

Ефимов Роман Вячеславович

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ГАДЮКОВЫХ ЗМЕЙ (REPTILIA, VIPERIDAE)
В НИЖНЕМ ПОВОЛЖЬЕ
И НА СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

03.00.16 – экология

03.00.15 – генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2008

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского» на кафедре морфологии и экологии животных

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор
Завьялов Евгений Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Тырнов Валерий Степанович

доктор биологических наук, профессор
Ильин Владимир Юрьевич

Ведущая организация – Зоологический институт РАН

Защита состоится « 2 » июля 2008 г. в 9.00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.243.13 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, учебный корпус № 5, аудитория № 61, факс (8452) 511635, E-mail: biosovet@sgu.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ГОУ ВПО «Саратовский ГУ».

Автореферат разослан « ____ » мая 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Невский С.А.

Общая характеристика работы

Актуальность исследования. Одним из важнейших событий в науке XX в. стало открытие двойной спирали ДНК. Впоследствии это привело к интенсивному развитию молекулярной генетики, становлению которой способствовала международная научная программа «Геном человека». Появились самостоятельные научные направления: геновая диагностика, геновая терапия, геновая систематика, геновая инженерия, занимающие передовые позиции в медицине и биологии. Молекулярная генетика позволила углубить представления о механизмах наследования и эволюции организмов, заложив тем самым основы филогенетики и геновой систематики. Особое значение геновая систематика приобрела при решении спорных вопросов относительно таксонов, систематический статус которых не был установлен. Данное направление интенсивно развивается в отношении змей, ящериц и черепах. Географические популяции пресмыкающихся зачастую характеризуются сходными морфологическими признаками, когда без применения методов молекулярной генетики решение спорных вопросов их систематики становится затруднительным (Горбунова и др., 1997; Чемерис и др., 1999; Калябина-Хауф и др., 2004; Семенова и др., 2004; Venter et al., 2001; Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006; Huang et al., 2007).

К группе рептилий, вопросы филогенетического родства, систематики и распространения которых остаются до конца не выясненными, относятся гадюковые змеи (Viperidae). На современном этапе развития эколого-таксономических исследований повышенный интерес среди этих животных проявляется к гадюке Никольского (*Vipera (Pelias) nikolskii* Vedmederja, Grubant, Rudaeva, 1986), которая широко распространена в Европе. В настоящее время не существует единого мнения в отношении ее таксономического статуса. Некоторые авторы выделяют гадюку Никольского в качестве самостоятельного вида, другие рассматривают на уровне подвида обыкновенной гадюки или включают ее в состав комплекса «*Vipera berus*» в качестве черной морфы (Ведмедеря и др., 1986; Кудрявцев и др., 1998; Бакиев и др., 2004; Grubant et al., 1973; Joger et al., 1997; Milto et al., 2005; Zinenko et al., 2005; Kotenko, 2006).

Гадюка Никольского занесена в Красную книгу России и Украины как малоизученный вид. Сведения о состоянии его популяций в Нижнем Поволжье ограничены: не известен таксономический статус окраинных поселений, поэтому с приемлемой точностью не выявлены границы распространения змей. Отсутствуют достоверные данные о возможности гибридизации близкородственных видов гадюк в природе и их экологической сегрегации в зонах симпатрического обитания. Не разработаны методы оперативной диагностики видовой принадлежности рептилий в природе и лабораторных условиях. Указанные проблемы не позволяют определить категорию редкости и природоохранный статус вида, приступить к разработке действенных мероприятий по сохранению популяций этих животных, особенно на периферии ареала.

Использование только морфологических, экологических и кариологических методов не позволяет дать однозначные ответы на поставленные вопросы (Бакиев и др., 2004; Кайбелева и др., 2005). В связи с этим на современном этапе большое значение приобретают эколого-таксономические приемы и подходы, основанные на анализе молекул ДНК. Использование данных методов позволяет уточнить таксономический статус некоторых видов гадюковых змей, а значит значительно приблизиться к пониманию процессов и явлений их морфологической изменчивости под действием комплекса абиотических факторов среды. На основе применения молекулярно-генетического анализа возможно также установление генетической структуры популяций гадюк, а также выявление механизмов, лежащих в основе эволюции изучаемых змей.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилось выявление распространения и экологической сегрегации гадюковых змей в Нижнем Поволжье, определение таксономического статуса их популяций с использованием молекулярно-генетических маркеров. В ходе реализации цели исследования решались следующие задачи:

- оценка таксономического статуса гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) в Нижнем Поволжье и на сопредельных территориях на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов;
- установление генетической структуры популяций гадюк Никольского и обыкновенной с использованием анализа микросателлитных локусов, выявление факторов внешней среды, участвующих в ее формировании;
- определение границ ареала гадюки Никольского на территории Нижнего Поволжья и на сопредельных территориях;
- выявление механизмов экологической сегрегации гадюк Никольского и обыкновенной в зонах симпатрии, уточнение гипотетической модели дивергенции и пространственного распространения видов рода *Vipera*;
- разработка экспресс-технологии идентификации популяций гадюковых змей (*V. berus* и *V. nikolskii*), таксономическое положение которых по комплексу морфологических и биохимических признаков затруднено.

Научная новизна. Определен таксономический статус гадюки Никольского и выявлена северная граница ее распространения на территории Нижнего Поволжья на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов. Впервые секвенированы митохондриальные гены 12S рибосомной РНК, НАДН-дегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы для гадюки Никольского; для обыкновенной гадюки (*Vipera berus*) определена нуклеотидная последовательность митохондриальных генов 12S рРНК и цитохром *c* оксидазы. Получены данные о генетической изменчивости популяций гадюковых змей, что позволило уточнить гипотетические модели дивергенции и расселения видов рода *Vipera*. Выявлены экологические факторы, определяющие генетическую и морфологическую изменчивость географических популяций гадюковых змей.

Научно-практическая значимость. На основе результатов анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена 12S рибосомной РНК

разработана универсальная технология идентификации экземпляров гадюк Никольского и обыкновенной в зонах их симпатрического обитания. Заложены методические основы анализа генетических особенностей популяций восточной степной гадюки (*Vipera renardii*) с использованием микросателлитных локусов. Материалы диссертации вошли в «Практикум по молекулярной биологии (методы биоинженерии)», рекомендованный для использования в вузах при подготовке специалистов естественнонаучного профиля. Результаты диссертационной работы используются при проведении практических занятий по молекулярной биологии для студентов биологического факультета Саратовского государственного университета.

Апробация работы. Материалы исследования докладывались и обсуждались на: Четвертой конференции герпетологов Поволжья (Тольятти, 2007 г.); 3-й Московской конференции по вычислительной молекулярной биологии (Москва, 2007 г.); 49-й научной конференции Московского физико-технического института (Долгопрудный, 2006 г.); 6-й Международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры генома (Новосибирск, 2008 г.); студенческих научно-практических конференциях Саратовского государственного университета «Исследования молодых ученых и студентов в биологии» (Саратов, 2005–2006 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, три из которых в изданиях перечня ВАК РФ.

Декларация личного участия автора. Автор лично проводил экспериментальные исследования, выявлял молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования структуры популяций. Анализ полученных данных, их интерпретация и оформление выполнялись автором самостоятельно. В совместных публикациях вклад соискателя составил 50–80%.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Гадюка Никольского является самостоятельным видом, наиболее близким в генетическом и морфологическом отношениях к обыкновенной гадюке.

2. Распространение гадюки Никольского в Поволжье связано преимущественно с интразональными ландшафтами долин рек Донского бассейна; в отличие от обыкновенной гадюки она редко встречается на водораздельных пространствах вне связи с пойменными местообитаниями.

3. Межпопуляционная генетическая изменчивость обыкновенной гадюки имеет клинальную зависимость в направлении от Республики Мордовия до Пермского края по градиенту комплекса абиотических факторов.

4. В условиях внутривековой динамики климатических показателей (преимущественно среднегодовой температуры и количества осадков) гадюка Никольского проявляет тенденцию к расселению на север.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 141 странице и включает 47 рисунков и 16 таблиц. Работа состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и приложения. Библиографический указатель включает 104 источника, из которых 42 на иностранных языках.

Содержание работы

Во Введении обосновывается актуальность исследования, его практическая и теоретическая значимость; сформулированы основная цель и задачи, а также пути их реализации.

Глава 1. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭКОЛОГИИ И СИСТЕМАТИКЕ ГАДЮКОВЫХ ЗМЕЙ (обзор литературы)

Приводится эколого-морфологическая характеристика гадюки Никольского, представляются различные точки зрения относительно ее систематического положения. Материалы главы включают результаты эколого-морфологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований. Представлена история становления и актуальность молекулярно-генетических методов в систематике. Описаны современные методы молекулярной биологии, используемые для определения таксономического статуса животных, растений и микроорганизмов. Особое внимание уделяется анализу нуклеотидных последовательностей, позволяющему определять степень родства на генетическом уровне, а также анализу микросателлитных локусов, обладающих высоким уровнем полиморфизма, что традиционно используется в популяционных исследованиях.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В главе представлены методы выделения ДНК, проведения полимеразной цепной реакции, определения нуклеотидной последовательности и анализа микросателлитных локусов. Предложены приборная база и реактивы для выполнения данной работы. Указаны пакеты прикладных программ, используемых для расчета генетических дистанций, построения «филогенетических деревьев», оценки уровня гетерозиготности и др.

Материалом для данной работы послужили полевые сборы, осуществленные в Саратовской, Самарской, Пензенской, Новгородской, Тульской областях, республиках Мордовия, Чувашия, Удмуртия и в Пермском крае с 2003 по 2007 гг., которые хранятся в Зоологическом музее Саратовского университета и Зоологическом институте РАН (таблица). В качестве материала использовали заспиртованные образцы печени гадюк. Тотальную ДНК из них выделяли по методике (Sambrook et al., 1989), применяемой в отношении рептилий. Тотальную ДНК из крови извлекали с использованием набора «Diatom Prep 100» (ГенЛаб) в соответствии с методикой фирмы изготовителя.

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали олигонуклеотидные праймеры, подобранные по нуклеотидным последовательностям, имеющимся в базе данных Genebank (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 использовали программы Clustal W и BioEdit Sequence Alignment Editor. Для построения дендрограмм применяли пакет прикладных программ MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura et al., 2007).

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	ЗМ СГУ, ЗИН РАН
3	Chuv	Республика Чувашия	<i>V. berus</i>	5	ЗМ СГУ, ЗИН РАН
4	Pen	Пензенская область	<i>V. berus</i>	3	ЗМ СГУ
5	Mor	Республика Мордовия	<i>V. berus</i>	7	ЗМ СГУ
6	Per	Пермский край	<i>V. berus</i>	7	ЗИН РАН
7	Udm	Республика Удмуртия	<i>V. berus</i>	6	ЗИН РАН
8	Tul	Тульская область	<i>V. berus</i>	9	ЗИН РАН
9	Nov	Новгородская область	<i>V. berus</i>	5	ЗИН РАН
10	Vol	Волгоградская область	<i>V. renardi</i>	2	ЗМ СГУ

Анализ флуоресцентно-меченых продуктов амплификации микросателлитных локусов проводили с помощью генетического анализатора 3130XL (Applied Biosystems); вычисление частот аллелей и определение коэффициента инбридинга – с использованием программ GenAIEх 6. Генетические расстояния между популяциями гадюк и построение «филогенетического дерева» проводили с использованием программы Phylip 3.65.

Глава 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА ГАДЮКОВЫХ ЗМЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

В главе представлены результаты анализа нуклеотидных последовательностей трех митохондриальных генов: НАДН-дегидрогеназы (субъединица 2 – ND2), цитохром *c* оксидазы (субъединицы 3 – COIII) и 12S рибосомной РНК. На начальном этапе исследований была поставлена задача оценить уровень генетических различий между обыкновенной гадюкой и гадюкой Никольского. На основе анализа данных литературы по распространению гадюковых змей, в работе использовались рептилии из Саратовской и Самарской областей. По морфологическим признакам все экземпляры были определены как гадюки Никольского. Однако в соответствии с данными литературы, экземпляр из Самарской области должен был быть отнесен к обыкновенной гадюке. В связи с этим он рассматривался как вариант с неопределенным таксономическим статусом.

Для проведения полимеразой цепной реакции были подобраны следующие олигонуклеотидные праймеры:

на ген НАДН-дегидрогеназа

5'-GCATTTTCATGACCACCACC-3'

5'-GAGTGAGGGGTAAGATAGAG-3'

на ген цитохром *c* оксидаза

5'-AATGACTCACCAGCTACACC-3'

5'-GGAGCCTCATCAGTATACTG-3'

на гена 12S рРНК

5'-СТСААСААСАГТГАГАСАГСС-3'

5'-GGTGTGTACGCTCTTCATTGC-3'

Нуклеотидная последовательность гена НАДН-дегидрогеназы субъединицы 2 обычно используется для изучения молекулярной филогении животных и, в частности, змей (Garrigues et al., 2005). Поэтому, для определения таксономического статуса гадюки из Самарской области использовалось сравнение именно нуклеотидных последовательностей митохондриального гена НАДН-дегидрогеназы. На основе сравнения признаков гадюк из Саратовской и Самарской областей, а также змей, взятых из базы данных Genebank (*V. berus*, *V. ursinii*, *V. a. aspis*, *V. am. ammodytes*), были выявлены их филогенетические связи. Для этого использовали дистанционный метод (NJ). Экземпляры из Саратовской области представлены на «филогенетическом дереве» в виде отдельной группы с высоким уровнем достоверности – 99% (рис. 1). Все остальные экземпляры располагаются на определенном расстоянии от данной группы. Следует отметить, что наиболее близкими к данной выборке являются экземпляры гадюки из Самарской области и *V. berus* из базы данных Gene bank.

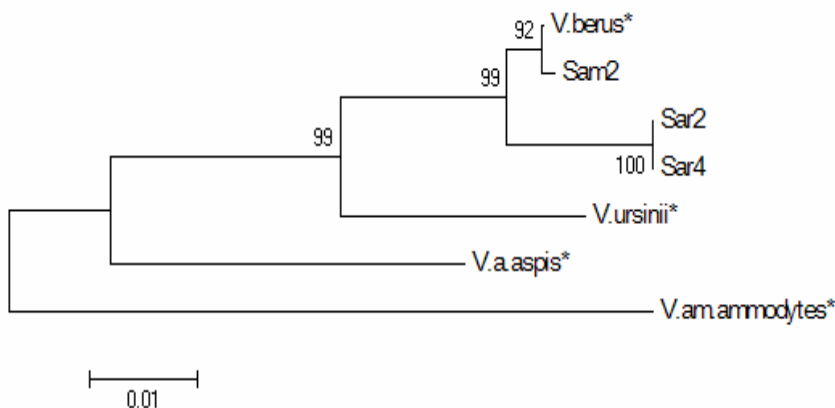


Рис. 1. Филогенетические связи, выявленные на основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена НАДН-дегидрогеназы с использованием дистанционного метода (NJ):

*) нуклеотидные последовательности, взятые из базы данных Gene bank

Результаты анализа нуклеотидной последовательности митохондриального гена НАДН-дегидрогеназы свидетельствуют о генетическом сходстве гадюк Никольского из популяций с территории Саратовской области. Как видно из схемы филогенетических связей, эти экземпляры образовали отдельный кластер, по сравнению со всеми остальными экземплярами, используемыми в анализе. Змеи из Самарской области попали в одну группу с *V. berus* из базы данных Gene bank. Отличия между данными экземплярами составили всего два нуклеотида. Данный уровень различий свидетельствует о высоком сходстве экземпляров гадюк из Самарской области и обыкновенной гадюки.

Необходимо отметить, что первоначально экземпляр гадюки из Самарской области по морфологическим признакам был отнесен к *V. nikolskii*. Однако результаты молекулярно-генетических исследований показали его высокое сходство с обыкновенной гадюкой. Подобные результаты были получены и при сравнении нуклеотидной последовательности цитохром *b*, когда по морфологическим признакам гадюки идентифицировались как *V. nikolskii*, хотя на основе молекулярно-генетического анализа они попадали в группу «*V. berus*» (Бакиев и др., 2004). На этом основании можно предположить, что гадюки из Самарской области, территориально располагающиеся выше границы Канев – Курск – Тамбов – Бузулук, уже не входят в ареал гадюки Никольского, а являются черной морфой обыкновенной гадюки.

Полученные результаты указывают на тот факт, что гадюки из Саратовской и Самарской областей являются представителями различных таксономических групп. Гадюки из саратовского Правобережья территориально, морфологически и генетически (на молекулярном уровне) определяются как гадюки Никольского. Рептилии самарских популяций по морфологическим признакам диагностируются как гадюки Никольского, но по географической приуроченности их популяций должны относиться к обыкновенной гадюке. Молекулярно-генетические данные подтверждают принадлежность самарских экземпляров к обыкновенной гадюке.

На следующем этапе работ анализировались нуклеотидные последовательности митохондриального гена цитохром *c* оксидазы (субъединица 3 – CO III). Учитывая результаты сравнения митохондриального гена НАДН-дегидрогеназы, для анализа цитохром *c* оксидазы было предложено расширить выборку гадюк из Саратовской и Самарской областей. Также дополнительно в исследования были включены экземпляры обыкновенной гадюки из Пензенской области и Республики Мордовия. В качестве внешней группы использовалась восточная степная гадюка (*Vipera renardii*) из волгоградской популяции.

Для построения «филогенетического дерева» использовали 20 экземпляров гадюк из Нижнего Поволжья и сопредельных территорий. Как и для гена НАДН-дегидрогеназы экземпляры из Саратовской и Самарской областей по

результатам сравнения цитохром *c* оксидазы образовали отдельные группы (рис. 2). Вместе с этим в «самарскую» группу также вошли экземпляры из Пензенской области и Республики Мордовия.

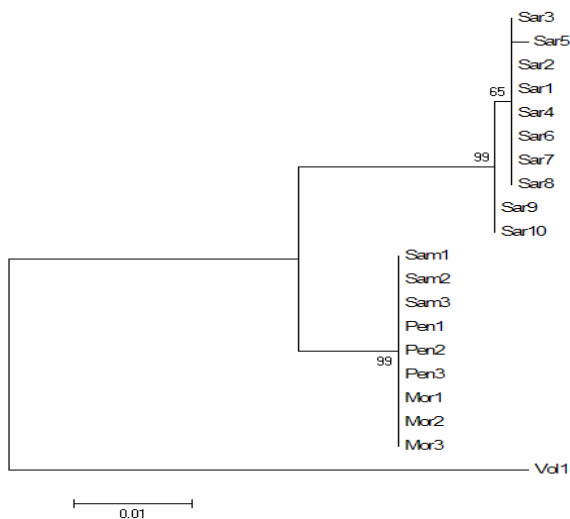


Рис. 2 Филогенетические связи, выявленные по данным нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохром *c* оксидазы CO III с использованием дистанционного метода (NJ)

Полученные результаты выявили строгую специфичность гадюк из Саратовской области, которые по морфологическим признакам были отнесены к гадюке Никольского. Незначительные отличия в виде отдельных мутаций были обнаружены у трех экземпляров *V. nikolskii* из Лысогорского и Ртищевского районов Саратовской области. Представленные материалы подтверждают выдвинутое на предыдущих этапах работ предположение о высокой генетической специфичности змей из Саратовской области и принадлежности их к гадюке Никольского.

Гадюки, предварительно идентифицированные по морфологическим признакам как обыкновенные из Пензенской области и Республики Мордовия, образовали отдельную группу, отличающуюся от гадюк Никольского из Саратовской области. Змеи из Самарской области были также отнесены к группе обыкновенных гадюк, хотя морфологические признаки указывали на их принадлежность к гадюке Никольского.

Большинство полученных данных указывают на то обстоятельство, что «самарские» гадюки находятся в зоне симпатрического обитания номинативного подвида обыкновенной гадюки и гадюки Никольского. Тем не менее, эти

образцы проявляют сходство по нуклеотидной последовательности, что позволяет предположительно отнести их к обыкновенной гадюке. Экземпляр восточной степной гадюки образовал отдельный кластер, что свидетельствует о принадлежности данного экземпляра к самостоятельному виду.

На следующем этапе работ анализировались нуклеотидные последовательности митохондриального гена 12S рибосомной РНК. Учитывая результаты сравнения митохондриального гена НАДН-дегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы, было предложено еще более расширить выборку гадюк из Саратовской и Самарской областей до 15 и 14 экземпляров соответственно. Также дополнительно в анализ были включены экземпляры обыкновенной гадюки из Пензенской и Тульской областей, Пермского края, республик Мордовия, Чувашия и Удмуртия. В качестве внешней группы использовалась восточная степная гадюка из волгоградской популяции.

Полученные результаты вновь подтвердили строгую специфичность гадюк из Саратовской области, которые по морфологическим признакам были отнесены к гадюке Никольского (рис. 3). Незначительные отличия в виде отдельных мутаций были обнаружены у трех экземпляров *V. nikolskii* из Аркадакского района (окрестности с. Летяжевка, пойма р. Хопер) Саратовской области. Данные результаты по сравнению нуклеотидной последовательности 12S рРНК подтвердили предположение о принадлежности «саратовских» змей к гадюке Никольского. Единственное исключение составил экземпляр гадюки с территории урочища Моховое болото (Новобурасский район Саратовской области), который не попал в данную группу. По морфологическим признакам он был определен как *V. nikolskii*, а по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей гена 12S рРНК как *V. berus*. В данной ситуации следует уточнить, что данный экземпляр был ювенильного возраста и, вероятно, ошибочно при внешней диагностике был отнесен к гадюке Никольского. Это связано с тем, что первогодки гадюк Никольского и обыкновенной имеют морфологическое сходство, особенно проявляющееся в окраске тела (Завьялов и др., 1998; Кудрявцев и др., 1998).

Следует отметить, что сходство результатов, полученных при анализе всех трех генов, свидетельствует о достоверности сделанных выводов. Во всех сравнениях восточная степная гадюка образовывала отдельный кластер. Она находилась практически на равном генетическом расстоянии от гадюк Никольского и обыкновенной. Обнаружен высокий уровень молекулярного единообразия внутри популяций изучаемых видов. Большинство нуклеотидных замен, по которым экземпляры отличались внутри кластеров, были единичны и не характеризовали группировки в целом. Однако популяция обыкновенной гадюки с территории Тульской области двумя нуклеотидными заменами отличается от остальных популяций обыкновенных гадюк. Данные нуклеотидные

замены отмечены у всех исследованных экземпляров, в связи с чем «тульских» обыкновенных гадюк следует рассматривать как обособленную группу, однако имеющую уровень генетических отличий 0.3%, что не превышает межпопуляционный уровень (Калябина-Хауф и др., 2004).

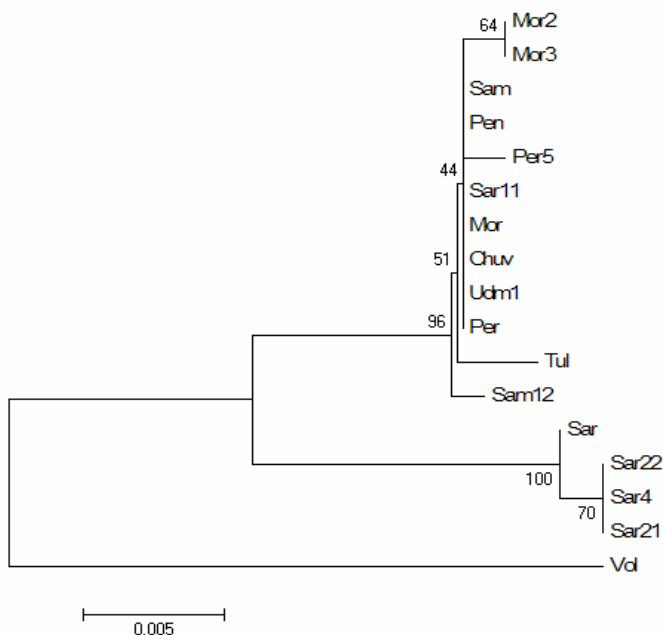


Рис. 3. Филогенетические связи, выявленные по данным нуклеотидной последовательности фрагмента гена 12S рРНК с использованием дистанционного метода (NJ)

Принимая во внимание гипотезу о стабильной дивергенции митохондриальной ДНК, соответствующей 1 млн. лет на 2.5% генетических различий, обособление популяции Тульской области от основной ветви произошло примерно 120 тыс. лет назад. Данное явление, предположительно, может быть связано с наступлением ледников на юг в течение плейстоцена, которое отрезало их от основной группы и способствовало формированию обособленной популяции.

В целом средний уровень различий между гадюкой Никольского и обыкновенной гадюкой по трем митохондриальным генам равен 2.36%. Принимая во внимание литературные данные по генетическим дистанциям между видами одного рода для рептилий (0.51%), уровень различий между данными гадюками свидетельствует об индивидуальности гадюки Никольского (Avisе et al., 1982). Поэтому этих змей следует рассматривать в качестве самостоятельного вида гадюк.

Глава 4. ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ СЕГРЕГАЦИЯ ГАДЮКОВЫХ ЗМЕЙ

В настоящее время гадюка Никольского является одним из самых распространенных представителей рода *Vipera* на территории Саратовской области. Выявленные различия между саратовскими популяциями гадюк и остальными исследованными представителями указанного таксона позволили подтвердить обоснованность выделения гадюки Никольского в качестве самостоятельного вида. Наряду с этим заключение 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.

На первом этапе для оценки полиморфизма гадюки Никольского на территории изучаемого региона с использованием микросателлитных локусов осуществлялся подбор олигонуклеотидных праймеров для амплификации необходимых участков ДНК. На основе результатов обзора литературы были подобраны 9 пар олигонуклеотидных праймеров. Однако всего три пары оказались наиболее подходящими для исследования гадюк. Наиболее информативным представляется микросателлитный локус 7–87, с помощью которого исследовались выборки гадюк.

На основе применения указанного локуса было проанализировано 82 экземпляра гадюк. Следует отметить, что из 23 «саратовских» образцов 19 в своем составе имели аллель размером 152 п.н. Один экземпляр с территории Новобурасского района Саратовской области характеризовался наличием аллелей 176 и 184 п.н. Два экземпляра (Sar 17, 19) являются гомозиготными с аллелями размером 184 п.н. У одного экземпляра (Sar 3) обнаружены аллели, не встречающиеся среди других «саратовских» гадюк. Размер аллелей для данного экземпляра составляет 166 и 190 п.н. Аллель 152 п.н. оказался высокоспецифичным для гадюки Никольского. Вместе с этим, практически все экземпляры обыкновенных гадюк содержали аллели размером от 176 до 192 п.н., что указывает на обособленность популяций гадюк Никольского из Саратовской области и обыкновенных гадюк из более северных территорий.

Нельзя не отметить и тот факт, что один экземпляр из Тульской области и два из Республики Мордовия содержали аллель 152 п.н., характерный гадюке Никольского 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 гадюки Никольского, которые в условиях внутривековой динамики климата проявляет тенденцию к расселению на север (рис. 4).

В отношении изучаемых рептилий из Пермского края, республик Чувашии, Мордовии и Удмуртии выявлено разнообразие аллелей по микросател-

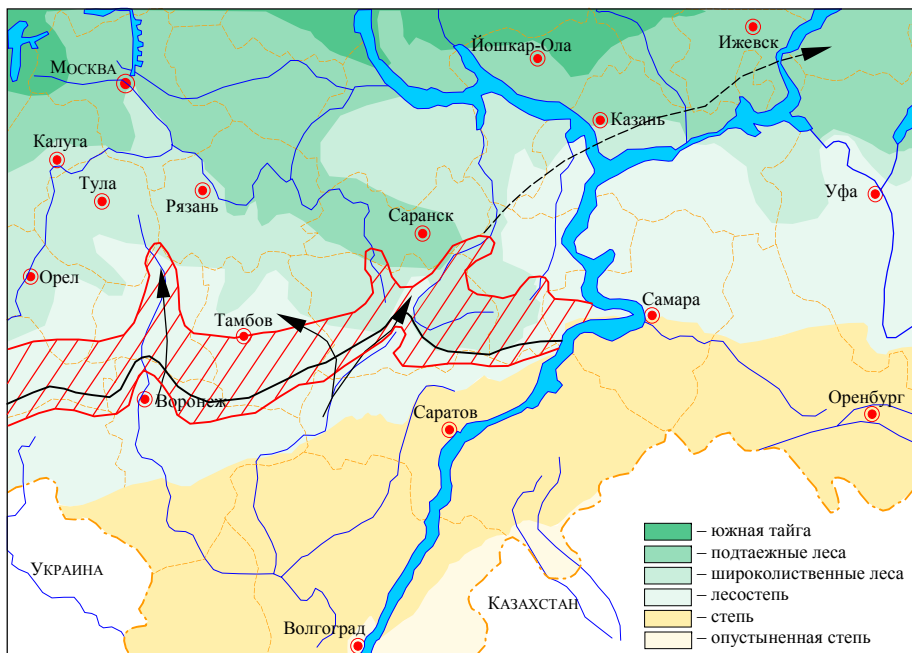


Рис. 4. Гипотетическая схема распространения, динамики ареала и направления генетической изменчивости гадюковых змей:

- — 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)

литному 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). Вместе с этим, 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).

Принимая во внимание результаты, полученные при анализе нуклеотидных последовательностей и микросателлитного локуса, становится возможным создать гипотетическую модель расселения и формирования современного ареала изучаемых гадюк (см. рис. 4). При этом необходимо придавать ведущее значение процессам эогенеза в четвертичном ледниковом периоде, которые оказали максимальное влияние на формирование видовой структуры рептилий (Калябина-Хауф и др., 2004). В тот период основные колебания климата были приурочены к среднему плейстоцену (700 тыс. лет назад), когда происходило продвижение ледников на юг с цикличностью приблизительно 100 тыс. лет, а также наступление непродолжительных теплых межледниковых периодов. 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), 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 широколиственных 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.

Дивергенция и экологическая сегрегация гадюк Никольского и обыкновенной продолжалась и в голоценовый период, о чем свидетельствует анализ митохондриальной ДНК. В связи с этим предположим, что в основе механизмов адаптации и дифференциации указанных видов в зонах симпатрического обитания 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, крайне редко встречается на водораздельных пространствах. 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 гадюками Никольского и обыкновенной в ситуациях, когда экологические ниши видов хоть и незначительно перекрываются в пространственном отношении, а также в ходе расселения рептилий.

Глава 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ГАДЮКОВЫХ ЗМЕЙ

В главе предложена низкозатратная технология идентификации гадюк, таксономическое положение которых затруднено на основе морфологических и биохимических характеристик. В основе данной технологии лежит аллель-специфичная ПЦР. Выявленные нуклеотидные замены в митохондриальном гене 12S рибосомной РНК у гадюк Никольского и обыкновенной были положены в основу технологии генотипирования. При конструировании олигонуклеотидных праймеров для аллель-специфичной ПЦР нуклеотидная замена вво-дилась во второе положение на 3'-конце.

Для подтверждения работоспособности технологии идентификации гадюк с использованием аллель-специфичной ПЦР она была проверена на экземплярах гадюк, таксономический статус которых уже был определен с использованием секвенирования митохондриального гена 12S рРНК. Проведенные экспериментальные исследования показали работоспособность технологии идентификации гадюк. Данная технология позволит за более короткое время и с меньшими материальными затратами проводить идентификацию гадюк. Вместе с этим, 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 в целом биологического разнообразия региона.

ВЫВОДЫ

В результате осуществленных исследований впервые секвенированы нуклеотидные последовательности митохондриальных генов 12S рРНК, НАДН-дегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы для гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*); для обыкновенной гадюки (*Vipera berus*) определена нуклеотидная последовательность митохондриальных генов 12S рРНК и цитохром *c* оксидазы, что позволило сделать следующие выводы:

1. Подтверждена видовая самостоятельность популяций гадюки Никольского, приуроченных в своем обитании к основной части ее ареала. Сравнительный анализ митохондриальных генов 12S рибосомной РНК, НАДН-дегидрогеназы и цитохром *c* оксидазы указывает на отличия нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов у гадюковых змей Среднего Поволжья, что позволяет отнести их к меланистической форме обыкновенной гадюки. Вероятное время дивергенции рода *Vipera* в отношении гадюк Никольского и обыкновенной приходится на средний плейстоцен (около 700 тыс. лет назад).

2. Область распространения гадюки Никольского 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.

3. Выявлено наличие на территории Поволжья (северные районы Правобережья Саратовской области) популяций гадюковых змей, результаты анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена 12S рибосомной РНК и микросателлитного локуса 7–87 которых указывают на гибридогенный характер их происхождения (*V. berus* × *V. nikolskii*). Это свидетельствует о возможности перекрытия пространственных ниш гадюк в зоне их симпатрического обитания.

4. Определены признаки (аллель 152 п.н.), позволяющие диагностировать популяции гадюки Никольского в основной части ареала. В зонах гибридизации регистрация у гадюковых змей выявленного признака позволяет предположить высокие адаптивные возможности гадюки Никольского. Определена межпопуляционная клинальная изменчивость в пределах ареала обыкновенной гадюки по микросателлитному локусу 7–87, проявляющаяся в северо-восточном направлении в отношении увеличения длины аллелей.

5. Разработана экспресс-технология (на основе результатов сравнения нуклеотидной последовательности митохондриального гена 12S рРНК) идентификации популяций гадюковых змей (*V. berus* и *V. nikolskii*), таксономическое положение которых по комплексу морфологических и биохимических признаков затруднено. Предлагаемая методика основана на детекции единичных мутаций с использованием аллель-специфичной полимеразной цепной реакции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

* – публикации в изданиях перечня ВАК РФ

1. Ефимов Р.В. ПЦР-амплификация и секвенирование генов НАДН-дегидрогеназы ND2 и 12S РНК гадюки Никольского *Vipera nikolskii* // Исследования молодых ученых и студентов в биологии. – Саратов, 2005. – Вып. 3. – С. 35–38.

2. Ефимов Р.В. Применение автоматического секвенирования для определения таксономического статуса гадюк // Тр. 49-й науч. конф. Московского физико-технического института (факультет аэрофизики и космических исследований). М., 2006. – С. 23.

3. 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.

4. * Великов В.А., Ефимов Р.В., Назаров А.К., Кузнецов П.Е. ПЦР-амплификация и секвенирование генов НАДН-дегидрогеназы и 12S рибосо-

мальной РНК гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) // Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И. Вавилова. – 2006. – № 3. – С. 3–7.

5. 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.

6. Efimov R.V., Zavalov E.V., Tabachisan V.G. Analysis of genetic divergence of different Vipera species (Reptilia: Viperidae, *Vepera*) from gene sequention of cytochrome oxidase subunit III and 12S ribosomal RNA // Proceedings of The 3-rd Moscow Conference On Computational Molecular Biology. – М., 2007. – P. 324–225.

7. Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Табачишин В.Г. Сравнительная генетическая характеристика поволжских популяций обыкновенной гадюки (*Vipera berus*) и гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) по результатам секвенирования генов 12S рибосомной РНК и цитохромоксидазы III // Актуальные проблемы герпетологии и токсикологии. – Тольятти, 2007. – Вып. 10. – С. 56–60.

8. * Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Великов В.А., Табачишин В.Г. Генетическая дивергенция популяций *Vipera berus* и *Vipera nikolskii* (Reptilia: Viperidae, *Vipera*) Нижнего Поволжья и сопредельных территорий по результатам секвенирования генов цитохромоксидазы III И 12S рибосомной РНК // Генетика. – 2008. – Т. 44, № 2. – С. 283–286.

9. Efimov R.V. Zavalov E.V., Tabachishan V.G. Features of microsatellite loci in population of some kinds of adders (Viperidae, *Vipera*) // The 6-th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure. – Novosibirsk, 2008. – С. 93.

10. Аспекты экологической сегрегации и технология видовой идентификации гадюковых змей (Reptilia: Viperidae, *Vipera*) в Поволжье на основе генотипирования // Поволжский экол. журн. 2008. № 2. С. 56–61.

Подписано в печать 29.05.2008. Формат 60×84_{1/16}.
Бумага офсетная № 1. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 1,25. Тираж 100 экз. Заказ 91

Отпечатано в типографии ООО «Тироль».
410005, Саратов, ул. Чернышевского, 203.

