

УДК 597.825

ПРОБЛЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ ЖАБ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ПО КОМПОНЕНТАМ СТЕРОИДНОЙ ФРАКЦИИ ЯДА

С. Г. Погребняк, В. В. Миропольский

Институт зоологии НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого, 15, 252601 Киев-30, ГСП, Украина

Получено 14 мая 1997

Проблема идентификации жаб некоторых видов по компонентам стероидной фракции яда. Погребняк С. Г., Миропольский В. В. — Выполнен кластерный анализ и анализ методом главных компонент результатов хроматографии на кремниевой кислоте стероидной фракции яда жаб трех видов (*Bufo bufo*, *B. viridis*, *B. danatensis*). Кластерные диаграммы для 13 быстро движущихся и отдельно для 15 медленно движущихся фракций продемонстрировали, что эти фракции можно разделить на две группы (родственные и уникальные) по уровню подчиненности. При использовании для построения кластерной диаграммы только родственных медленно движущихся фракций была получена картина подчиненности объектов, похожая на реальную таксономическую принадлежность продуцентов яда. Анализ главными компонентами всего массива данных позволил эффективно распределить объекты согласно их таксономическому положению в плоскости первых двух компонент, при этом фракции образовали четыре группы признаков в плоскости 1 и 2 компонент.

Ключевые слова: Amphibia, *Bufo*, яд, стероиды, кластерный анализ, главные компоненты.

About the Problem of the Toad's Species Identification Based on the Steroid Fraction of their Venom. Pogrebnyak S. G., Miropolsky V. V. — The cluster and principal components analyses based on silicic acid chromatography of three species (*Bufo bufo*, *B. viridis*, *B. danatensis*) venom steroid fraction. Two cluster diagrams (for 13 fast-moving and 15 slow-moving fractions) showed that the fractions would be separated into the related and unique groups by its linkage distance. The diagram using only slow-moving related group of variables showed that this procedure forms clusters similar in real species relationship. The main components analysis gives effective separation of objects on the plane of first two components according their taxonomic identity. The fractions form four groups of variables on the plane of first two components.

Key words: Amphibia, *Bufo*, venom, steroids, cluster analysis, main components.

Введение

Среди веществ стероидной природы, входящих в состав яда, есть как весьма инертные в токсическом отношении (стерины), так и обладающие высокой физиологической активностью (кардиотонические стероиды) (Орлов, Крылов, 1977; Орлов и др., 1980; Орлов, Гелашвили, 1985). Стероидная фракция яда содержит разнообразные физиологически активные вещества, наличие и концентрация которых могут тем или иным образом характеризовать продуцента (Myers, Daly, 1976, 1980).

По мнению многих исследователей, состав и свойства ядов амфибий изменяются в зависимости от ареала (Орлов, Крылов, 1977; Орлов, Ширигина, 1981; Миропольский и др., 1994; Шабанов, 1994). Проведенные ранее исследования выявили наличие количественных и качественных различий в стероидах яда различных видов жаб и их географических популяций (Орлов, Крылов, 1977; Миропольский и др., 1994).

Изучение состава и свойств яда жаб, а также факторов, влияющих на его характеристики, имеют не только чисто практический, но и научный интерес. Так, ряд публикаций отражает попытки использовать данные о составе ядов в систематике для уточнения степени родства различных видов жаб и других бесхвостых амфибий (Myers, Daly, 1976, 1980; Шабанов, 1994). В данной статье мы излагаем свой подход в использовании анализа состава яда для решения проблемы идентификации видов жаб.

Материал и методы

Была использована традиционная методика хроматографии в тонком слое кремниевой кислоты (Бондаренко, 1973), модификация которой для данного материала описана ранее (Миропольский и др., 1994): стероидосодержащая фракция была получена экстракцией метанолом и смесью хлороформ-метанол

Таблица 1. Характеристика продуцентов яда

Tab. 1. Venom sources characteristics.

№ продуцента	Вид	Происхождение
C_1	<i>Bufo bufo</i>	о. Сахалин
C_2	<i>Bufo bufo</i>	лаборатория г. Мелитополь (предоставил Писанец Е.М.)
C_3	<i>Bufo bufo</i>	То же
C_4	<i>Bufo bufo</i>	Предкавказье
C_5	<i>Bufo bufo</i>	Украина, Карпаты
C_6	<i>Bufo bufo</i>	Украина, Житомирская обл.
C_7	<i>Bufo bufo</i>	Украина, г. Киев
C_8	<i>Bufo bufo</i>	Украина, Киевская обл.
C_9	<i>Bufo danatensis</i>	Туркменистан, Ашгабад
C_10	<i>Bufo danatensis</i>	То же
C_11	<i>Bufo viridis</i>	Украина, Житомирская обл.
C_12	<i>Bufo viridis</i>	Туркменистан

(1:1), быстро движущиеся компоненты разделяли в системе растворителей хлороформ-метанол (9:1), медленно движущиеся — хлороформ-метанол-вода (75:22:3), при двукратном прохождении растворителя. Результаты представляют собой процентное содержание компонентов фракции стероидов в двух группах: быстро движущиеся компоненты (13 фракций) и медленно движущиеся компоненты (15 фракций). Продуценты яда (Миропольский и др., 1994) охарактеризованы в таблице 1. Математический анализ результатов был проведен по традиционным методикам (Песенко, 1982; Ефимов и др., 1988) с использованием пакета программ прикладной статистики CSS. Для построения кладограмм различий к матрице Эвклидовых расстояний применили процедуру невзвешенного парного усредненного присоединения. Для выведения признаков и объектов на плоскость главных компонент проводили расчет собственных значений матрицы корреляции нормированных значений процентного содержания компонентов фракций.

Результаты и обсуждение

Кладограмма различий 13 быстро движущихся фракций изображена на рисунке 1. Представляется естественным, что из них можно выделить группу из 9 родственных фракций с различием не более 20%, к которым на более высоком

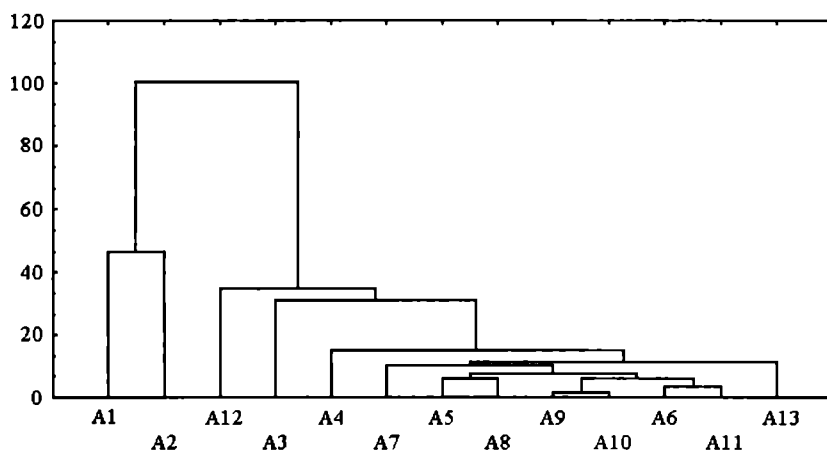


Рисунок 1. Кладограмма различий быстро движущихся компонентов стероидной фракции яда жаб.

Fig. 1. Clusters based on distinctions of fast-moving toad venom steroid components.

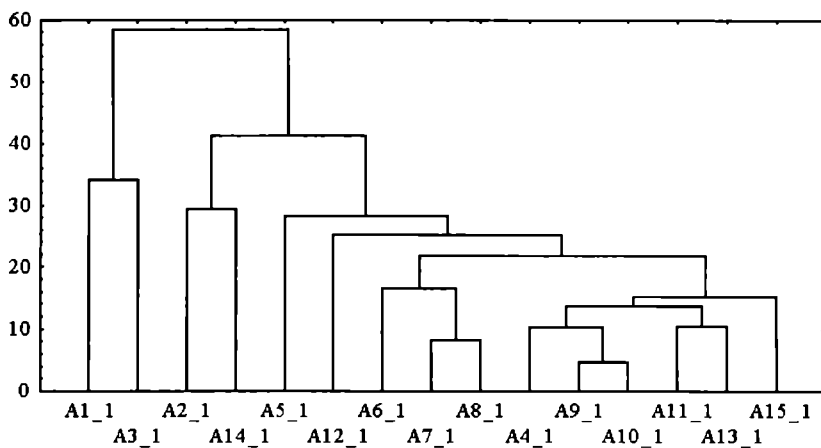


Рисунок 2. Кладограмма различий медленно движущихся компонентов стероидной фракции яда жаб.

Fig. 2. Clusters based on distinctions of slow-moving toad venom steroid components.

уровне различий примыкают остальные 4 фракции. Кладограмма различий медленно движущихся фракций (рис. 2) в некоторых чертах подобна предыдущей. Можно выделить две группы родственных фракций, которые объединяют 6 и 3 из 15 фракций и группу из 6 уникальных, присоединяющихся на разных уровнях отличия. Таким образом, будет естественным разделить фракции на родственные и уникальные по степени отличия, согласно выбранной нами методике.

Попытка получить логическую картину разделения объектов на основе кластерного анализа всех фракций (быстро и медленно движущихся) отображена на рисунке 3. Кладограмма отличий демонстрирует несоответствие кластеров существующему уровню родства объектов на макроуровне (ни один из видов не образует отдельных кластеров). С другой стороны, объекты образуют некоторые логические кластеры. Так, объекты 2,4 и 5,3 собраны в горной местности или являются гибридами от особей горных популяций, объекты 6, 7, 8 принадлежат к одному виду, объекты 10, 12 и 1, 2, 4 близкородственные. Из выше сказанного

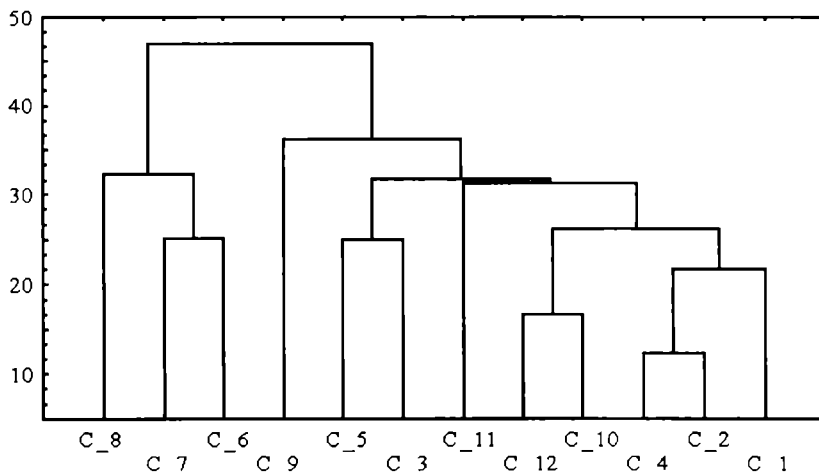


Рисунок 3. Кладограмма отличия жаб по всем быстро и медленно движущимся фракциям стероидов яда.

Fig. 3. Clusters based on distinctions of samples using fast- and slow-moving components.

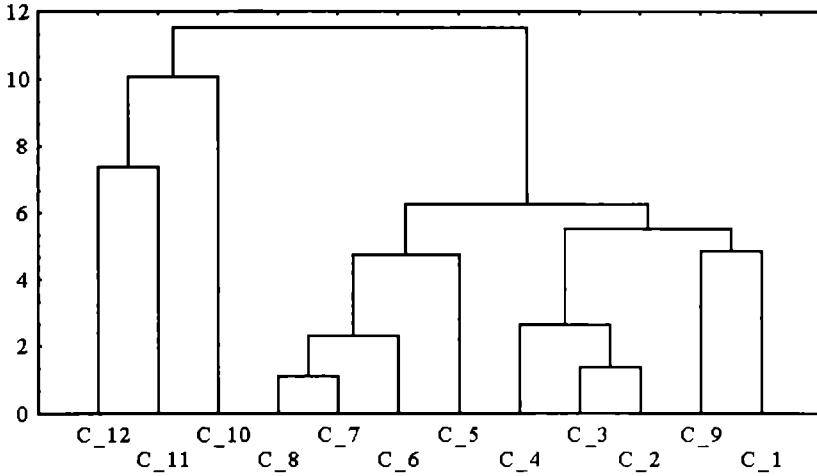


Рисунок 4. Кладограмма отличий жаб по родственным фракциям медленно движущихся компонентов стероидов яда (фракции A4, A6–A11, A13, A15).

Fig. 4. Clusters based on distinctions of samples using blocks of relative slow-moving components (fractions A4, A6-A11, A13, A15).

следует, что различные фракции по-разному влияют на формирование кластеров объектов, что требует их предварительной селекции для получения лучшего результата кластеризации.

Следя принятому выше разделению фракций на родственные и уникальные, к группе быстро, и, отдельно, медленно движущихся компонентов была применена процедура кластеризации, в результате были получены четыре различные кладограммы кластеров отличий между объектами. Все они представляют определенный интерес для оценки роли части фракций в формировании сходства и отличия яда жаб, но только один вариант — родственные фракции медленно движущихся компонентов (признаки 4, 6–11, 13, 15) — позволил сформировать объектам логически достаточно обоснованные группы кластеров (рис. 4). Все образцы ядов от серых жаб образовали общий кластер на уровне отличия около 6%, отделившись от зеленой и близкородственной к ней данатинской жаб. Образцы яда серой жабы, собранные на территории Украины, образовали отдельный кластер с уровнем отличий 5%. Естественную картину нарушает

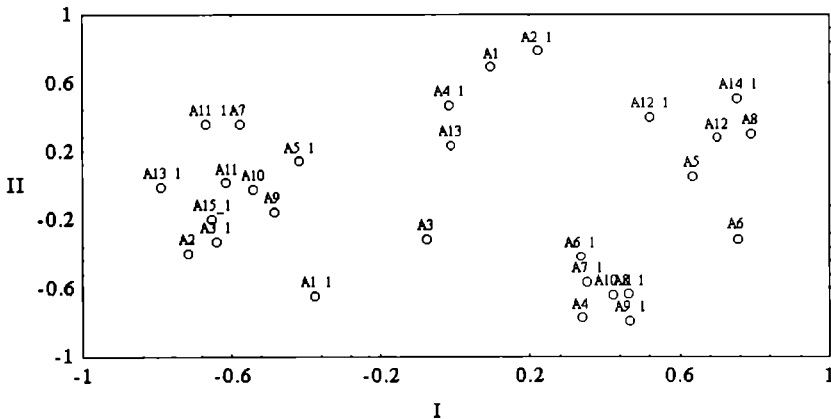


Рисунок 5. Быстро и медленно движущиеся фракции на плоскости первых двух главных компонент.

Fig. 5. Fast- and slow-moving fractions on the plane of first two principal component.

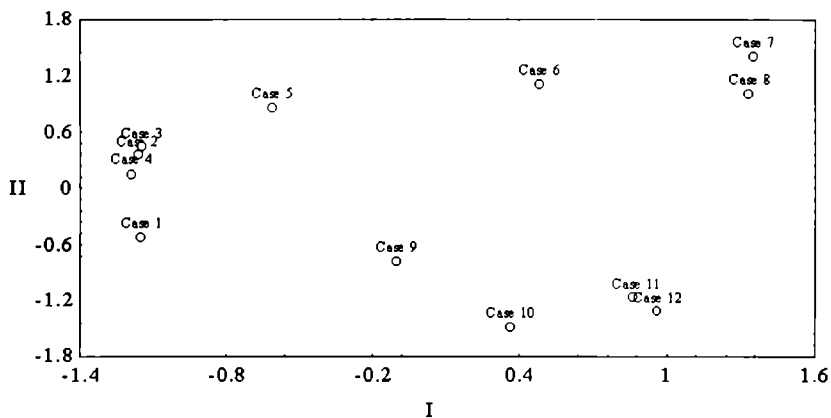


Рисунок 6. Объекты (пробы яда жаб) на плоскости первых двух главных компонент.

Fig. 6. Objects (toads poison samples) on the plane of first two principal component.

объект С9, который вызывает у авторов сомнение в достоверности его происхождения.

Анализ этого же материала методом главных компонент продемонстрировал, что вес компонент весьма неравномерен, так как первые две компоненты берут на себя около 60% вариальности всей выборки. Почти все признаки (фракции) участвуют в формировании первых двух компонент (рис. 5), образуя достаточно четко очерченные четыре группы признаков, две из которых формируют первую компоненту, а две другие — вторую. Попытка использовать группы фракций, образовавшиеся в результате разделения признаков в плоскости первых двух компонент, для построения кладограмм родства объектов, желаемого результата не принесла. Ни одна из четырех кладограмм не отражает в полной мере существующее представление о родстве исследуемых продуцентов яда. На рисунке 6 представлено распределение объектов (жаб) на плоскости первых двух компонент. Полученный результат свидетельствует об удовлетворительном группировании родственных объектов на основе анализа полученных фракций стероидов яда методом главных компонент. При этом вдоль первой компоненты произошло разделение на уровне видов: с одной стороны — серых жаб, с другой — близкородственных зеленых и данатинских. Вдоль второй компоненты прослеживается влияние географического фактора на разделение исследуемых объектов.

Заключение

Таким образом, удалось выяснить, что применение кластерного анализа ко всему массиву полученных фракций стероидов яда не позволяет построить кладограмму, близкую к современным представлениям о систематическом родстве исследованных видов жаб. Однако разделив упомянутым анализом фракции на родственные и уникальные и используя только часть фракций (медленно движущиеся родственные) для построения кластеров, мы получили кладограмму, соответствующую систематическому положению анализируемых объектов. Применение метода главных компонент также позволяет устойчиво разделить исследуемые объекты согласно их таксономическому положению, при этом фракции образуют четыре группы в плоскости первых двух компонент, что отражает сходство количественного представительства данных фракций стероидов у разных объектов, и может быть следствием сходства их химической природы или конформации, проявившемся в сходной подвижности.

- Бондаренко В. Н. Количественное определение липидов по иоду при хроматографировании в тонких слоях // *Вопр. мед. химии.* — 1973. — 19, вып. 4. — С. 438.
- Ефимов В. М., Галактионов Ю. К., Шушпанова Н. Ф. Анализ и прогноз временных рядов методом главных компонент. — Новосибирск: Наука, 1988. — 71 с.
- Миропольский В. В., Бондаренко Б. Н., Даниленко В. С., Могирева Л. А. Изучение стероидных компонентов ядов зеленой, серой и данатинской жаб: зависимость состава и количества от вида и ареала // *БизнесФарм—Пресс*, 1994. — № 2. — С. 28—32.
- Орлов Б. Н., Крылов В. Н. Жабий яд. Химический состав, физиологические свойства // *Механизм действия зоотоксинов.* — Горький: Изд-во Горьк ун-та. — 1977. — С. 13.
- Орлов Б. Н., Корнева Н. В., Омаров Ш. М., Крылов В. Н. Биологические основы действия на организм яда жабы // *Усп. совр. биологии.* — 1980. — 89, № 2. — С. 302—315.
- Орлов Б. Н., Ширигина С. А. Некоторые эколого-физиологические аспекты изменчивости состава и свойства ядов амфибий и рептилий // *Механизмы действия зоотоксинов.* — Горький: Изд-во Горьк. ун-та. — 1981. — С. 3—16.
- Орлов Б. Н., Гелашвили Д. Б. Зоотоксикология (ядовитые животные и их яды). — М.: Высшая школа, 1985. — 250 с.
- Песенко Ю. А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. — М.: Наука, 1982. — 288 с.
- Шабанов Д. А. Предварительные результаты сравнения ядов жаб // *Матер. науч. конф. молодых ученых биологического факультета и Института биологии ХГУ.* — Харьков, 1994. — С. 43—44.
- Myers C. W., Daly J. W. Preliminary evaluation of skin toxins and vocalizations in taxonomic and evolutionary studies of poison-dart frogs (Dendrobatidae) // *Bull. Amer. Mus. Natur. History.* — 1976. — 157, Art. 3. — P. 177—262.
- Myers C. W., Daly J. W. Taxonomy and ecology of *Dendrobates bombetes* a new andean poison frog with new skin toxins // *Amer. Mus. Novitates* published by Amer. Mus. Natur. History. — 1980. — № 2692. — P. 1—23.

5

ЗАМЕТКА

Гнездование белохвостой пигалицы (*Vanellochetusia leucura* L.) в Крыму [The White-tailed Plover *Breeding (Vanellochetusia leucura* L.) in the Crimea]. — На правом берегу устьевой части р. Салгир (Нижнегорский р-н Крыма) 16.05.1997 г. обнаружена группка из 10 белохвостых пигалиц, проявлявших гнездовую активность. При осмотре участка найдены 2 гнезда с полными свежими кладками и гнездовая ямка, которые были расположены по краю обширного солончака, в 30 м друг от друга и в 25—50 м от воды (небольшое озеро на берегу Сиваша). Одно из гнезд оказалось брошенным по вине туристов и рыбаков, часто беспокоивших птиц. Кладка из этого гнезда взята для фондовой коллекции. Размеры яиц (мм): 39,5 x 27,8; 39,6 x 28,5; 39,8 x 28,3; 40,6 x 28,1; масса (г): 15,5; 16,1; 16,4 и 15,9, соответственно. Скучная выстилка гнезд состояла из обломков раковин моллюсков и остатков солероса. Дальнейшая судьба данного поселения не прослежена. Это первый известный случай гнездования вида. Ближайшее место его гнездования находится в Куринской низменности Восточного Закавказья, на западном побережье Каспия (Степанян, 1990). В мае 1998 г. в устьевой части р. Салгир и ближайших окрестностях пигалицы не наблюдались. — Б. А. Гармаш (Азово-Черноморская межведомственная орнитологическая станция).