

УДК 598.115.33:591.145.3

ТОКСИЧНОСТЬ ЯДА ГАДЮК ВОЛЖСКОГО БАССЕЙНА ДЛЯ НАСЕКОМЫХ

© 2016 Р.А. Горелов, А.Л. Маленёв

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти (Россия)

Поступила 14.06.2016

Приведены результаты экспериментального определения среднесмертельных доз (ЛД₅₀) – для банановых сверчков *Gryllus assimilis* – ядов гадюк *Vipera renardi* и *V. berus*, населяющих Волжский бассейн и прилегающие к нему участки Донского бассейна. Токсичность яда исследованных подвидов убывает в ряду: *V. r. renardi* → *V. r. bashkirovi* → *V. b. berus* → *V. b. nikolskii*. Более низкие значения ЛД₅₀ яда *Vipera renardi* для насекомых связываются с энтомофагией змей. Промежуточные – между *V. r. renardi* и *V. berus* – значения ЛД₅₀ яда гадюки Башкирова *V. r. bashkirovi* объясняются гибридогенным происхождением таксона. Статистически значимых различий ЛД₅₀ яда, обусловленных цветом ядовитого секрета, у *V. r. renardi* не выявлено.

Ключевые слова: гадюки, *Vipera renardi*, *Vipera berus*, ядовитый секрет, среднесмертельная доза ЛД₅₀, банановые сверчки *Gryllus assimilis*.

Results of experimental definition of average lethal doses (LD₅₀) – for banana crickets *Gryllus assimilis* – of viper's venom *Vipera renardi* and *V. berus* in habituated in the Volga river basin and sites of the Don river basin adjoining to it are given in the article. Toxicity of snake venoms of the examined subspecies decreases among: *V. r. renardi* → *V. r. bashkirovi* → *V. b. berus* → *V. b. nikolskii*. Lower LD₅₀ values of *Vipera renardi* venom for insects is related to snake's entomophagiya. Intermediate – between *V. r. renardi* and *V. berus* – LD₅₀ values of *V. r. bashkirovi* venom are explained by hybridous origin of a taxon. Statistically significant distinctions of LD₅₀ values caused by *V. r. renardi* venom's color are not revealed.

Key words: vipers, *Vipera renardi*, *Vipera berus*, venom, average lethal doses LD₅₀, banana crickets *Gryllus assimilis*.

Прямокрылые насекомые (отряд Orthoptera) являются важным компонентом питания некоторых таксонов гадюк Волжского бассейна, в частности, двух подвидов восточной степной гадюки (гадюки Ренара) *Vipera renardi* – номинативного подвида *V. r. renardi* и гадюки Башкирова *V. r. bashkirovi* (Гаранин и др., 2004; Бакиев и др., 2008а, 2009, 2010, 2015; Павлов и др., 2011б; Ширяева, 2011). В то же время, у обыкновенной гадюки *V. berus* – как в популяциях с превалирующими признаками номинативного подвида *V. b. berus*, так и с превалирующими признаками гадюки Никольского *V. b. nikolskii* – насекомые в рационе практически отсутствуют (Павлов и др., 2004; Бакиев и др., 2008б, 2009, 2015).

¹ Горелов Роман Андреевич, аспирант, gorelov.roman@mail.ru; Маленёв Андрей Львович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией, malenyov@mail.ru

Токсикологические эксперименты по определению ЛД₅₀ ядов гадюк Волжского бассейна были спланированы и проведены, исходя из того предположения, что токсичность ядовитого секрета гадюк может отражать видовые особенности их пищевых предпочтений. Вполне вероятно, что ядовитый секрет гадюк для основных пищевых объектов является наиболее токсичным: чем выше процент данного пищевого объекта в рационе гадюк, тем токсичнее для него должен быть ядовитый секрет. Интересные результаты, подтверждающие наши предположения, опубликованы В.Г. Старковым и соавторами (Starkov et al., 2007), которые исследовали токсичность ядовитого секрета нескольких видов гадюк подрода *Pelias*, в рационе которых в той или иной степени присутствовали прямокрылые насекомые. На банановых сверчках *Gryllus assimilis* авторы установили прямую связь значения ЛД₅₀ яда с энтомофагией – оказалось, что чем выше процент насекомых в рационе данного вида гадюк, тем токсичнее для них ядовитый секрет. Эти результаты и наши предположения не противоречат представлениям о том, что свойства ядовитого секрета гадюк в процессе эволюции формировались в направлении наиболее эффективного умерщвления конкретного вида добычи.

Целью данной работы было определение среднесмертельных доз ЛД₅₀ ядов гадюк, населяющих бассейн Волги и прилегающие к нему участки бассейна Дона, для прямокрылых насекомых на примере бананового сверчка *Gryllus assimilis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ядовитый секрет гадюк. Ядовитый секрет был получен от гадюк, отловленных в Волжском бассейне и на прилежащих к нему территориях. Восточная степная гадюка *Vipera renardi* отлавливалась в границах Волжского бассейна, где была представлена двумя подвидами: номинативным подвидом *V. r. renardi* (Астраханская обл., Красноярский р-н; Волгоградская обл., Камышинский р-н; Саратовская обл., Хвалынский р-н; Самарская обл., Шигонский р-н; Ульяновская обл., Радищевский р-н) и гадюкой Башкирова *V. r. bashkirovi* (Республика Татарстан, Спасский р-н; Ульяновская обл., Сенгилевский р-н; Самарская обл., Сергиевский р-н). Популяции обыкновенной гадюки, из которых проводился отлов змей, в разной степени совмещали морфологические признаки двух подвидовых форм: в популяциях из бассейна Волги (Самарская обл., г. Самара; Нижегородская обл., Тоншаевский р-н; Пермский край, Чердынский р-н; Новгородская обл., Боровичский р-н; Саратовская обл., Хвалынский р-н; Республика Татарстан, Лаишевский р-н; Московская обл., Раменский р-н) гадюки больше соответствовали признакам номинативной формы *V. b. berus*, а в популяциях из бассейна Дона (Саратовская обл., Аткарский р-н; Липецкая обл., Добровский р-н) – признакам гадюки Никольского *V. b. nikolskii*.

Каждый образец яда представлял собой объединенный ядовитый секрет, собранный от нескольких (8-20 шт.) взрослых гадюк, пойманных в одном месте и в одно время, в ходе плановых экспедиций (2009-2015 гг.).

Экспериментальные животные. Банановых сверчков разводили и выращивали в пластиковых емкостях с крышками и хорошей вентиляцией, обеспечивая требуемую температуру и влажность. Экспериментальных насекомых кормили сухими смесями (молотые пшеничные отруби, овсяные хлопья, сухой гаммарус и молочный порошок) и свежими кормами (салат, морковь, капуста). Сверчков выращивали до стадии предимаго (масса 0,5-0,7 г), эксперименты в основном проводили на группах животных массой 0,5-0,6 г и 0,6-0,7 г.

При формировании экспериментальных групп насекомых не разделяли по полу, а использовали объединенную выборку самцов и самок. Ранее мы установили, что самки и самцы банановых сверчков одинаково реагируют на ядовитый секрет – значения ЛД₅₀, полученные на самцах и самках, не имеют статистически значимых различий (Маленёв и др., 2015).

Токсикометрия. Для определения ЛД₅₀ образцов ядов использовали 6 групп сверчков (6 разных доз) по 5 шт. в каждой. Эффективные дозы образцов яда, вводимые сверчкам, рассчитывали, исходя из средней массы сверчков в группе. В экспериментах использовали водные растворы ядов: ядовитый секрет *V. r. renardi* (как самый токсичный) использовали в концентрации 2,0 мг/мл; яд *V. r. bashkirovi* – 3,0 мг/мл; яд *V. b. berus* – 5,0 мг/мл и яд *V. b. nikolskii* – 7 мг/мл. Это было сделано для того, чтобы минимизировать объем вводимого в тело сверчка раствора яда. Соответственно, при определении среднесмертельных доз яда каждого вида гадюк в зависимости от его токсичности были использованы разные диапазоны эффективных доз. Инъекции растворов яда сверчкам проводили внутрибрюшинно в правую нижнюю четверть брюшка с дорзальной стороны, слегка фиксируя сверчков сверху с помощью мелкоячеистой сетки.

Токсикометрические эксперименты проводили при температуре 26-27°C в течение 24 часов, после чего опыт прекращали и подсчитывали число погибших и выживших животных. На основе этих данных рассчитывали среднесмертельную дозу ЛД₅₀ методом пробит-анализа (Беленький, 1963; Безруков и др., 1995) и выражали в мкг ядовитого секрета, отнесенных к 1 г живого веса насекомых (мкг/г). Определение ЛД₅₀ каждого образца яда проводили не менее чем в двух независимых экспериментах, и в результатах приведены усредненные значения. Для сравнительного анализа ЛД₅₀ использовали методы параметрической статистики с применением *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЛД₅₀ яда гадюк разных видов и подвидов. Результаты экспериментов по определению ЛД₅₀ яда исследованных таксонов гадюк на банановых сверчках представлены в табл. 1.

Значения ЛД₅₀ яда гадюк Ренара номинативного подвида *V. r. renardi* из разных районов Повожья не различаются между собой, несмотря на то, что крайние точки отлова гадюк отстоят друг от друга на расстояние более чем 1200 км (Астраханская область на юге и Ульяновская область на севере). На

наш взгляд, это указывает на отсутствие внутривидовой географической изменчивости токсичности ядовитого секрета. То же самое мы выявили и для других подвидов гадюк – *V. r. bashkirovi*, *V. b. berus* и *V. b. nikolskii*: различия в значениях ЛД₅₀, обусловленные географией мест отлова гадюк, не имеют статистически значимых различий. Полученные данные свидетельствуют о том, что среднесмертельная доза ЛД₅₀ яда исследованных таксонов гадюк для насекомых не меняется в разных районах Поволжья, и наряду с морфологическими признаками может быть дополнительным диагностическим признаком, характерным для гадюк определенной таксономической принадлежности.

Таблица 1
Значения ЛД₅₀ (мкг/г) яда гадюк для банановых сверчков

Подвид гадюк	Место отлова гадюк	ЛД ₅₀
<i>V. r. renardi</i>	Астраханская обл., Красноярский р-н	21,4±3,61
	Волгоградская обл., Камышинский р-н	23,2±0,84
	Саратовская обл., Хвалынский р-н	21,3±2,78
	Самарская обл., Шигонский р-н	22,7±0,15
	Ульяновская обл., Радищевский р-н	22,6±3,38
<i>V. r. bashkirovi</i>	Республика Татарстан, Спасский р-н	28,9±3,43
	Ульяновская обл., Сенгилеевский р-н	35,3±1,35
	Самарская обл., Сергиевский р-н	31,6±2,24
<i>V. b. berus</i>	Самарская обл., г. Самара	94,9±13,96
	Нижегородская обл., Тоншаевский р-н *	93,4±18,60
	Пермский край, Чердынский р-н	91,9±8,97
	Новгородская обл., Боровичский р-н	87,8±12,66
	Саратовская обл., Хвалынский р-н	84,8±14,42
	Республика Татарстан, Лаишевский р-н	82,4±16,48
	Московская обл., Раменский р-н*	82,2±11,58
<i>V. b. nikolskii</i>	Саратовская обл., Аткарский р-н	113,9±21,72
	Липецкая обл., Добровский р-н*	118,6±12,95

Примечание: * – образцы ядовитого секрета, любезно предоставленные нашими коллегами: М.В. Пестовым (г. Нижний Новгород), В.Г. Старковым (г. Москва), М.В. Ушаковым (г. Воронеж).

Усредненные величины среднесмертельных доз яда исследованных таксонов гадюк представлены в табл. 2. Из этой таблицы видно, что яд гадюки Ренара значительно токсичнее такового обыкновенной гадюки – значения среднесмертельных доз различаются более чем вдвое. Эти данные не противоречат ранее полученным данным И.В. Ширяевой (2011) и В.Г. Старкова с соавторами (Starkov et al., 2007). Результаты, полученные нами на сверчках,шний раз подтверждают предположения о том, что чем выше процент насекомых в питании гадюк, тем токсичнее для них ядовитый секрет. Различия в ЛД₅₀ ядов *V. r. renardi* и *V. b. berus* по отношению к сверчкам обусловлены особенностями характера питания двух видов гадюк в Волжском бассейне, а именно – полным или почти полным отсутствием насекомых в рационе обыкновенной гадюки и значительным их количеством

в питании восточной степной гадюки. В условиях террариума мы ни разу не отмечали поедания сверчков обыкновенными гадюками разного возраста, хотя неоднократно предлагали им в качестве корма сверчков – и банановых, и домашних.

Различия в ЛД₅₀ ядов номинативного подвида обыкновенной гадюки и гадюки Никольского оказались статистически значимыми ($t_{\phi}=6,962$; $P<0,01$) и выявлены нами впервые. Эти данные несколько отличаются от результатов Старкова В.Г. и соавторов (Starkov et al., 2007), где указаны практически одинаковые значения ЛД₅₀ для яда этих подвидов (табл. 2).

Таблица 2

Значения ЛД₅₀ (мкг/г) яда гадюк для банановых сверчков

Подвид гадюк	Наши данные	Ширяева, 2011	Starkov et al., 2007
<i>V. r. renardi</i>	22,5±0,39	21,1±3,28	19,3
<i>V. r. bashkirovi</i>	32,2±1,50	54,4±4,37	–
<i>V. b. berus</i>	88,2±1,99	128,5±11,78	81,9
<i>V. b. nikolskii</i>	116,3±2,35	–	84,8

Наши данные говорят о том, что значения ЛД₅₀ яда гадюки Башкирова занимают промежуточное значение между ЛД₅₀ яда восточной степной гадюки номинативной формы и обыкновенной гадюки. Токсичность яда гадюки Башкирова статистически значимо ($P<0,01$) отличается от таковой номинативных подвидов обыкновенной и восточной степной гадюк. Впервые такое промежуточное положение ЛД₅₀ яда *V. r. bashkirovi* (с о. Спасский в Татарстане) отмечено в кандидатской диссертации И.В. Ширяевой (2011). По нашему мнению, гадюка Башкирова, неся в себе признаки *V. r. renardi* и *V. b. berus*, имеет гибридогенное происхождение (Павлов и др., 2011а). Косвенным подтверждением гибридогенного происхождения таксона являются указанные промежуточные значения ЛД₅₀ яда гадюки Башкирова для сверчков.

ЛД₅₀ яда разного цвета. Все исследованные образцы яда обыкновенных гадюк были ярко-желтого цвета. Среди образцов яда гадюк Ренара в одном и том же локалитете нами были отмечены и бесцветный, и желтый ядовитый секрет (окрестности с. Верхняя Добринка Камышинского района Волгоградской области и с. Климовка Шигонского района Самарской области). Мы уже упоминали о том, что в выборке восточных степных гадюк, отловленных в Камышинском районе Волгоградской области, отмечены самки, продуцирующие яд желтого цвета, самцы, продуцирующие желтый яд, и самцы, у которых был отмечен бесцветный ядовитый секрет (Маленев и др., 2014; Горелов, Маленев, 2016; Макарова, Маленев, 2016). Точно так же и у ренаровых гадюк, отловленных в Шигонском районе Самарской области, мы наблюдали и желтый, и бесцветный яд. Эти образцы яда разного цвета были собраны и проанализированы отдельно. Из данных, приведенных в табл. 3, видно, что статистически значимые различия в ЛД₅₀ ядовитого секрета разного цвета не обнаруживаются.

Значения ЛД₅₀ (мкг/г) яда восточной степной гадюки разного цвета для банановых сверчков

Место отлова гадюк	Пол гадюк	Цвет яда	ЛД ₅₀
Волгоградская обл., Камышинский р-н	самки	желтый	22,6±2,65
	самцы	желтый	22,2±3,62
	самцы	бесцветный	24,9±2,84
Самарская обл., Шигонский р-н	самцы и самки	желтый	22,8±3,64
	самцы и самки	бесцветный	22,5±3,14

Известно, что цвет ядовитого секрета гадюк определяется наличием в нем оксидазы L- аминокислот: в бесцветных образцах активность фермента совсем или почти не обнаруживается, а в ярко-желтых образцах она максимальна (Бакиев и др., 2008а, б; Маленев и др., 2015). Результаты, приведенные для банановых сверчков (см. табл. 3), подтверждаются определением ЛД₅₀ тех же образцов яда на других экспериментальных животных (домовые сверчки, озерные лягушки и лабораторные мыши), где также не выявлены различия между желтыми и бесцветными образцами (Маленев и др., 2015; Горелов, Маленев, 2016). Поэтому мы вправе сделать заключение, что наличие L-аминооксидазы в яде не влияет на его токсичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты позволяют построить следующий ряд токсичности ядов исследованных подвидов гадюк (в порядке ее убывания для банановых сверчков): *V. r. renardi* → *V. r. bashkirovi* → *V. b. berus* → *V. b. nikolskii*. На наш взгляд, это распределение ядовитого секрета по токсичности отражает снижение доли насекомых в рационе рассматриваемых таксонов змей. Кроме того, на банановых сверчках показано, что ядовитый секрет каждого из исследованных подвидов гадюк в пределах исследованных локалитетов не имеет географических различий в токсичности.

Полученные нами данные говорят также о том, что значения ЛД₅₀ яда гадюки Башкирова отличаются от таковых восточной степной гадюки номинативного подвида и обыкновенной гадюки, занимая промежуточное положение между ними.

Статистически значимых различий ЛД₅₀, обусловленных цветом ядовитого секрета гадюк, не выявлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Павлов А.В., Шуршина И.В., Маленев А.Л. Восточная степная гадюка *Vipera renardi* (Reptilia, Viperidae) в Волжском бассейне: материалы по биологии, экологии и токсинологии // Бюл. «Самарская Лука». 2008а. Т. 17, № 4. С. 817-845. – Бакиев А.Г., Литвинов Н.А., Шуршина И.В. О питании восточной степной гадюки *Vipera renardi* (Christoph, 1861) в Волжском бассейне // Современная герпетология. 2010. Т. 10, вып. 1/2. С. 54-56. – Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Зайцева О.В., Шуршина И.В. Змеи Самарской области. Тольятти: ООО «Кассандра», 2009. 170 с. – Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Четанов Н.А., Зайцева О.В., Песков А.Н. Обыкновенная гадюка *Vipera*

berus (Reptilia, Viperidae) в Волжском бассейне: материалы по биологии, экологии и токсинологии // Бюл. «Самарская Лука». 20086. Т. 17, № 4. С. 759-816. – **Бакиев А.Г., Павлов А.В., Старков В.Г. и др.** Морфологические характеристики, систематика, распространение, стаии и обилие, сезонная и суточная активность, размножение, линька, продолжительность жизни, питание // Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелашвили Д.Б. и др. Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: *Vipera*) Волжского бассейна. Часть 1. Тольятти: Кассандра, 2015. С. 103-136. – **Безруков М.Е., Гелашвили Д.Б., Силкин А.А.** Методы токсикометрии в биомониторинге // Экологический мониторинг. Методы биомониторинга: Учебное пособие. Часть II. Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 1995. С. 388-441. – **Беленький М.Л.** Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963. 152 с.

Гаранин В.И., Павлов А.В., Бакиев А.Г. Степная гадюка, или гадюка Ренарда *Vipera renardi* (Christoph, 1861) // Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Изд-во СамНЦ РАН, 2004. С. 61-90. – **Горелов Р.А., Маленев А.Л.** Токсичность ядовитого секрета гадюки Ренара (*Vipera renardi*) из Волгоградской области // Чтения имени эколога и зоолога, профессора Виктора Алексеевича Попова: Материалы докладов XXV–XXVII чтений. Казань: ООО «Фолиант», 2016. С. 45-49.

Макарова Т.Н., Маленев А.Л. Ферментативные активности ядовитого секрета гадюки Ренара (*Vipera renardi*) из Волгоградской области // Чтения имени эколога и зоолога, профессора Виктора Алексеевича Попова: Материалы докладов XXV–XXVII чтений. Казань: ООО «Фолиант», 2016. С. 67-70. – **Маленёв А.Л., Горелов Р.А., Макарова Т.Н. и др.** Токсикологическая характеристика ядовитого секрета гадюк // Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелашвили Д.Б. и др. Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: *Vipera*) Волжского бассейна. Часть 1. Тольятти: Кассандра, 2015. С. 156-194. – **Маленев А.Л., Макарова Т.Н., Горелов Р.А.** Особенности ядовитого секрета гадюки Ренара (*Vipera renardi*) из Волгоградской области // Изв. Самар. НЦ РАН. 2014. Т. 16, № 1. С. 261-265.

Павлов А.В., Гаранин В.И., Бакиев А.Г. Обыкновенная гадюка *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) // Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Изд-во СамНЦ РАН, 2004. С. 49-61. – **Павлов А.В., Зиненко А.И., Йогер У. и др.** Естественная гибридизация гадюк восточной степной *Vipera renardi* и обыкновенной *V. berus* // Изв. Самар. НЦ РАН. 2011а. Т. 13, № 5. С. 172-178. – **Павлов А.В., Петрова И.В., Кармазина И.О.** Прямокрылые (Orthoptera) в питании восточной степной гадюки // Вопросы герпетологии. Материалы IV съезда Герпетологического о-ва им. А.М. Никольского. СПб.: Русская коллекция, 2011б. С. 208-212.

Ширяева И.В. Восточная степная гадюка *Vipera renardi* в Волжском бассейне: морфология, распространение, термобиология, питание, свойства яда: Дис. ... канд. биол. наук. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2011. 151 с.

Starkov V.G., Osipov A.V., Utkin Y.N. Toxicity of venoms from vipers of *Pelias* group to crickets *Gryllus assimilis* and its relation to snake entomophagy // Toxicon. 2007. Vol. 49. P. 995-1001.