

УДК [598.115.33:575](470.44/.47)

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
НИЖНЕВОЛЖСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ГАДЮКИ НИКОЛЬСКОГО
(*VIPERA NIKOLSKII*, VIPERIDAE)
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОВ
12S РИБОСОМНОЙ РНК И ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ III**

Р.В. Ефимов¹, Е.В. Завьялов¹, В.А. Великов^{1,2}, В.Г. Табачишин³

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

² *Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
Россия, 410049, Саратов, Пр. Энтузиастов, 13*

³ *Саратовский филиал Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Россия, 410028, Саратов, Рабочая, 24*

Поступила в редакцию 14.02.2007 г.

ВВЕДЕНИЕ

Гадюки рода *Vipera* остаются объектом особого внимания исследователей на протяжении многих лет. Широкая морфологическая изменчивость, экологическая пластичность и относительно высокие темпы эволюции этих гадюк обусловили их статус как традиционного модельного объекта, на котором апробируются методы, используемые в систематике и популяционной экологии. Тем не менее единого мнения в отношении таксономического статуса большинства изучаемых видов или подвидов гадюк не существует (Ананьева и др., 2004; Кузьмин, Семенов, 2006; Handbuch der Reptilien..., 2005). Не является исключением и гадюка Никольского (*Vipera nikolskii* Vedmederj, Grubant, Rudaeva, 1986), описанная с северо-восточной части Украины (Ведмедеря и др., 1986) и широко распространенная в пойменных и сопредельных биотопах в лесостепной и северной части степной зоны Восточной Европы (Завьялов и др., 2003; Табачишин, Завьялов, 2003; Табачишин и др., 2003; Ананьева и др., 2004; Шляхтин и др., 2006 и др.). Многие спорные вопросы таксономического статуса отдельных географических популяций гадюки Никольского могут быть решены на современном этапе. Это становится возможным на основе изучения различий близкородственных видов на молекулярном уровне, анализа первичной структуры ДНК.

В настоящее время полиморфизм нуклеотидной последовательности митохондриальных генов используется для изучения процессов эволюции и реконструкции филогении различных родов и видов животных (Одинцова, Юрина, 2005; Kumazawa et al., 1998; Dong, Kumazawa, 2005). Молекулярно-генетический анализ, в частности, способствовал решению вопросов дивергенции некоторых популяций пресмыкающихся, например ящериц (Гречко и др., 1998; Ананьева, Калябина-Хауф, 2006). Материнский характер наследования, отсутствие рекомбинаций, высокий уровень изменчивости – эти уникальные свойства делают митохондриальную

ДНК высокоинформативным инструментом генетического анализа. Так, для определения филогенетических отношений различных видов змей используются результаты секвенирования нескольких митохондриальных генов: цитохром b, 16S рРНК и НАДН-дегидрогеназы (субъединица 2) (Garrigues et al., 2005; Ussenbacher et al., 2006;). Митохондриальные гены цитохрома b и 16S рРНК гадюки Никольского секвенированы ранее (Lenk et al., 2001), а информация по другим генам на современном этапе отсутствует.

Настоящее исследование является продолжением работ по изучению внутривидовой изменчивости гадюк Волжского бассейна на основе секвенирования митохондриальных генов (Великов и др., 2006 а, б). Оно посвящено определению степени генетического родства гадюки Никольского с другими видами рода, обитающими в регионе, на основании секвенирования и анализа митохондриальных генов 12S рибосомной РНК и цитохромоксидазы III.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящего исследования послужили образцы ткани печени гадюк обыкновенной (*Vipera berus*), Никольского (*V. nikolskii*) и восточной степной (*V. renardi*), собранные в 2003 – 2006 гг. на территории Волгоградской, Пензенской, Самарской и Саратовской областей, Чувашской Республики и Республики Мордовия (рис. 1, табл. 1).

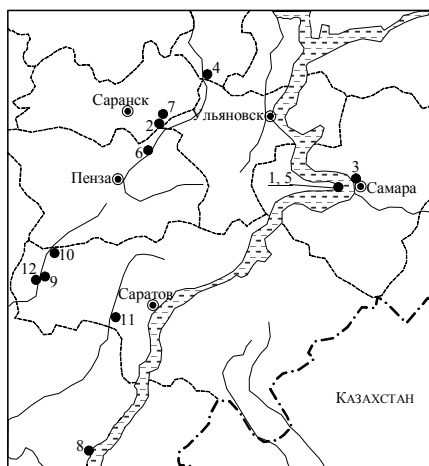


Рис. 1. География сбора гадюк на исследуемой территории. Географическую привязку см. в табл. 1

ДНК выделяли из заспиртованных образцов печени гадюк. Вес каждого фрагмента печени составлял около 100 мг. К измельченной животной ткани добавляли 500 мкл буфера для экстракции, содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 200 мМ NaCl, 100 мМ 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 -20°C 96% этанола в присутствии ионов K⁺ (конечная концентрация 0.3М ацетат калия). Затем образцы

центрифугировали в течение 10 мин при 6000 г, осадок растворяли в 200 мкл деионизированной воды. Депротенинизацию проводили сначала фенолом, затем последовательно смесью фенол-хлороформа (1:1 по объему) и смесью хлороформ-изоамилового спирта (24:1). Очищенную от белков ДНК трижды промывали охлажденным 70% этанолом. После отмывки ДНК подсушивали и растворяли в 200 мкл деионизированной воды.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Для ПЦР использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: на ген 12S рРНК 5'-CTCAATAATAGTGAGACAGCC и 5'-GGTGTGTACGCTCCTCATTTGC, на ген CO3 5'-AATGACTCACCAGCTACACC и 5'-GGAGCCTCATCAGTATACTG.

Таблица 1

Выборки гадюк, включенные в исследование

№	Вид	Пол	Место и дата сбора	Код
1	<i>V. nikolskii</i> ?	♀	Самарская обл., Ставропольский р-н, урочище «Самарская Лука», 2003 г.	VNSam(1)
2	<i>V. berus</i>	♂	Республика Мордовия, Большеберезниковский р-н, окр. с. Судосево, 2006 г.	VbMor(1)
		♀		VbMor(2)
3	<i>V. nikolskii</i> ?	♂	Самарская обл., г. Самара (пос. Управленческий), 2003 г.	VNSam(2)
4	<i>V. berus</i>	♀	Чувашская Республика, Алатырский р-н, окр. с. Атрать, 2005 г.	VbChuv
5	<i>V. nikolskii</i> ?	♀	Самарская обл., Ставропольский р-н, окр. с. Жигули, 2005 г.	VNSam
6	<i>V. berus</i>	♂	Пензенская обл., Лунинский р-н, с. Белый Ключ, 2006 г.	VbPen(1)
		♀		VbPen(2)
		♂		VbPen(3)
7	<i>V. berus</i>	♂	Республика Мордовия, Чамзинский р-н, окр. с. Киржеваны (пойма р. М. Кша), 2006 г.	VbMor
8	<i>V. renardi</i>	♀	Волгоградская обл., окр. г. Камышин, 2005 г.	Vren
9	<i>V. nikolskii</i>	♀	Саратовская обл., Аркадакский р-н, окр. с. Летяжевка (пойма р. Хопер), 2005 г.	VNSar(1)
		♂		VNSar(2)
		♂	2006 г.	VNSar(3)
10	<i>V. nikolskii</i>	♀	Саратовская обл., Ртищевский р-н, окр. с. Подгоренка (пойма р. Хопер), 2006 г.	VNSar(4)
		♀		VNSar(5)
		♂		VNSar(6)
11	<i>V. nikolskii</i>	♂	Саратовская обл., Лысогорский р-н, окр. с. Урицкое (пойма р. Медведица), 2006 г.	VNSar(7)
		♀		VNSar(8)
12	<i>V. nikolskii</i>	♂	Саратовская обл., Аркадакский р-н, окр. с. Ольшанка (пойма р. Хопер), 2003 г.	VNSar(9)
		♀		VNSar(10)

Режим ПЦР: денатурация при +94°C (30 с), отжиг праймеров при +59°C (40 с), полимеризация при +72°C (1 мин). Результаты анализировали в 1% агарозном геле с использованием маркера молекулярного веса 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) в качестве контроля. Нуклеотидные последовательности митохондриальной ДНК гадюк определяли по методу Сенгера с детекцией флуоресцентно меченых продуктов ПЦР. Циклическое секвенирование очищенных двухцепочечных продуктов ПЦР выполнялось на программируемом амплификаторе Терцик MC2 с использованием реакционной смеси DTCS, содержащей полимеразу и флуоресцентно меченые нуклеотиды, в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе (лаборатория молекулярной биологии Саратовского госуниверситета) 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

С помощью специально подобранных праймеров были получены ПЦР-продукты фрагментов гена 12S рибосомной РНК и цитохромоксидазы (субъединицы 3) CO III. Полученные ПЦР-продукты очищали и использовали в качестве

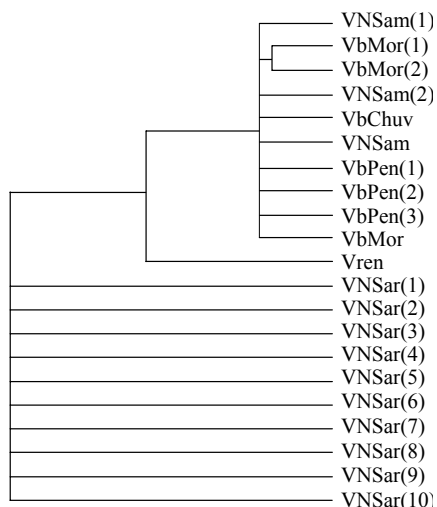


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное по данным о нуклеотидных последовательностях фрагмента гена 12S рибосомной РНК. Условные обозначения см. в табл. 1

матрицы для секвенирования. В результате у 21 экземпляра трех видов гадюк из различных мест обитания исследуемой территории была определена первичная структура фрагментов митохондриальных генов 12S рибосомной РНК и CO III.

Общая длина выравнивания для гена 12S рибосомной РНК составила 669 п.н. В результате применения кластерного анализа изученные образцы гадюк разделились на две группы (рис. 2). Первую группу образовали гадюки из саратовского Правобережья, которые соответствуют описанию *V. nikolskii*, а их обитание приурочено к указанному для данного вида ареалу. Гадюки, формирующие вторую группу, в особенности из Чувашской Республики и Республики Мордовия, приурочены пространственно в своем обитании к области распространения *V. berus* и в целом соответствуют описанию указанного вида.

Наибольший уровень дивергенции между двумя группами составил 12 п.н. (уровень гомологии 98.2%). При этом у одного экземпляра *V. nikolskii* из Саратовской области (Ардадакский район) выявлена единичная замена A/G в положении 574 по сравнению с группой, а у двух экземпляров обыкновенной гадюки из Республики Мордовия выявлена единичная замена T/A в положении 294 по сравнению с группой (табл. 2). Одновременно выявлена высокая специфичность восточной степной гадюки по отношению к гадюке Никольского и обыкновенной гадюке (см. рис. 2).

Таблица 2

Сайт замен у гадюк по гену 12S рибосомной РНК

	2	2	2	4	5	5	5	5	5	6	6	6	6
	1	1	8	9	0	1	1	5	7	7	0	1	6
	9	2	9	4	6	3	4	1	4	9	4	8	5
VNSam(1)	A	G	T	T	G	A	C	A	A	G	C	C	A
VbMor(1), VbMor(2)	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VNSam(2), VbChuv, VNSam, bPen(1)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VbPen(2), VbPen(3), VbMor	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VNSar(1)	G	A	C	.	A	G	T	T	G	A	T	T	G
VNSar(2 – 10)	G	A	C	.	A	G	T	T	.	A	T	T	G

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Общая длина выравнивания для гена CO III составила 674 п.н. Нуклеотидная последовательность гена CO III, как и ожидалось, оказалась менее консервативной (по сравнению с геном 12S рибосомной РНК). В результате сравнения выявлена сходная кластеризация по двум группам, как и для гена 12S рибосомной РНК (рис. 3). При этом у двух экземпляров *V. nikolskii* из Саратовской области (Лысогорский район) обнаружены единичные замены Т/С в положении 467, а у таковых из Ртищевского района – единичная замена Г/А в положении 369 по сравнению с группой (табл. 3). В целом различия между двумя группами составили 19 п.н., что соответствует 97.18% гомологии.

В качестве внешней группы была выбрана восточная степная гадюка, для которой также были определены нуклеотидные последовательности генов 12S рибосомной РНК и цитохромоксидазы III. По результатам сравнения нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов восточной степной гадюки с двумя группами было выявлено, что наиболее удаленными оказались черные лесостепные гадюки из Саратовской области. Различия составили 28 и 58 п.н. для этой группы и 25 и 52 п.н. – для другой группы по генам 12S рибосомной РНК и CO III соответственно по сравнению со степной гадюкой. В итоге анализ нуклеотидной последовательности фрагментов генов 12S рибосомной РНК и CO III выявил значительную консервативность внутри групп по сравнению с *V. renardi*.

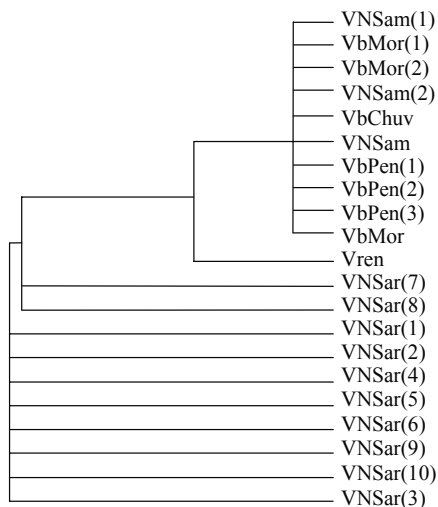


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное по данным о нуклеотидных последовательностях фрагмента гена CO III.

Условные обозначения см. в табл. 1

Таблица 3

Сайт замен у гадюк по гену CO III

	1	1	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	5	6	6	6				
	2	2	4	5	9	4	4	8	2	3	6	8	6	6	2	4	9	4	1	6
	0	2	4	6	2	0	9	8	7	6	9	0	7	8	4	2	6	8	4	2
1	A	C	C	T	G	A	A	C	T	A	G	G	T	G	C	A	C	A	G	A
VbMor(1),VbMor(2),VNSam(2), VbChuv, VNSam, VbPen(1), VbPen(2), VbPen(3), VbMor	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
VNSar(1, 2, 4, 5, 6, 9, 10)	C	T	T	C	A	G	G	T	C	G	.	A	C	A	T	G	T	G	A	G
VNSar(3)	C	T	T	C	A	G	G	T	C	G	A	A	C	A	T	G	T	G	A	G
VNSar(7), VNSar(8)	C	T	T	C	A	G	G	T	C	G	.	A	.	A	T	G	T	G	A	G

Таким образом, результаты проведенного нами исследования показали, что по генетическим признакам популяции гадюк Никольского из саратовского Правобережья

режья высокоспецифичны. Эти результаты согласуются с имеющимися данными по кариотипам изученных гадюк региона (Завьялов и др., 2006; Zavialov et al., 2006). Исходя из этого, северную границу видового ареала *V. nikolskii* следует проводить по границе Саратовского и Волгоградского водохранилищ. Средневолжские гадюки, которые приурочены пространственно к территории *V. berus* должны быть отнесены к указанному виду.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность доцентам, кандидатам биологических наук А.Г. Бакиеву и А.Б. Ручину, а также профессору, доктору биологических наук В.В. Аникину за оказанную помощь при сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ананьева Н.Б., Калябина-Хауф С.А. К вопросу о горных кольцехвостых агамах комплекса «*Laudakia caucasia*» // Современная герпетология. 2006. Т. 5/6. С. 5 – 17.
- Ананьева Н.Б., Орлов Н.Л., Халиков Р.Г., Даревский И.С., Рябов С.А., Барабанов А.В. Атлас пресмыкающихся Северной Евразии (таксономическое разнообразие, географическое распространение и природоохранный статус) / Зоол. ин-т РАН. СПб., 2004. 232 с.
- Ведмедеря В.И., Грубант В.Н., Рудаева А.В. К вопросу о названии черной гадюки европейской части СССР // Вестн. Харьк. ун-та. 1986. №288. С. 83 – 85.
- Великов В.А., Ефимов Р.В., Назаров А.К., Кузнецов П.Е. ПЦР-амплификация и секвенирование генов НАДН-дегидрогеназы и 12S рибосомальной РНК гадюки Никольского (*Vipera nikolskii*) // Вестн. Саратов. гос. агроуниверситета им. Н.И. Вавилова. 2006. №3. С. 3 – 7.
- 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.
- 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.
- Завьялов Е.В., Табачишин В.Г., Шляхтин Г.В. Современное распространение рептилий (Reptilia: Testudines, Squamata, Serpentes) на севере Нижнего Поволжья // Современная герпетология. 2003. Т. 2. С. 52 – 67.
- Завьялов Е.В., Кайбелева Э.И., Табачишин В.Г. Сравнительная кариологическая характеристика гадюки Никольского (*Vipera (Pelias) nikolskii*) из пойм малых рек Волжского и Донского бассейнов // Современная герпетология. 2006. Т. 5/6. С. 100 – 103.
- Кузьмин С.Л., Семенов Д.В. Конспект фауны земноводных и пресмыкающихся России. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2006. 139 с.
- Одинцова М.С., Юрина Н.П. Геномика и эволюция клеточных органелл // Генетика. 2005. Т. 41, №9. С. 1170 – 1182.
- Табачишин В.Г., Завьялов Е.В. Распространение гадюки Никольского на юге Подольской возвышенности // Поволж. экол. журн. 2003. №2. С. 202 – 203.
- Табачишин В.Г., Табачишина И.Е., Завьялов Е.В. Современное распространение и некоторые аспекты экологии гадюки Никольского на севере Нижнего Поволжья // Поволж. экол. журн. 2003. №1. С. 82 – 86.
- Шляхтин Г.В., Табачишин В.Г., Завьялов Е.В., Табачишина И.Е. Редкие и исчезающие виды амфибий и рептилий, рекомендуемые к внесению во второе издание Красной книги Саратовской области // Поволж. экол. журн. 2006. Вып. спец. С. 78 – 83.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ

Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Schlangen (Serpentes) III / Her. von U. Joger und N. Stümpel. Wiebelsheim: AULA-Verlag, 2005. 416 s.

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.

Garriguesa T., Daugab C., Ferquelc E., Choumetd V., Faillouxa A. Molecular phylogeny of *Vipera* Laurenti, 1768 and the related genera *Macrovipera* (Reuss, 1927) and *Daboia* (Gray, 1842), with comments about neurotoxic *Vipera aspis aspis* populations // Mol. Phylogenet. Evol. 2005. Vol. 35. P. 35 – 47.

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.

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.

Ursenbacher S., Carlsson M., Helfer V., Tegelstrom H., Fumagalli L. Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data // Molecular Ecology. 2006. Vol. 15. P. 3425 – 3437.

Zavialov E., Kaybeleva E., Tabachishin V. A comparative karyological study of *Vipera* (*Pelias*) *nikolskii* (Serpentes, Viperidae) from flooded lands of Volga and Don basin rivers // Riassunti del 6 Congresso nazionale della Societas Herpetologica Italica. Roma: Stilgrafica, 2006. P. 50.

PRELIMINARY DATA ON GENETIC DIFFERENTIATION OF THE LOW-VOLGA POPULATIONS OF FOREST-STEPPE VIPER (*VIPERA NIKOLSKII*, VIPERIDAE) FROM SEQUENATION OF 12S GENES OF RIBOSOMAL RNA AND CYTOCHROMOXIDAZE III

R.V. Yefimov¹, E.V. Zavialov¹, V.A. Velikov^{1,2}, V.G. Tabachishin³

¹ Chernyshevsky Saratov State University
Astrakhanskaya Str., 83, Saratov, 410012, Russia
E-mail: EfimovRV@rambler.ru

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences
Entuziastov Pr., 13, Saratov, 410049, Russia

³ Saratov branch of A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences
Rabochaya Str., 24, Saratov, 410028, Russia

The nucleotide sequence of mitochondrial genome fragments including 12S genes of ribosomal RNA and cytochromoxidaze III of *Vipera berus*, *V. nikolskii*, and *V. renardi* from the Volgograd, Saratov, Samara and Penza regions, Chuvash Republic and Republic Mordovia has been determined. The size of the sequences obtained is 669 and 674 nucleotide pairs, respectively. This makes the practically complete nucleotide sequence of the specified genes, except for its short ends. The results of nucleotide sequences has divided all the samples into two groups, one comprising *V. nikolskii* from the Saratov region and the other one including *V. berus* from the Chuvash Republic, Republic Mordovia, the Samara and Penza regions. A distinct position of *V. renardi* from the Volgograd region in reference to both *V. nikolskii* and *V. berus* has been revealed.

Key words: *Vipera*, *V. berus*, *V. nikolskii*, mitochondrial DNA, Saratov region, Russia.