

УДК [598.115.33:575](470.44/.47)

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИЙ СТЕПНОЙ ГАДЮКИ –  
*VIPERA RENARDI* (REPTILIA: VIPERIDAE)  
НИЖНЕГО ПОВОЛЖЬЯ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ  
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ  
ЦИТОХРОМА *b* И *c*, НАДН-ДЕГИДРОГЕНАЗЫ И 12S РИБОСОМНОЙ РНК**

**Е.В. Завьялов<sup>1</sup>, Р.В. Ефимов<sup>1</sup>, В.Г. Табачишин<sup>2</sup>, О.А. Помазенко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского  
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83  
E-mail: biofac@sgu.ru

<sup>2</sup> Саратовский филиал Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН  
Россия, 410028, Саратов, Рабочая, 24  
E-mail: tabachishinvg@sevin.ru

Поступила в редакцию 14.09.2008 г.

Рассматриваются генетические различия гадюковых змей с территории Поволжья и других регионов России на основе молекулярного анализа. Исследованные экземпляры гадюк рода *Vipera* по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей 12S рРНК разделились на три кластера. Первый образовали экземпляры *Vipera nikolskii* из Саратовской области. Второй сформировали экземпляры *V. berus* из Пензенской области. Степная гадюка образовала отдельный кластер. От гадюк из Саратовской области она отличается на 25 п.н., из которых 19 представлены транзигциями и 6-трансверсиями. От гадюк из Пензенской области отличается на 24 п.н., из которых 19 представлены транзигциями и 5-трансверсиями. В изученном фрагменте гена 12S рРНК у степной гадюки была обнаружена делеция размером 2 п.н., отсутствующая у двух первых групп. Следует отметить, что нуклеотидная последовательность степной гадюки с крайнего юго-востока саратовского Заволжья отличается на 5 нуклеотидов от остальных степных гадюк с севера саратовского Правобережья и Волгоградской области. Во всех сравнениях степная гадюка образовывала отдельный кластер. Она находилась практически на равном удалении как от гадюки Никольского, так и от обыкновенной гадюки. Полученные сведения рассматриваются нами как основа для дальнейших исследований по данной проблеме.

**Ключевые слова:** *Vipera*, *Vipera renardi*, *Vipera nikolskii*, *Vipera berus*, нуклеотидная последовательность, генетическая дистанция.

## ВВЕДЕНИЕ

Развитие молекулярной генетики на современном этапе способствует становлению филогенетики и генной систематики. Данные отрасли знаний находят применение при решении спорных вопросов относительно таксонов, систематический статус которых не был надежно установлен при использовании традиционных методов морфологического анализа. Одним из них является восточная степная гадюка *Vipera (Peliias) renardi* (Christoph, 1861), имеющая широкий ареал в Восточной Ев-

ропе и Западной Азии (Ананьева и др., 2004; Бакиев и др., 2004; Табачишина и др., 2007). Обширные современные морфологические исследования показали, что географические популяции гадюки с севера ее распространения в Поволжье высоко специфичны. Данное обстоятельство определяет вероятность (при накоплении дополнительных сведений) выделения их в отдельную группировку подвидового ранга (Завьялов и др., 2001; Табачишина и др., 2002). Однако на основании только морфологических, экологических и кариологических данных обоснованные выводы в этом

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ СТЕПНОЙ ГАДЮКИ

направлении сделать затруднительно (Великов и др., 2006; Завьялов и др., 2006). Поэтому дальнейшие исследования по данной тематике целесообразно проводить с привлечением методов молекулярной биологии.

Особую роль в таксономии животных приобрело сравнение нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов (Горбунова, Баранов, 1997; Чемерис и др., 1999; Калябина-Хауф, Ананьева, 2004; Семенова и др., 2004; Garrigues et al., 2005; Ursenbacher et al., 2006; Huang et al., 2007). Цель настоящего исследования заключалась в выявлении генетических различий между популяциями степной гадюки с территории Поволжья и других регионов России на основе анализа молекул ДНК. В задачи работ входил сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов цитохрома *b*, цитохрома *c*, НАДН-дегидрогеназы, 12S рРНК гадюк из районов сплошного распространения и окраинных поселений рептилий. При анализе микросателлитных локусов необходимо было определить и сравнить генотипы исследуемых экземпляров. Кроме того, ставилась задача определения степени генетического родства степной гадюки с другими видами рода на основании секвенирования и анализа митохондриальной ДНК.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для данной работы послужили образцы печени и крови гадюк (*Vipera renardi*), собранных на территории Саратовской, Волгоградской областей и Краснодарского края, хранящиеся в Зоологическом музее Саратовского государственного университета (табл. 1). Тотальную ДНК из них выделяли по стандартной 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 из международной базы 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). Анализ флуоресцентно-меченых продуктов амплификации микросателлитных локусов проводили с помощью генетического анализатора 3130XL (Applied Biosystems).

**Таблица 1**

Географическая и количественная характеристика сборов *Vipera renardi*, использованных в анализе

Место сбора	Кол-во
Саратовская область	
Хвалынский район, окрестности с. Ст. Лебежайка	2
Александровогайский район, окрестности с. Ветелки	2
Волгоградская область	
Камышинский район, окрестности г. Камышина	1
Краснодарский край	
Ейский район, окрестности пос. Ясенская Переправа	1
Горячключевской район, окрестности пос. Молькино	1

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования межвидовых взаимоотношений степной гадюки с другими видами этого рода было решено использовать сравнение нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов цитохрома *b*, цитохрома *c*, НАДН-дегидрогеназы и 12S рРНК. На основе сравнения нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b*

*V. renardi*, *V. nikolskii*, *V. berus* и *V. barani* были рассчитаны генетические дистанции (табл. 2). В ходе анализа использовался также ген НАДН-дегидрогеназы. При этом сравнивались нуклеотидные последовательности степной гадюки с последовательностями гадюк Никольского и обыкновенной. Различия между ними составили 40 п.н.

**Таблица 2**

Уровень генетических различий между видами гадюковых змей рода *Vipera* по цитохрому *b*

Вид	Вид			
	<i>V. berus</i>	<i>V. nikolskii</i>	<i>V. barani</i>	<i>V. renardi</i>
<i>V. berus</i>	0.000	–	–	–
<i>V. nikolskii</i>	0.005	0.000	–	–
<i>V. barani</i>	0.020	0.018	0.000	–
<i>V. renardi</i>	0.027	0.025	0.018	0.000

На следующем этапе работ анализировались нуклеотидные последовательности митохондриального гена цитохром *c* оксидазы. Для сравнения были взяты нуклеотидные последовательности фрагмента гена CO III (733 п.н.) гадюки Никольского из Саратовской области, а также обыкновенные гадюки из Пензенской области (Ефимов и др., 2007). Постановка секвенирующей реакции проводилась с использованием 2 мкл очищенной ДНК, 3.2 пМ каждого праймера и набора DTCS (Beckman Coulter). Определение нуклеотидной последовательности было выполнено на автоматическом секвенаторе SEQ 2000 XL в режиме автоматического секвенирования на базе лаборатории молекулярной биологии Саратовского госуниверситета. Секвенированные нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей были сочленены вручную.

Для определения генетических дистанций между исследованными экземплярами использовали величину *r*-дистанций. Для исследованных экземпляров дистанции рассчитывались с помощью программы MEGA 4 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Tamura et al., 2007). Полученные результаты сведены в табл. 3.

На основе полученных результатов было построено «филогенетическое дерево»

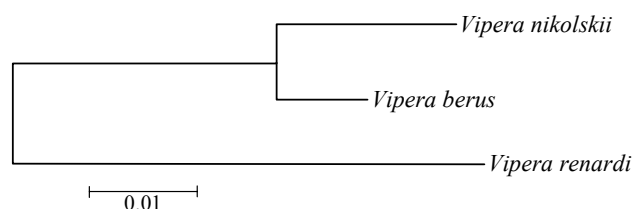
(рис. 1). Экземпляр степной гадюки образовал отдельный кластер, что свидетельствует о принадлежности данного экземпляра к самостоятельному виду (Ефимов и др., 2008).

**Таблица 3**

Генетические дистанции гадюк рода *Vipera*, рассчитанные на основе анализа нуклеотидной последовательности CO III

Вид	Вид		
	<i>V. renardi</i>	<i>V. nikolskii</i>	<i>V. berus</i>
<i>V. renardi</i>	0.000	–	–
<i>V. nikolskii</i>	0.079	0.000	–
<i>V. berus</i>	0.071	0.026	0.000

На следующем этапе анализировались нуклеотидные последовательности митохондриального гена 12S рРНК. Для проведения амплификации его фрагмента были использованы праймеры, подобранные по нуклеотидной последовательности степной гадюки из базы данных Genebank (EF012817). Помимо нуклеотидных последовательностей *V. renardi* для сравнения использовались гадюки Никольского и обыкновенная из Саратовской и Пензенской областей.



**Рис. 1.** «Филогенетическое дерево», построенное по данным нуклеотидной последовательности фрагмента гена CO III с использованием метода минимальной эволюции

Все исследованные экземпляры гадюк по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей 12S рРНК разделились на три кластера. Первый кластер образовали экземпляры гадюки Никольского из Саратовской области. Второй сформировали экземпляры гадюки обыкновенной из Пензенской области. Степная гадюка образовала отдельный кластер. При попарном ее сравнении с представителями первых двух групп были получены следующие результаты. От *V. nikolskii* из Саратовской области она от-

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ СТЕПНОЙ ГАДЮКИ

личается на 25 п.н., из которых 19 представлены транзициями и 6 трансверсиями. От *V. berus* из Пензенской области отличается на 24 п.н., из которых 19 представлены транзициями и 5 трансверсиями. В изученном фрагменте гена 12S рРНК у степной гадюки была обнаружена делеция размером 2 п.н., отсутствующая у двух первых групп. Следует отметить, что нуклеотидная последовательность степной гадюки из Александрово-гайского района отличается на 5 нуклеотидов от остальных степных гадюк из саратовского Заволжья и Волгоградской области. Во всех сравнениях степная гадюка образовывала отдельный кластер. Она находилась практически на равном удалении как от гадюки Никольского, так и от обыкновенной гадюки.

Митохондриальная ДНК в связи с материнским характером наследования не позволяет анализировать гибридные особи. Большим подспорьем в данной ситуации является изучение ядерной ДНК. Наиболее часто используемыми ядерными маркерами для анализа генетического полиморфизма популяций являются микросателлитные локусы (Сингер, Берг, 1998; Иванов, Киселев, 2005). В связи с этим для исследования внутривидовой вариабельности гадюк и анализа возможности гибридизации было решено использовать микросателлитные локусы. Для степных гадюк из Саратовской, Волгоградской областей и Краснодарского края исследован микросателлитный локус 7 – 87. Выявлены следующие генотипы: Ren1 – 154, 166, Ren2 – 160, 170, Ren3 – 154, Ren4 – 172, 174 п.н. (рис. 2).

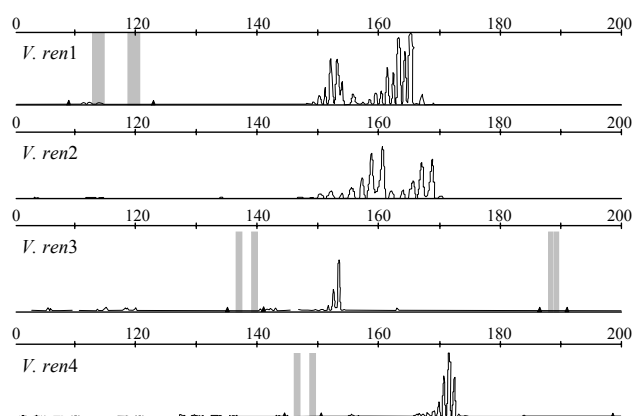
### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе осуществленных исследований впервые удалось секвенировать ген цитохрома *c* оксидазы для степной гадюки и депонировать полученные материалы в базу данных Genebank:

LOCUS EU625371 733 bp DNA linear VRT  
05-APR-2008

1 csaagcccat gacctcttac gggggcagca agctcactac  
ttctagcctc aggttttagcc

61 ctgtggttcc atacaacttc aacaattgta ttgaagttag  
gtttacttac catctcccta  
121 accctcatcc aatgggtgacg cgatgtagtt cga-  
gaaagca cctaccaagg acatcacacc  
181 acaggcgtcc aaaaaaacat acgctacggc ataatcc-  
tat tcattacatc agaagtttcc  
241 ttttctctgg ggttctctg gacgctatac catgttagcc  
tggtagccac cccagaacta  
301 ggtgcagagt gaccgccaac tggcatctcc  
ccctaaacc ctatagacgt cctctactt  
361 aacctgcag ttctactatc atctggggca acaattact  
gatctacca ctcttaata  
421 aaaggaaca agaaagaagc aacctatgct  
ctaataatca ctattatact cgggtgttac  
481 ttacagccc tcaagtatc agaatatata gacaccccat  
ttaccatctc agacagcgta  
541 tacgggtcat tatttttgt agctacaggt ttccatggcc  
tccatgttat aatcggaacc  
601 tcattcttac taactgcct aatacgcta attaagtcc  
acttacaac caccaccac  
661 ttggatagc aagcagcaat ctgatattga cacttcgtag  
acatcgtatg acttttecta  
721 tatattcag tat



**Рис. 2.** Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР микросателлитного локуса 7 – 87 для степных гадюк из Волгоградской области (*V. ren1* – 2), Краснодарского края (*V. ren3*) и Хвалынского района Саратовской области (*V. ren4*)

На данном этапе исследований пока не представляется возможным более точно определить таксономическое положение поволжских популяций восточной степной гадюки. Однако полученные сведения рассматриваются нами как основа для дальнейших исследований по данной проблеме. Кроме то-

го, выявленные генетические различия между восточной степной гадюкой и другими таксонами рода служат еще одним доказательством их видовой самостоятельности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьева Н.Б., Орлов Н.Л., Халиков Р.Г., Даревский И.С., Рябов С.А., Барабанов А.В. 2004. Атлас пресмыкающихся Северной Евразии (таксономическое разнообразие, географическое распространение и природоохранный статус) / Зоол. ин-т РАН. СПб. 232 с.
- Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. 2004. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Изд-во Самар. науч. центра РАН. 192 с.
- Великов В.А., Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Кузнецов П.Е., Табачишин В.Г., Шляхтин Г.В., Кайбелева Э.И. 2006. Генетическая дивергенция некоторых видов гадюк (Reptilia: Viperidae, *Vipera*) по результатам секвенирования генов НАДН-дегидрогеназы и 12S рибосомальной РНК // Современная герпетология. Т. 5/6. С. 41 – 49.
- Горбунова В.Н., Баранов В.С. 1997. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. СПб.: Специальная литература. 287 с.
- Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Великов В.А., Табачишин В.Г. 2007. Предварительные данные о генетической дифференциации нижеволжских популяций гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*, Viperidae) по результатам секвенирования генов 12S рибосомной РНК и цитохромоксидазы III // Современная герпетология. Т. 7, вып. 1/2. С. 69 – 75.
- Ефимов Р.В., Завьялов Е.В., Табачишин В.Г. 2008. Аспекты экологической сегрегации и технология видовой идентификации гадюковых змей (Reptilia: Viperidae, *Vipera*) в Поволжье на основе генотипирования // Поволж. экол. журн. № 2. С. 147 – 153.
- Завьялов Е.В., Табачишин В.Г., Шляхтин Г.В. 2001. Современное распространение и морфологическая характеристика степной гадюки (*Vipera ursinii*) в Поволжье // Вопросы герпетологии. М.: Изд-во МГУ. С. 101 – 104.
- Завьялов Е.В., Кайбелева Э.И., Табачишин В.Г. 2006. Сравнительная кариологическая характеристика гадюки Никольского (*Vipera (Peliias) nikolskii*) из пойм малых рек Волжского и Донского бассейнов // Современная герпетология. Т. 5/6. С. 100 – 103.
- Иванов В.И., Киселев Л.Л. 2005. Геномика – медицина. М.: Академкнига. 392 с.
- Калябина-Хауф С.А., Ананьева Н.Б. 2004. Филогеография и внутривидовая структура широкоареального вида ящериц *Lacerta agilis* L. 1758 (Lacertidae, Sauria, Reptilia) (опыт использования митохондриального гена цитохрома *b*) / Зоологический ин-т РАН. СПб. 108 с.
- Семенова С.К., Корсуненко А.В., Васильев В.А., Перешкольник С.Л., Мазанаева Л.Ф., Банникова А.А., Русков А.П. 2004. RAPD-изменчивость средиземноморской черепахи *Testudo graeca* L. (Testudinidae) // Генетика. Т. 40, № 12. С. 1628 – 1636.
- Сингер М., Берг П. 1998. Гены и геномы. М.: Мир. 391 с.
- Табачишина И.Е., Табачишин В.Г., Завьялов Е.В. 2002. Морфо-экологическая характеристика нижеволжских популяций степной гадюки (*Vipera ursinii*) // Поволж. экол. журн. №1. С. 76 – 81.
- Табачишина И.Е., Табачишин В.Г., Шляхтин Г.В. 2007. К уточнению северной границы распространения восточной степной гадюки (*Vipera renardi*) в Поволжье // Поволж. экол. журн. №3. С. 271 – 277.
- Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. 1999. Секвенирование ДНК. М.: Наука. 429 с.
- Garrigues T., Dauga C., Ferquel E., Choumet V., Failloux A. 2005. Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* population // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 35, №1. P. 35 – 47.
- Huang S., He S., Peng Z., Zhao K., Zhao E. 2007. Molecular phylogeography of endangered sharp-snouted pitviper (*Deinagkistrodon acutus*; Reptilia, Viperidae) in Mainland China // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 44, № 3. P. 942 – 952.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor. 381 p.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA Sequencing with Chain-Termination Inhibitors // Proc. of the National Academy of Sciences USA. Vol. 74. P. 5436 – 5467.
- Tamura K., Dudley J.L., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 // Molecular Biology and Evolution. Vol. 24, № 8. P. 1596 – 1599.
- Ursenbacher S., Conelli A., Golay P., Monney J., Zuffi M.A., Thiery G., Durand T., Fumagalli L. 2006. Phylogeography of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Alps // Molecular Biology and Evolution. Vol. 23, № 12. P. 2400 – 2410.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ СТЕПНОЙ ГАДЮКИ

*pera aspis*) inferred from mitochondrial DNA sequence data: Evidence for multiple Mediterranean

refugial areas // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 38, № 2. P. 546–552.

### GENETIC CHARACTERISTICS OF *VIPERA RENARDI* (REPTILIA: VIPERIDAE) POPULATIONS IN THE LOWER-VOLGA REGION AND ADJACENT TERRITORIES FROM SEQUENCING OF MITOCHONDRIAL GENES OF CYTOCHROME *b* AND *c*, NADN-DEHYDROGENASE AND 12S RIBOSOMIC RNA

E.V. Zavialov<sup>1</sup>, R.V. Yefimov<sup>1</sup>, V.G. Tabachishin<sup>2</sup>, and O.A. Pomazenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chernyshevsky Saratov State University  
83 Astrakhanskaya Str., Saratov 410012, Russia  
E-mail: biofac@sgu.ru

<sup>2</sup> Saratov branch of Severtsov Institute of problems of ecology and evolution,  
Russian Academy of Sciences  
24 Rabochaya Str., Saratov 410028, Russia  
E-mail: tabachishinvg@sevin.ru

Genetic distinctions of viper snakes in the Volga region and other regions of Russian Federation are considered on the basis of molecular analysis. The examined specimens from the *Vipera* genus were divided into three clusters by comparison of their nucleotide sequences 12S rRNA. The first one is formed by the *Vipera nikolskii* specimens from the Saratov region. The second one is generated by the *V. berus* specimens from the Penza region. *V. renardi* forms a separate cluster. It differs from the Saratov region vipers by 25 p.n., of which 19 are presented as transitions and 6 ones are transversions. It differs from the Penza region vipers by 24 p.n., of which 19 are presented as transitions and 5 are transversions. In the examined fragment of the 12S rRNA gene in *V. renardi* a deletion was found out of a 2 p.n. size, absent in the two first groups. It is necessary to note that the nucleotide sequence of *V. renardi* from the extreme southeast of the Saratov Trans-Volga region differs by 5 nucleotides from the other steppe vipers from the Northern Saratov Right-Volga-bank and Volgograd regions. In all the comparisons, *V. renardi* forms a separate cluster. It was practically at an equal distance from both *V. nikolskii* and *V. berus*. The obtained information is considered by us as a basis for further research on the problem.

**Key words:** *Vipera*, *Vipera renardi*, *Vipera nikolskii*, *Vipera berus*, nucleotide sequence, genetic distance.