

УДК 597.6(470.44)

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ГАДЮК
(REPTILIA: VIPERIDAE, VIPERA)
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОВ
НАДН-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ И 12S РИБОСОМАЛЬНОЙ РНК**

**В.А. Великов¹, Р.В. Ефимов¹, Е.В. Завьялов¹, П.Е. Кузнецов¹,
В.Г. Табачишин², Г.В. Шляхтин¹, Э.И. Кайбелева¹**

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

² Саратовский филиал Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Россия, 410028, Саратов, Рабочая, 24

ВВЕДЕНИЕ

Организация геномной ДНК рептилий, в частности змей, исследована фрагментарно. Полные митохондриальные геномы представлены в базе данных Gene Bank для двух видов змей *Dinodon semicarinatus* (Kumazawa et al., 1998) и *Ovophis okinavens* (Dong, Kumazawa, 2005). Среди гадюк наиболее изученным в этом плане объектом является обыкновенная гадюка (*Vipera (Peliás) berus*). Для нее последовательность нуклеотидов определена для ряда отдельных генов, таких как гены цитохрома В (*cyt b*), 16S рибосомальной РНК (16S rRNA), субъединицы 2 НАДН-дегидрогеназы (ND2), фосфолипазы и некоторых других (Gene Bank). Это митохондриальные гены и хромосомные гены ферментов, входящих в состав яда. Митохондриальные гены являются наиболее консервативными среди генов эукариот (Одинцова, Юрина, 2005) и анализ их первичной структуры позволяет выявлять филогенетические связи между различными группами организмов (Антонов, 2005). В основе этих методов лежит определение различий в нуклеотидных последовательностях (Павлов и др., 2004). Обработка таких данных позволяет выявлять, насколько близки в эволюционном отношении исследуемые организмы.

Гадюка Никольского (*Vipera (Peliás) nikolskii* Vedmederja, Grubant, Rudaeva, 1986) – редкий охраняемый вид гадюк лесостепной зоны – представляет интерес в этом плане, поскольку некоторые вопросы ее систематики и филогении трудно решить без привлечения молекулярно-генетических данных (Табачишин и др., 1996). Анализ морфологии, экологии и кариотипа не дает однозначных результатов (Бакиев и др., 2004; Bakiev et al., 2005; Tabachishin et al., 2005). На современном этапе вопрос о видовой самостоятельности гадюки Никольского остается дискуссионным. В этой связи целесообразно представить несколько точек зрения в отношении таксономического статуса «черных лесостепных гадюк».

Во-первых, до сих пор широко распространено мнение исследователей, стоящих на позиции, предполагающей рассматривать «черных лесостепных гадюк» в составе монотипического *V. (P.) berus* как яркий пример проявления широкого

спектра генетической полиморфности на фоне общей монотипичности вида. Однако накопленные к настоящему времени сведения о морфологической специфичности югославских и албанских популяций обыкновенной гадюки, а также локальных изолированных поселений с Дальнего Востока уже не оставляют сомнений в целесообразности выделения подвидовых форм *bosniensis* и *sachalinensis* в составе данного таксона.

Во-вторых, предполагается существование политипической изменчивости у обыкновенной гадюки и выделение в пределах *V. (P.) berus* на основе анализа морфологической дивергенции группировок подвидового ранга, в частности *V. b. nikolskii* (Milto, Zinenko, 2005). В данной ситуации наличие в популяциях разноокрашенных змей в большинстве случаев рассматривается как дополнительный таксономический признак, в крайних – просто игнорируется. Как и в первом случае, видовая самостоятельность *V. (P.) nikolskii* отрицается, а черные и промежуточные с точки зрения окраски особи рассматриваются как вариегат в пределах *V. (P.) b. berus*.

В-третьих, все больше сторонников, несмотря на очевидные противоречия с классическими принципами зоологической систематики, находит точка зрения, согласно которой статус черноокрашенных особей из лесостепных популяций гадюки (даже не локальных изолированных географических популяций) должен рассматриваться как подвидовой в составе *V. (P.) berus*. В подтверждение этой гипотезы, главным образом, приводятся данные морфологических исследований выборок змей из различных точек распространения обыкновенной гадюки и у северных пределов обитания гадюки Никольского, сгруппированных по принципу противопоставления черноокрашенных особей и рептилий иной окраски.

В-четвертых, краткий анализ широкого спектра мнений в отношении систематического положения «черных гадюк» целесообразно завершить представлением позиции, согласно которой таксономическая самостоятельность гадюки Никольского не вызывает сомнений, а дискуссионными остаются лишь вопросы определения взаимоотношений последней с обыкновенной гадюкой. В качестве отправной точки в этих изысканиях выдвигается рабочая гипотеза о целесообразности сблизить *V. (P.) berus* и *V. (P.) nikolskii* до уровня *allospecies* в составе надвидовой группировки. В данной ситуации ключевым является тезис о невозможности существования на обширной территории Центральной и Восточной Европы в исторически обозримые с микроэволюционной точки зрения интервалы времени симпатричных подвидовых группировок. Именно поэтому проблема взаимоотношений разноокрашенных гадюк рассматривается только с позиции аллопатричности внутривидовых форм, а симпатрия на уровне видов («полувидов») в пределах комплекса служит объектом исследований возможности формирования локальных поселений гибридогенного происхождения.

Помимо представленных крайних точек зрения на проблему таксономического статуса «черных лесостепных гадюк» существуют и синтетические, формирующиеся и базирующиеся, как правило, на анализе локальных географических выборок и использовании данных, сопоставление которых не корректно по вполне объективным причинам. К сожалению, во многих работах, выполненных в последнем десятилетии прошлого века, мы не находим стройной аргументации в

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ГАДЮК

подтверждение той или иной точки зрения. Более того, зачастую даже невозможно определить, какую же позицию занимает исследователь, не признающий видовой самостоятельности *V. (P.) nikolskii*, в отношении статуса «черных гадюк» вообще и изучаемых локальных географических группировок в частности. Многие спорные вопросы в отношении видовой самостоятельности гадюки Никольского могут быть решены на современном этапе. Это становится возможным на основе изучения различий близкородственных видов на молекулярном уровне, анализа первичной структуры ДНК. Молекулярно-генетический анализ, в частности, способствовал решению вопросов дивергенции некоторых популяций ящериц и черепах (Гречко и др., 1998; Семенов и др., 2004).

Митохондриальные гены цитохрома *b* и 16S rRNA гадюки Никольского секвенированы ранее (Lenk et al., 2001), а информации по другим генам не существует. Большинство гадюк, предварительно идентифицированных по морфологическим признакам как *V. (P.) nikolskii*, при анализе результатов секвенирования фрагмента цитохрома *b* попали в группу «*berus*» (Калябина и др., 2003; Joger et al., 2003; Kalyabina-Nauf et al., 2004). Для более точного анализа требуется привлекать информацию о первичной структуре других участков митохондриальной ДНК как наиболее консервативной части генома, а также выявлять различие или сходство в организации хромосомной ДНК.

В данной работе сделана попытка определения степени генетического родства гадюки Никольского с другими видами рода на основании секвенирования и анализа митохондриальных генов НАДН-дегидрогеназы и 12S рибосомальной РНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящего исследования послужили ткани печени гадюк, собранных в весенне-летний период 2003 – 2005 гг. на территории Волгоградской, Саратовской и Самарской областей и Чувашской Республики (табл. 1).

Таблица 1

Выборки гадюк, включенные в исследование

№ п/п	Вид	Пол	Место и время сбора материала	Анализируемый ген
1	2	3	4	5
1	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii</i>	♂	Саратовская обл., Аркадакский р-н, окр. с. Летяжевка, 2005 г.	12S рРНК
2	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii</i>	♀	Саратовская обл., Аркадакский р-н, окр. с. Летяжевка, 2005 г.	12S рРНК, НАДН-дегидрогеназа
3	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii</i>	♂	Саратовская обл., Аркадакский р-н, окр. с. Ольшанка, 2003 г.	12S рРНК
4	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii</i>	♀	Саратовская обл., Лысогорский р-н, окр. с. Н. Пески, 2003 г.	12S рРНК, НАДН-дегидрогеназа
5	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii?</i>	♀	Самарская обл., Ставропольский р-н, окр. с. Жигули, 2005 г.	12S рРНК
6	Гадюка обыкновенная – <i>V. (P.) berus</i>	♀	Чувашская Республика, Алатырский р-н, окр. с. Атрать, 2005 г.	12S рРНК
7	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii?</i>	♀	Самарская обл., Ставропольский р-н, ур. Самарская Лука, 2003 г.	12S рРНК
8	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii?</i>	♂	Самарская обл., г. Самара (пос. Управленческий), 2003 г.	12S рРНК, НАДН-дегидрогеназа

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5
9	Гадюка восточная степная – <i>V. (P.) renardi</i>	♀	Волгоградская обл., окр. г. Камышин, 2005 г.	12S рРНК
10	Гадюка Никольского – <i>V. (P.) nikolskii</i>	♀	Саратовская обл., Аркадакский р-н, окр. с. Ольшанка, 2003 г.	НАДН-дегидрогеназа

Реактивы: Трис (Sigma), NaCl, ЭДТА, SDS, ацетат калия (Диа М), протеиназа К (AppliChem), Taq-полимераза, DNA-extraction Kit, DNA ladder Plus 100 bp (Fermentas), реакционная смесь DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing), Sample Loading Solution (Beckman Coulter).

Оборудование: программируемый амплификатор Терцик MC2 (ДНК-технология, Россия), автоматический 8-капиллярный секвенатор CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter).

ДНК выделяли из заспиртованных образцов печени гадюк. Вес каждого кусочка печени составлял около 100 мг. К измельченной животной ткани добавляли 500 мкл буфера для экстракции, содержащего 50 mM Трис-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 100 mM ЭДТА, 1% SDS и 40 мкл протеиназы К (10 мг/мл). Суспензию инкубировали при температуре 55°C в течение 3 ч с периодическим перемешиванием. После полного лизиса клеток суспензию охлаждали до комнатной температуры и проводили осаждение нуклеопротеидного комплекса этанолом. Для этого к клеточному лизату добавляли два с половиной объема охлажденного при минус 20°C 96% этанола в присутствии ионов K⁺ (конечная концентрация 0.3M ацетат калия). Центрифугировали в течение 10 мин при 6000 g. Осадок растворяли в 200 мкл деионизованной воды. Депротенинизацию проводили сначала фенолом, затем смесью фенол – хлороформ (1:1 по объему) и потом смесью хлороформ – изоамиловый спирт (24:1). Очищенную от белков ДНК трижды промывали охлажденным 70% этанолом. После отмывки ДНК подсушивали и растворяли в 200 мкл деионизованной воды.

По известным нуклеотидным последовательностям ДНК обыкновенной гадюки были подобраны следующие праймеры для проведения ПЦР: на ген 12S рРНК 5'-CTCAATAATAGTGAGACAGCC и 5'-GGTGTGTACGCTCCT CATTGC, на ген НАДН-дегидрогеназы 5'-GCATTTTCATGACCACCACC и 5'-GAGTGAGGGGTA-AGATAGAG. Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой Синтол (г. Москва).

Расчитанная температура отжига праймеров, вычисленная по формуле $2 \times (A+T) + 4 \times (C+G)$ составила 60°C для НАДН-дегидрогеназы и 64°C для 12S рибосомальной РНК. Расчетную температуру при постановке ПЦР понижали на 5°C для лучшего отжига праймера. Матрицу предварительно денатурировали при 94°C в течение 5 мин. Был использован следующий режим ПЦР: денатурация ДНК при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при 55°C для гена НАДН-дегидрогеназы и при 59°C для гена 12S рибосомальной РНК – 40 с, полимеризация при 72°C – 1 мин. На каждую реакцию использовали 3 ед. Taq-полимеразы. Всего проводили 35 циклов амплификации, по завершении последнего цикла проводили достройку цепей при 72°C в течение 5 мин. Результаты анализировали в 1 % агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса 100 bp DNA ladder Plus в качестве контроля. ПЦР-продукты очищали от оставшихся праймеров и нуклеотидов экстракцией

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ГАДЮК

фрагмента ДНК из агарозного геля и осаждением ДНК на частицах силикагеля с помощью коммерческого набора DNA-extraction Kit, используя соответствующий протокол.

Нуклеотидную последовательность обеих цепей генов 12S рНК и НАДН-дегидрогеназы митохондриальной ДНК гадюк определяли по методу Сенгера с детекцией флуоресцентно меченых продуктов ПЦР. Циклическое секвенирование очищенных двухцепочечных продуктов ПЦР выполнялось на программируемом амплификаторе Терцик МС2 с использованием реакционной смеси DTCS, содержащей полимеразу и флуоресцентно меченые нуклеотиды, в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

При постановке секвенирующих реакций к 2.5 мкл раствора ДНК, содержащего около 100 фмоль ДНК очищенного ПЦР-продукта, добавляли 12 мкл смеси DTCS и 0.5 мкл соответствующего праймера (30 пмоль/мкл) в каждую из реакций. Объём доводили деионизованной водой до 20 мкл. Секвенирующую реакцию проводили при следующем режиме: денатурация при 96°C – 20 с, отжиг праймера 50°C – 20 с, полимеризация 60°C – 4 мин. Всего проводили 30 циклов. Продукты секвенирующей реакции осаждали этанолом. Для этого их переносили в 0.5 мл пластиковую пробирку, добавляли 2 мкл 3М ацетата натрия (рН 5.2), 2 мкл 100 мМ ЭДТА, 1 мкл раствора гликогена (20мг/мл) и перемешивали. В каждую пробирку приливали по 60 мкл охлаждённого при –20°C 96% этанола, перемешивали и центрифугировали 15 мин при 6000 g. После центрифугирования супернатант удаляли, а осадок трехкратно промывали 70%-ным этанолом. Подсушивали осадок нуклеиновых кислот в течение 10 мин и растворяли в 40 мкл Sample Loading Solution.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе (лаборатория молекулярной биологии Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского) в режиме автоматического секвенирования и компьютерной записи нуклеотидной последовательности в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя оборудования. Последовательности комплементарных цепей секвенированного гена сочленяли вручную. Выравнивание проводили автоматически при помощи программы ClustalW.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из заспиртованных коллекционных экземпляров нескольких видов гадюк: Никольского, обыкновенной и восточной степной была выделена общая ДНК (хромосомная и митохондриальная). С помощью специально подобранных и синтезированных праймеров (Синтол, г. Москва) были получены ПЦР-продукты участков генов НАДН-дегидрогеназы и 12S рибосо-мальной рНК (рис. 1).

Полученные ПЦР-продукты очищали и использовали для секвенирования в качестве ДНК-матрицы в концентрации 100 фМ. В результате у 4 экземпляров гадюки Никольского из различных мест обитания была определена первичная структура участка митохондриального гена НАДН-дегидрогеназы размером 824 пн.

В двух группах была выявлена кластеризация *V. (P.) nikolskii* по гену НАДН-дегидрогеназы, в одну из которых попала обыкновенная гадюка (Gene Bank

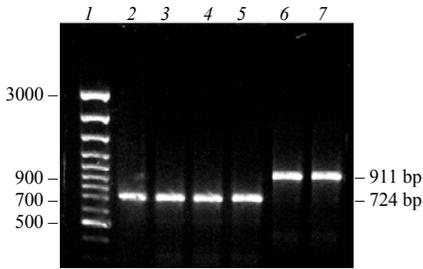


Рис. 1. Результаты ПЦР-амплификации: 1 – маркер молекулярного веса DNA ladder Plus 100 bp, 2 – 5 – ПЦР-продукт гена 12S рРНК (724 п.н.), 6 – 7 – ПЦР-продукт гена НАДН-дегидрогеназы (911 п.н.)

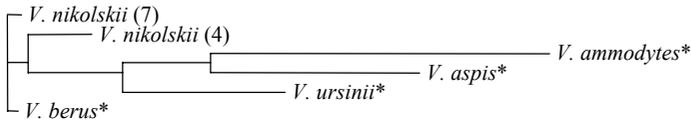


Рис. 2. Дендрограмма отношений гадюк, основанная на последовательности участка гена НАДН-дегидрогеназы. Звездочкой отмечены последовательности, взятые из базы данных Gene Bank

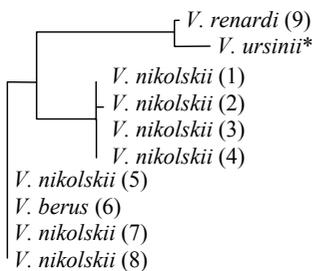


Рис. 3. Дендрограмма отношений гадюк, основанная на последовательности участка гена 12S рРНК. Звездочкой отмечена последовательность *V. ursinii*, взятая из Gene Bank AF236687

АУ321075). Полученная последовательность ДНК, выделенная из *V. (P.) nikolskii* из Самарской области, имеет очень высокую степень сходства (99.6%) с гаплотипом обыкновенной гадюки.

На рис. 2 показана дендрограмма, демонстрирующая генетическую дивергенцию между гадюками Никольского (по одному образцу из каждой группы), обыкновенной (АУ321075), западной степной (АУ321069), асписовой – *V. aspis* (АУ321086) и носатой – *V. ammodytes* (АУ321073).

Для более детального анализа у 8 образцов гадюки была определена первичная структура участка митохондриального гена 12S рРНК размером 669 п.н. В это число вошли уже ранее секвенированные экземпляры по участку гена НАДН-дегидрогеназы. Была обнаружена сходная кластеризация по двум группам, полученным ранее. В одну группу вошли *V. (P.) nikolskii* из Саратовской области, а в другую – *V. (P.) nikolskii* из Самарской области и *V. (P.) berus* из Чувашии (рис. 3).

Как видно из дендрограммы, уровень гетерогенности внутри групп полностью отсутствует

(Саратовская область) или крайне мал, что проявляется единичной заменой. Данные по различиям секвенированных нуклеотидных последовательностей представлены в табл. 2. Отдельную группу, как и следовало ожидать, образовали *V. (P.) renardi* (наши данные) и *V. ursinii* (Gene Bank AF236687).

Важно отметить, что максимальные различия для *V. (P.) nikolskii* из обеих групп по гену 12S рРНК составили 1.8%. Это, в свою очередь, более чем в два раза ниже различий с *V. (P.) renardi* каждой группы в отдельности. Различия составляют 4% для саратовской выборки и 3.88% для выборки Самарской области и Чувашии.

Гадюки из Самарской области входят в одну группу с *V. berus*. Данная закономерность была выявлена и в других работах по секвенированию митохондриальных генов гадюк (*cyt b*, 16S rRNA), в которых *V. (P.) nikolskii* также попала в группу «*berus*» (Калябина и др. 2003). Экземпляры *V. nikolskii* из Саратовской области попадают в

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИВЕРГЕНЦИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ГАДЮК

ской области попадают в отдельную группу вследствие значительных отличий в структуре проанализированных генов от первой группы.

Таблица 2

Сайты замен у гадюк по гену 12 S рРНК

	I	19	33	105	106	154	281	200	201	212	222	223	262	289	293	327	335	375	406	410	412		
<i>1. V. nik</i>	TATAAAC	G	T	A	C	G	C	A	A	A	T	G	T	C	G	G	A	T	A	C	C		
<i>2. V. nik</i>		
<i>3. V. nik</i>		
<i>4. V. nik</i>		
<i>5. V. nik</i>	A	G	.	.	.	T	G	.	.		
<i>6. V. ber</i>	A	G	.	.	.	T	G	.	.		
<i>7. V. nik</i>	A	G	.	.	.	T	G	.	.		
<i>8. V. nik</i>	A	G	.	.	.	T	G	.	.		
<i>9. V. ren</i>	A	.	.	.	T	T	G	G	C	A	C	T	A	A	C	C	.	.	.	T		
<i>10. V. u*</i>	A	C	.	.	A	T	T	G	G	C	A	C	T	A	A	C	C	.	.	T		
	444	461	497	508	513	514	533	551	574	579	584	585	604	618	644	654	655	663	665	666	669		
<i>1. V. nik</i>	T	G	T	T	G	T	T	T	A	A	G	-	A	T	T	A	A	-	G	G	G	G	TAA
<i>2. V. nik</i>	G
<i>3. V. nik</i>
<i>4. V. nik</i>
<i>5. V. nik</i>	A	C	.	A	.	G	.	.	C	C	A	A	.	.
<i>6. V. ber</i>	A	C	.	A	.	G	.	.	C	C	A	A	.	.
<i>7. V. nik</i>	A	C	.	A	.	G	.	.	C	C	A	A	.	.
<i>8. V. nik</i>	A	C	.	A	.	G	.	.	C	C	A	A	.	.
<i>9. V. ren</i>	C	C	C	C	.	C	A	A	C	A	A	A	.
<i>10. V. u*</i>	C	C	C	C	.	C	A	A	.	.	G	.	.	.	C	.	.	.	T	A	A	A	.

Примечание. *V. u.* – *V. ursinii* (Gene Bank AF23668).

Таким образом, по генетическим признакам популяция гадюк из саратовского Правобережья по ряду параметров высоко специфична, что позволяет провести северную границу видового ареала *V. (P.) nikolskii* по долине Саратовского водохранилища. Одновременно выявлена высокая специфичность всех изученных серий по отношению к средневожским гадюкам, которые приурочены пространственно к территории *V. (P.) berus* и, очевидно, должны быть отнесены к последнему виду.

Авторы выражают искреннюю благодарность доценту, кандидату биологических наук А.Г. Бакиеву и профессору, доктору биологических наук В.В. Аникину за оказанную помощь при сборе материала.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Антонов А.С.* Геносистематика от Чаргаффа и Белозерского до наших дней // Молекулярная биология. 2005. Т. 39, № 4. С. 581 – 589.
- 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.
- Гречко В.В., Рябинин Д.М., Федорова Л.В., Рудых И.А., Федоров А.Н., Рысков А.П., Семенова С.К., Даревский И.С.* Молекулярно-генетическая классификация и филогенетическое родство некоторых видов ящериц сем. Lacertidae на основании изучения специфичности распределения сайтов рестрикции в повторах ДНК // Молекулярная биология. 1998. Т. 32, № 1. С. 172 – 183.

Калябина С., Йюгер У., Орлов Н., Винк М. Филогения и систематика гадюковых змей комплекса «*Vipera berus*» // Змеи Восточной Европы: Материалы Междунар. конф. / Ин-т экологии Волж. бассейна РАН. Тольятти, 2003. С. 22 – 24.

Одинцова М.С., Юрина Н.П. Геномика и эволюция клеточных органелл // Генетика. 2005. Т. 41, № 9. С. 1170 – 1182.

Павлов С.Д., Колесников А.А., Мельников М.Н., Ушакова М.В. Генетическая дивергенция камчатской микижи (*Parasalmo (Oncorhynchus) mykiss*) на ареале по результатам рестрикционного анализа и секвенирования гена цитохрома *b* мтДНК // Генетика. 2004. Т. 40, №12. С. 1695 – 1701.

Семёнова С.К., Корсуненко А.В., Васильев В.А. RAPD-изменчивость средиземноморской черепахи *Testudo graeca* L. // Генетика. 2004. Т. 40, №12. С. 1628 – 1636.

Табачишин В.Г., Шляхтин Г.В., Завьялов Е.В., Сторожилова Д.А., Шепелев И.А. Морфометрическая дифференциация и таксономический статус пресмыкающихся сем. Colubridae и Viperidae // Фауна Саратовской области: Проблемы изучения популяционного биоразнообразия и изменчивости животных. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 1996. Т. 1, вып. 2. С. 39 – 70.

Dong S., Kumazawa Y. Complete mitochondrial DNA sequences of six snakes: phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features // J. Mol. Evol. 2005. Vol. 61, №1. P. 12 – 22.

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 Societas Europaea Herpetologica (SEH). Saint-Petersburg, 2003. P. 77.

Kalyabina-Hauf S., Schweiger S., Joger U., Mayer W., Wink M. Phylogeny and systematics of adders (*Vipera berus* complex) // Martensiella. 2004. №15. S. 7 – 16.

Kumazawa Y., Ota H., Nishida M., Ozawa T. The complete nucleotide sequence of a snake (*Dinodon semicarinatus*) mitochondrial genome with two identical control regions // Genetics. 1998. Vol. 150, №1. P. 313 – 329.

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

Lenk P., Kalyabina S., Wink M., Joger U. Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. Vol. 19, №1. P. 94 – 104.

Tabachishin V.G., Kaybeleva E.I., Zavalov E.V. Ecologo-caryological characteristics of *Vipera nikolskii* population in the north of the Lower Volga region // Programme and abstracts of 13 Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica (SEH). Bonn, Germany, 2005. P. 111 – 112.

**GENETIC DIVERGENCE OF SOME VIPERA SPECIES
(REPTILIA: VIPERIDAE, VIPERA)
FROM GENE SEQUENTIION OF NADN-DEHYDROGENASE
AND 12S RIBOSOMAL RNA**

**V.A. Velikov¹, R.V. Yefimov¹, E.V. Zavialov¹, P.E. Kuznetsov¹,
V.G. Tabachishin², G.V. Shlyakhtin¹, E.I. Kaybeleva¹**

¹ Chernyshevsky Saratov State University
Russia, 410012, Saratov, Astrakhanskaya str., 83
E-mail: v_velikov@mail.ru

² Saratov branch of A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS
Russia, 410028, Saratov, Rabochaya str., 24

The genes of NADN-dehydrogenase and 12S ribosomal RNA of *Vipera (Pelias) nikolskii*, *V. (Pelias) berus*, *V. (Pelias) renardi* from the Chuvash Republic, Volgograd, Saratov and Samara regions were sequenced. The size of the sequences obtained was 824 and 669 nucleotide pairs, respectively. This makes up practically the full nucleotide sequence of the said genes except short end fragments. According to the sequention results, all the samples fall into two groups, namely: *V. (P.) berus* from the Chuvash Republic and *V. (Pelias) nikolskii* from the Samara region – and *V. (P.) nikolskii* from the Saratov region.

Key words: *Vipera (Pelias) nikolskii*, *V. (P.) berus*, *V. (P.) renardi*, Volga region, Russian Federation.