

ОБЫКНОВЕННАЯ ГАДЮКА НА ГРАНИЦЕ РЕЧНЫХ БАССЕЙНОВ ВОЛГИ И ДОНА: ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ ЗМЕЙ И СВОЙСТВ ИХ ЯДОВИТОГО СЕКРЕТА В ПОПУЛЯЦИИ ИЗ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

А.Л. Маленёв¹, О.В. Зайцева¹, А.Г. Бакиев¹, А.И. Зиненко²

¹ Институт экологии Волжского бассейна РАН
Россия, 445003, Тольятти, Комзина, 10
E-mail: herpetology@list.ru

² Музей природы Харьковского национального университета
Украина, 61022, Харьков, Тринклера, 8
E-mail: zinenkoa@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.10.2010 г.

Рассмотрены особенности ряда морфологических признаков обыкновенных гадюк *Vipera berus* из популяции в Пензенском районе Пензенской области (Россия), а также некоторые свойства их ядовитого секрета. У змей обнаруживаются морфологические признаки и свойства яда как номинативного подвида *V. b. berus*, так и гадюки Никольского *V. b. nikolskii* с преобладанием признаков последней. Гадюки данной популяции, по сравнению со всеми ранее исследованными популяциями Волжского бассейна, наиболее близки к гадюке Никольского.

Ключевые слова: *Vipera berus berus*, *Vipera berus nikolskii*, морфология, ядовитый секрет, протеаза, белковый состав, зона интерградации, Пензенская область (Россия).

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время не существует однозначного и общепринятого мнения по поводу внутривидовой систематики обыкновенной гадюки *Vipera berus*. Мы полагаем, что Волжский бассейн населяют два подвида – номинативный *V. b. berus* и гадюка Никольского *V. b. nikolskii* (Бакиев и др., 2008). Зона интерградации этих двух форм занимает значительную часть бассейна Волги (Зиненко, 2003; Мильто, 2003; Milto, Zinenko, 2005): во многих поволжских популяциях обнаруживаются морфологические признаки обоих подвидов, а чистые популяции номинативного подвида обыкновенной гадюки известны для Верхнего Поволжья, гадюки Никольского – для бассейна Дона (Зиненко, 2003; Мильто, 2003; Milto, Zinenko, 2005).

Исследуя свойства ядовитого секрета гадюк Волжского бассейна, мы отметили тенденцию сопряженного изменения свойств яда: потеря желтой окраски ядовитого секрета, снижение активности протеаз и оксидазы L-аминокислот, изменение пептидного состава. Вектор этих изменений в бассейне Волги отмечен по направлению к бассейну Дона, от популяций с преобладающими морфологическими признаками номинативного подвида к популяциям с наиболее вы-

раженными признаками гадюки Никольского (Бакиев и др., 2008, 2009).

Цель настоящей работы – охарактеризовать изменчивость морфологических признаков обыкновенных гадюк и свойств их яда в популяции на границе Волжского и Донского бассейнов, представив алгоритм определения близости к одному из подвидов в популяциях из гибридной зоны *V. b. berus* и *V. b. nikolskii*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обыкновенных гадюк отлавливали в 2007 – 2010 гг. в Пензенском районе Пензенской области (окрестности с. Волхонщино) в мелколиственном смешанном лесу в долинах рек Пчелейка и Няньга и на прилегающих пойменных остепненных лугах. Данная точка отлова находится на западной границе Волжского бассейна, у водораздела с бассейном Дона.

Для характеристики фоллидоза обыкновенных гадюк Пензенской области были обработаны 37 экземпляров змей (15 самок и 22 самца).

Мы использовали следующие морфологические признаки: количество брюшных щитков (*Ventr.*), количество пар подхвостовых щитков (*S.cd.*), количество рядов чешуй вокруг середины тела (*Sq.*), количество верхнегубных (*Lab.*) и ниж-

негубных (*S.lab.*) щитков, количество чешуй вокруг глаза, не считая надглазничного (*C.oc.*), количество мелких щитков между глазом и верхнегубными щитками (*S.oc.*), количество скуловых щитков (*Lor.*), количество интеркантальных чешуй (*Ic.*), число парафронтальных щитков (*Pf.*).

Для количественной оценки близости изученных гадюк к каждому из двух подвидов был проведен дискриминантный анализ по схеме, использованной в работе по определению систематической принадлежности популяций гадюк из Западной Украины, Республики Молдова и Румынии (Zinenko et al., 2010). В анализе мы использовали те же самые сравнительные выборки *V. b. berus* (особи из Закарпатской, Волынской и северной части Сумской областей Украины, Ленинградской, Новгородской, Псковской, Московской и Рязанской областей Российской Федерации, Брестской и Витебской областей Республики Беларусь, $n = 192$) и *V. b. nikolskii* (Харьковская область Украины и Воронежская область Российской Федерации, $n = 167$), представленные особями из популяций обоих подвидов, удаленных от зоны контакта. Из дискриминантного анализа в связи с отсутствием показателей по отдельным признакам было исключено три особи. Таким образом, объем использованной в анализе выборки из Пензенской области составил 34 экз. (20 самцов и 14 самок). Дискриминантный анализ и описание внешней морфологии были проведены отдельно для самцов и самок, чтобы избежать эффекта влияния полового диморфизма, выраженного у обоих подвидов (Milto, Zinenko, 2005).

Яд у гадюк отбирали механическим способом. Ядовитый секрет от каждой змеи собирали в отдельную чашку Петри и анализировали индивидуально. Образцы яда высушивали в эксикаторе над хлористым кальцием при комнатной температуре в течение 12 – 14 дней, после чего в каждом образце определяли активности ферментов. Всего было проанализировано 37 образцов яда обыкновенных гадюк, в том числе 10 – желтого цвета (7 самцов, 3 самки) и 27 – бесцветного (14 самцов, 13 самок).

Протеолитическую активность яда обыкновенной гадюки определяли по гидролизу казеина натрия (Murata et al., 1963). Активность оксидазы *L*-аминокислот в яде определяли с использованием *L*-фенилаланина в качестве субстрата (Wellner, Lichtenberg, 1971). Концентрацию белка в образцах ядовитого секрета определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951).

Электрофоретическое разделение пептидов яда проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970) в вертикальных пластинах полиакриламидного геля (толщина пластины – 0.75 мм, размер – 80×140 мм) с использованием 0.025 М трис-глицинового электродного буфера ($pH = 8.3$) в присутствии 0.1% SDS и 3 мМ ЭДТА. Концентрация акриламида в разделяющем геле составляла 15%, в концентрирующем – 5%. Разделение проводили при постоянном токе 25 мА в течение 4 – 5 часов.

После электрофореза белки в геле фиксировали 30 мин 20%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ), 30 мин отмывали водой, окрашивали 0.1% Coomassie G-250 в растворе метанол – уксусная кислота – вода (40:8:52) не менее 3-х часов, отмывали смесью метанол – уксусная кислота – вода – глицерин (40:8:50:2) и высушивали на воздухе между двух слоев целлюлоидной пленки.

Перед высушиванием гели сканировали для определения содержания и молекулярных весов пептидов с помощью программы Gel Pro Analyser.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Среднее значение постериорной вероятности отнесения к гадюке Никольского для 34 экземпляров из выборки, проанализированных в дискриминантном анализе, составило 0.64 ± 0.32 ; индивидуальные вероятности изменялись в пределах 0.01 и 0.99, а 70% особей имели преобладающую вероятность дискриминации как *V. b. nikolskii*. Указанные значения немного ниже, чем обычные для чистых популяций гадюки Никольского и более характерны для выборок из зоны контакта (Zinenko et al., 2010). Взаимное расположение особей (самок и самцов) из исследуемой популяции и из контрольных выборок показано на рис. 1. Таблицы стандартизованных коэффициентов для дискриминантной функции и канонического анализа и другие описательные характеристики анализа опубликованы ранее (Zinenko et al., 2010). Как видно из рис. 1, особи из изученной популяции тяготеют к гадюке Никольского, но характеризуются смещением вдоль оси первого корня канонической функции в направлении группы обыкновенной гадюки и наличием особей, морфологически определяемых как *V. b. berus*. Смещение пензенских гадюк вдоль оси второго корня канонической функции в сторону от сравнительных выборок объясняется отклонением значений признаков, имею-

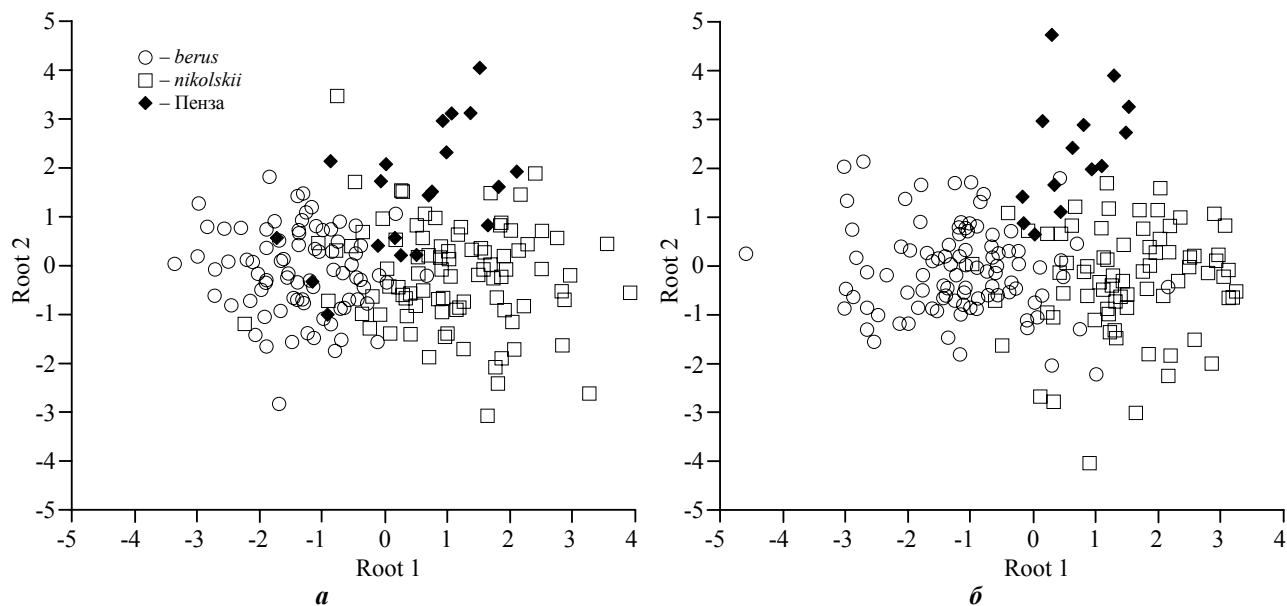


Рис. 1. Взаимное расположение особей из выборок *V. berus berus*, *V. b. nikolskii* и выборки из популяции в Пензенской области в пространстве корней дискриминантной канонической функции: *а* – самцы, *б* – самки

щих меньший вклад в подвидовую диагностику (главным образом признаки щиткования головы).

В одной из работ (Milot, Zinenko, 2005) приведены значения морфологических признаков, характерные, кроме чистых популяций подвидов, группе выборок из контактной зоны. В нашем случае также наблюдается наибольшее соответствие морфологии изученной популяции значениям признаков у гадюк из гибридной зоны. Средние значения морфологических признаков для «пензенской» популяции даны в табл. 1.

Заметим, что все особи из выборки имели темную окраску тела, также более характерную для гадюки Никольского в восточной части ее ареала (Zinenko et al., 2010).

Таким образом, можно сделать вывод, что обыкновенные гадюки из исследуемой популяции Пензенской области по морфологическим признакам занимают промежуточное положение между *V. b. berus* и *V. b. nikolskii* с преобладанием признаков последнего подвида.

Нами отмечено, что одни гадюки из исследуемой популяции продуцируют ядовитый секрет желтого цвета (10 особей, или 27%), другие – бесцветный (27 особей, или 73%). Как оказалось, образцы яда разного цвета отличаются и по биохимическим свойствам. Результаты определения активности ферментов в ядовитом секрете обыкновенных гадюк из Пензенской области приведены в табл. 2.

Сравнение полученных данных не выявило статистически значимых различий между самками и самцами в активности обоих ферментов ($P > 0.05$), поэтому в дальнейшем для анализа мы использовали объединенные выборки самок и самцов.

Статистически значимые различия по активности протеолитических ферментов в желтом и бесцветном ядовитом секрете также не выявлены ($t_{\phi} = 0.03$; $P > 0.05$). В то же время активность оксидазы *L*-аминокислот желтого яда в несколько раз выше, чем бесцветного – выборочные средние различаются в высшей степени достоверно ($t_{\phi} = 17.08$; $P < 0.001$).

Ранее мы отметили, что в пределах бассейна Волги существует тенденция изменения свойств яда, которая характеризуется снижением интенсивности желтой окраски ядовитого секрета, снижением активности протеаз и оксидазы *L*-аминокислот и изменением пептидного состава. Направление этих изменений – с севера и северо-востока на юг и юго-запад, по направлению к бассейну Дона, от популяций с преобладающими признаками номинативного подвида к популяциям с признаками гадюки Никольского (Бакиев и др., 2008, 2009). Данная тенденция прослеживается в популяциях гадюк и у границ Волжского бассейна (Зайцева и др., 2010). Исследованная популяция обыкновенной гадюки в Пензенской области в этом смысле занимает промежуточное географическое положение, на

Таблица 1

Морфологические признаки обыкновенных гадюк из популяции
в Пензенском районе Пензенской области

Морфологические признаки	Пол	<i>n</i>	<i>M</i> ± <i>m</i> или частоты	<i>lim</i>	Принадлежность к группе популяций согласно значению признака (по: Milto, Zinenko, 2005)
<i>Ventr.</i>	♀♀	15	154.4±0.52	150 – 157	<i>V. b. n.</i>
	♂♂	22	149.1±0.78	140 – 155	<i>V. b. b. – V. b. n.</i>
<i>S.cd.</i>	♀♀	15	32.9±0.36	30 – 36	<i>V. b. n.</i>
	♂♂	22	41.1±0.47	36 – 44	<i>V. b. n.</i> и <i>V. b. b. – V. b. n.</i>
<i>Lab.</i>	♀♀	15	8.3±0.11	7 – 10	<i>V. b. b.</i>
	♂♂	22	8.4±0.10	6 – 9	То же
<i>S.lab.</i>	♀♀	15	10.2±0.16	8 – 12	«
	♂♂	22	10.1±0.12	8 – 12	«
<i>C.oc.</i>	♀♀	15	9.2±0.18	8 – 11	<i>V. b. b.</i> и <i>V. b. b. – V. b. n.</i>
	♂♂	22	9.2±0.14	7 – 11	То же
<i>S.oc.</i>	♀♀	15	1 – 60.7% 1.5 – 39.3%	1 – 1.5	<i>V. b. b. – V. b. n.</i>
	♂♂	22	1 – 93% 1.5 – 7%	1 – 1.5	То же
<i>Lor.</i>	♀♀	14	3.3±0.17	2 – 6	<i>V. b. b. – V. b. n.</i>
	♂♂	22	2.8±0.10	2 – 4	<i>V. b. b.</i> и <i>V. b. b. – V. b. n.</i>
<i>Ic.</i>	♀♀	14	8.9±0.75	5 – 11	<i>V. b. n.</i>
	♂♂	20	7.4±0.51	4 – 12	<i>V. b. b. – V. b. n.</i>
<i>Sq.</i>	♀♀	10	21 – 100%	–	То же
	♂♂	22			«
<i>Pf.</i>	♀♀	14	8.6±0.21	6 – 14	<i>V. b. n.</i>
	♂♂	22	7.6±0.19	2 – 14	То же

Примечание. *M*±*m* – средняя арифметическая и ее ошибка для признаков *Ventr.*, *S.cd.*, *Lab.*, *S.lab.*, *C.oc.*, *Lor.*, *Ic.*, *Pf.*; для признаков *S.oc.* и *Sq.* приведены частоты встречаемости. *V. b. b.* – значения признака характерны для номинативного подвида *V. berus berus*; *V. b. n.* – значения признака характерны для гадюки Никольского *V. b. nikolskii*; *V. b. b. – V. b. n.* – значения признака носят смешанный характер двух подвидов.

границе Волжского и Донского бассейнов. Кроме того, наши эксперименты с ядовитым секретом показали, что по свойствам ядовитого секрета гадюки из исследуемой популяции в Пензенской области также занимают промежуточное положение между двумя подвидами:

1) активность протеолитических ферментов ниже средних значений, характерных для *V. b. berus* (13 – 28 мкг тирозина / мг белка в мин), и выше, чем у *V. b. nikolskii* из популяций в

Харьковской области (2.6 мкг тирозина / мг белка в мин) (Маленев и др., 2007);

2) часть гадюк (73%) продуцирует бесцветный яд, характерный для *V. b. nikolskii*, с близкой к нулю активностью оксидазы *L*-аминокислот;

3) в образцах желтого яда активность оксидазы *L*-аминокислот также значительно ниже таковой у *V. b. berus* и более характерна для *V. b. nikolskii*.

Таблица 2

Активность протеаз (ПА) и оксидазы *L*-аминокислот (*L*-АМО) желтого и бесцветного яда обыкновенных гадюк из популяции в Пензенском районе Пензенской области

Цвет яда	Пол	<i>n</i>	ПА, мкг тирозина / мг белка в мин		<i>L</i> -АМО, Е / мг белка в мин	
			<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>lim</i>	<i>M</i> ± <i>m</i>	<i>lim</i>
Желтый	♀♀	3	8.8±0.64	7.5 – 9.5	7.2±1.28	5.4 – 9.7
	♂♂	7	9.6±1.12	4.9 – 13.1	7.6±0.91	5.4 – 12.4
	♀♀+♂♂	10	9.4±0.79	4.9 – 13.1	7.5±0.70	5.4 – 12.4
Бесцветный	♀♀	13	8.8±0.58	6.4 – 12.2	0.2±0.07	0.0 – 0.7
	♂♂	14	9.9±0.69	5.2 – 15.3	0.2±0.09	0.0 – 1.1
	♀♀+♂♂	27	9.4±0.46	5.2 – 15.3	0.2±0.06	0.0 – 1.1

Таким образом, и в свойствах ядовитого секрета обыкновенных гадюк из Пензенской области также преобладают признаки *V. b. nikolskii*, причем доля особей с бесцветным ядом в выборке близка к доле особей, определенных как *V. b. nikolskii* с помощью дискриминантного анализа признаков щиткования.

Для более детального исследования особенностей ядовитого секрета обыкновенных га-

дьюк из Пензенской области было проведено электрофоретическое разделение пептидов яда в полиакриламидном геле (рис. 2). Как видно на электрофореграмме, пептидные спектры яда одинакового цвета у самцов и самок и не отличаются друг от друга. Точно так же отсутствуют различия между индивидуальными и объединенными образцами при одинаковом цвете ядовитого секрета. Однако образцы яда, различающиеся по цвету, имеют и различия в пептидном спектре. Все образцы ядовитого секрета желтой окраски содержат пептид с молекулярной массой, определенной нами как 58.8 кДа, который отсутствует в бесцветных образцах яда. В остальном же спектры пептидов яда у обеих групп образцов имеют аналогичную картину. Вероятно, пептид с массой 58.8 кДа имеет отношение к оксидазе *L*-аминокислот, который, как известно, и определяет окраску ядовитого секрета (Iwanaga, Suzuki, 1979).

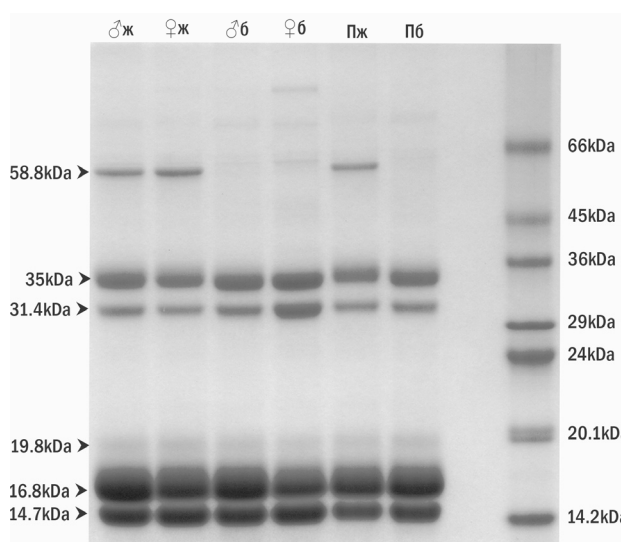


Рис. 2. Электрофореграмма образцов ядовитого секрета обыкновенных гадюк из исследуемой популяции в Пензенской области: ♂Ж – индивидуальный образец яда желтого цвета, самец; ♀Ж – индивидуальный образец яда желтого цвета, самка; ♂Б – индивидуальный образец бесцветного яда, самец; ♀Б – индивидуальный образец бесцветного яда, самка; ПЖ – «объединенный» образец яда желтого цвета; ПБ – «объединенный» образец бесцветного яда. В правой колонке приведены молекулярные массы маркерных белков

Считается, что для гадюк номинативного подвида характерен ядовитый секрет желтого цвета, а для гадюки Никольского – бесцветный

(Minto, Zinenko, 2005). В исследованной популяции из Пензенской области одни гадюки продуцируют яд желтого цвета, другие – бесцветный. Сложная картина смешения и распределения признаков (как морфологических, так и свойств ядовитого секрета) у исследуемых гадюк определяется, скорее всего, сложной картиной интрогрессии в регионе, индивидуальной родословной особи и особенностями наследования признаков; в то же время сходство оценок подвидовой близости в популяции на основании биохимии и морфологии говорит о том, что признаки подвидов в ней находятся в равновесии, не подвержены сильному отбору и могут быть использованы для диагностики популяций в дальнейшем.

Таким образом, полученные нами данные об особенностях морфологии обыкновенных гадюк из Пензенской области и свойствах их ядовитого секрета свидетельствуют в пользу того, что исследуемая популяция является результатом интерградации двух подвидов: *V. b. berus* и *V. b. nikolskii*. У встречающихся здесь гадюк имеются признаки обоих подвидов, при этом отмечено превалирование признаков гадюки Никольского *V. b. nikolskii* – как по морфологическим характеристикам тела, так и по биохимическим свойствам ядовитого секрета.

Благодарности

Авторы благодарят научного сотрудника лаборатории герпетологии и токсикологии ИЭВБ РАН, кандидата биологических наук Галину Васильевну Епланову за помощь в сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакиев А.Г., Маленёв А.Л., Четанов Н.А., Зайцева О.В., Песков А.Н. 2008. Обыкновенная гадюка *Vipera berus* (Reptilia, Viperidae) в Волжском бассейне : материалы по биологии, экологии и токсикологии // Бюл. «Самарская Лука». Т. 17, № 4. С. 759 – 816.
- Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Зайцева О.В., Шуршина И.В. 2009. Змеи Самарской области. Тольятти : Кассандра. 170 с.
- Зайцева О.В., Маленёв А.Л., Бакиев А.Г., Ушаков М.В., Ползиков Д.Н. 2010. Особенности морфологии обыкновенных гадюк и биохимических свойств их яда у границ бассейна Верхней Волги // Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практики : материалы VII Междунар. науч.-практ. конф. Тольятти : Изд-во Волж. ун-та им. В.Н. Татищева. С. 61 – 67.

Зиненко А.И. 2003. Особенности морфологии *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) и *Vipera nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva, 1986 – следствие интрогрессивной гибридизации? // Змеи Восточной Европы : материалы Междунар. конф. / Ин-т экологии Волж. бассейна РАН. Тольятти. С. 20 – 22.

Маленёв А.Л., Бакиев А.Г., Зайцева О.В., Шуршина И.В., Зиненко А.И. 2007. Протеолитическая активность яда обыкновенных гадюк из некоторых популяций России и Украины // Изв. Самар. науч. центра РАН. Т. 9, № 4. С. 1040 – 1044.

Мильто К.Д. 2003. Распространение и морфологические особенности чёрной лесостепной гадюки // Змеи Восточной Европы : Материалы Междунар. конф. / Ин-т экологии Волж. бассейна РАН. Тольятти. С. 56–57.

Iwanaga S., Suzuki T. 1979. L-amino acid oxidase // Handbook of experimental pharmacology. Berlin : Springer. Vol. 52. P. 75 – 84.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. Vol. 227. P. 680 – 685.

Lowry O.H., Rosebrough H.S., Farr A.L., Randall R.I. 1951. Protein measurement with the Fenol Folin reagent // J. of Biol. Chem. Vol. 193. P. 265 – 275.

Milto K.D., Zinenko O.I. 2005. Distribution and Morphological Variability of *Vipera berus* in Eastern Europe // Rus. J. Herpetol. Vol. 12, Suppl.: Herpetologia Petropolitana : Proc. of the 12th Ord. Gen. Meeting Soc. Eur. Herpetol. / Eds. N. Ananjeva, O. Tsinenko. Saint-Petersburg. P. 64 – 73.

Murata Y., Satake M., Suzuki T. 1963. Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms // J. Biochem. Vol. 53, № 6. P. 431 – 437.

Wellner D., Lichtenberg L.A. 1971. Assay of Amino Acid Oxidase // Methods in Enzymology. New York : Academic Press. Vol. 17B. P. 593 – 596.

Zinenko O., Turcanu V., Strugariu A. 2010. Distribution and morphological variation of *Vipera berus nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva, 1986 in Western Ukraine, The Republic of Moldova and Romania // Amphibia-Reptilia. № 31. P. 51 – 67.

COMMON ADDER *VIPERA BERUS* ON THE BORDER OF THE VOLGA AND DON RIVER BASINS: MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SNAKES AND VENOM PROPERTIES IN THE PENZA REGIONAL POPULATION

A.L. Malenyov ¹, O.V. Zaitseva ¹, A.G. Bakiev ¹, and A.I. Zinenko ²

¹ Institute of Ecology of the Volga River Basin, Russian Academy of Sciences
10 Komzina Str., Togliatti 445003, Russia

E-mail: herpetology@list.ru

² Museum of Nature at Kharkiv National University
8 Trinklera Str., Kharkiv 61022, Ukraine

E-mail: zinenkoa@yahoo.com

Features of some morphological characters of common adder *Vipera berus* from its population in the Penza district (Penza region, Russia) and some properties of its venom are considered. The snakes feature the morphological body characters and venom properties of Nikolsky viper *V. b. nikolskii* as well as their nominative subspecies *V. b. berus*, with the prevalence of signs of the former one. The adders of the given population, in comparison with all the earlier surveyed populations in the Volga basin, are closest to Nikolsky vipers.

Key words: *Vipera berus berus*, *Vipera berus nikolskii*, morphology, venom, protease, peptide composition, Penza region (Russia).