данное явление, вероятно, обусловлено активным межпопуляционным переносом генетического материала. Полученные результаты подтверждают видовую самостоятельность гадюки Никольского на территории Саратовской области, что требует разработки более действенных природоохранных мер по ее защите.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Красная книга Саратовской области: Грибы. Лишайники, Растения. Животные. – Саратов, 2006. – 528 с.
2. Ведмедеря, В.И. К вопросу о названии черной гадюки лесостепи Европейской части СССР / В.И. Ведмедеря, В.Н. Грубант, А.В. Рудаева // Вестник Харьковского ун-та. – 1986. - №288. – С. 83-85.
3. Табачишин, В.Г. Распространение и морфометрическая характеристика гадюки Никольского (*Vipera nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva) в Саратовской области / Табачишин В.Г., Шляхтин Г.В., Завьялов Е.В. // Тез. докл. Первой конф. герпетологов Поволжья. – Тольятти, 1995. – С. 54-55.
4. Табачишин, В.Г. Морфометрическая дифференциация и таксономический статус пресмыкающихся сем. Colubridae и Viperidae / В.Г. Табачишин, Г.В. Шляхтин, Е.В. Завьялов, Д.А. Старожилова, И.А. Шенелев // Фауна Саратовской области: Проблемы изучения популяционного биоразнообразия и изменчивости животных. – Саратов, 1996. – Т. 1, вып. 2. – С. 39-70.
5. Шляхтин, Г.В. Распространение пресмыкающихся сем. Viperidae и Colubridae на территории Саратовской области / Г.В. Шляхтин, В.Г. Табачишин, Е.В. Завьялов // Тез. докл. Первой конф. герпетологов Поволжья. – Тольятти, 1995. – С. 61-63.
6. Шляхтин, Г.В. Ландшафтно-географическое распространение амфибий и рептилий в Саратовской области / Г.В. Шляхтин, В.Г. Табачишин, Е.В. Завьялов // Эколого-биологические проблемы волжского региона и Северного Прикаспия: Тез. докл. – Астрахань, 1996. – Ч. 2. – С. 29.
7. Завьялов, Е.В. Распространение и особенности биологии *Vipera nikolskii* в северной части Нижнего Поволжья / Е.В. Завьялов, В.Г. Табачишин // Проблемы общей биологии и прикладной экологии. – Саратов, 1997. – Вып. 1. – С. 168-170.
8. Кудрявцев, С.В. Ядовитые змеи: доступно о самом главном / С.В. Кудрявцев, С.В. Мамет // М., 1998. – 44 с.
9. Бакиев, А.Г. Змеи Волжско-Камского края / А.Г. Бакиев, В.И. Гаранин, Н.А. Литвинов, А.В. Павлов, В.Ю. Ратников // Самара, 2004. – 192 с.
10. Grubant, V.N. On the systematic position of a black form of the common adder / V.N. Grubant, A.V. Rudaeva, V.I. Vedmederja // Проблемы герпетологии: Тез. докл. Третьей всесоюз. герпетол. конф. – Л., 1973. – С. 68-71.

11. Joger, U. The phylogenetic position of *Vipera barani* and *V. nikolskii* within the *Vipera berus* complex / U. Joger, P. Lenk, I. Baran et al. // Herpetologia Bonnensis. – 1997. – P. 185-194.
12. Milto, K.D. Distribution and morphological variability of *Vipera berus* in Eastern Europe / K.D. Milto, O.I. Zinenko // Herpetologia Petropolitana. – 2005. – P. 64-73.
13. Zinenko, O.I. Nikolsky's viper, forest-steppe viper – *Vipera (Pelias) berus nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva, 1986 / O.I. Zinenko, T.I. Kotenko // Reserves of Crimea: reserve management, biodiversity, ecological education. – 2005. – Part 2. – P. 139-142.
14. Kotenko, T. Reptiles in the Red Data Book of Ukraine: a new species list, status categories, and problems arising from conservation legislation / T. Kotenko, M. Vences, J. Kohler, T. Ziegler, W. Bohme (eds.) // Herpetologia Bonnensis II: Proceedings of the 13th Congress of the Societas Europaea Herpetologica. – 2006. – P. 55-59.
15. Кайбелева, Э.И. Характеристика кариотипа гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) с территории саратовского Правобережья / Э.И. Кайбелева, Е.В. Завьялов, В.Г. Табачишин, Г.В. Шляхтин // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии. – 2005. – Вып. 8. – С. 55-57.
16. Сингер, М. Гены и геномы / М. Сингер, П. Берг // М.: Мир, 1998 – 391 с.
17. Иванов, В.И. Геномика – медицине / В.И. Иванов, Л.Л. Киселев // М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. – 392 с.
18. Литвинчук, С.Н. Изменчивость микросателлитов *VM224* и *Vca17* в популяциях зеленых жаб (*Bufo viridis* complex), различающихся по размерам генома и плоидности / С.Н. Литвинчук, Ю.М. Розанов, Н.М. Усманова Н.М. и др. // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 4. – С. 332-345.

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF RARE AND PROTECTED SPECIES OF VOLGA VIPERS

© 2009 R.V. Efimov, E.V. Zavialov, V.G. Tabachishin, O.A. Pomazenko
Saratov State University named after Chernyshevsky

A comparative study of the microsatellite 7-87 locus for the *Vipera* snakes of the Saratov region and other territories of the European Russia was made. A high species-specific relation of *Vipera nikolskii* from the territory of the Saratov region with the 152 p.n. allele has been revealed. A significant genetic isolation of the «Saratov» populations from the snakes (*Vipera berus*) in other regions by the 7-87 locus is shown. The high polymorphism level of this locus does not allow revealing discrete alleles describing separate viper populations in the territory under survey.

Key words: molecular-genetic analysis, population, viper snakes, protected species

Roman Efimov, Candidate of Biology, Research Fellow.

E-mail: efimovrv@rambler.ru

Evgeniy Zavialov, Doctor of Biology, Professor,
Department of Animals Morphology and Ecology.

E-mail: zavialov@info.sgu.ru

Vasiliy Tabachishin, Candidate of Biology, Associate Professor,
Department of Animals Morphology and Ecology

Olesya Pomazenko, Senior Laboratorian. E-mail:
pomazenko-olesya@mail.ru