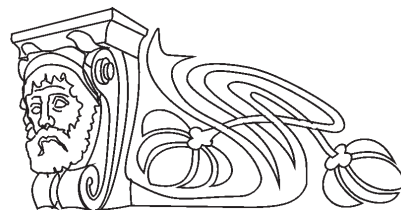




Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 331–336
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 331–336
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-331-336>, EDN: AREZLW

Научная статья
УДК 595.461

Филогенетический анализ скорпионов рода *Mesobuthus* (Vachon, 1950), обитающих на территории Казахстана, на основании анализа фрагментов митохондриальных и ядерных генов



Н. М. Поверенный ✉, В. В. Аникин

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 28

Поверенный Никита Максимович, аспирант кафедры морфологии и экологии животных, nikitapov64@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9958-9342>

Аникин Василий Викторович, доктор биологических наук, профессор кафедры морфологии и экологии животных, anikinvasiliiv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8575-5418>

Аннотация. Систематика скорпионов рода *Mesobuthus* в недавнем прошлом, претерпела ряд существенных корректировок. Изначально на основании особенностей морфологических признаков учёные выделили и описали значительное число подвидов у разных видов этого рода. В последнее десятилетие современные учёные на основе результатов генетических и морфологических анализов «пересмотрели» видовое разнообразие рода и сформировали новые отдельные видовые комплексы. Так, был выделен видовой комплекс – «*Mesobuthus caucasicus*», который в 2019 г. был восстановлен Франтишеком Коварджик до рода *Olivierus*. На текущий момент род насчитывает 18 видов, 7 из которых обитают на территории Средней Азии. Ареалы обитания большинства среднеазиатских видов рода *Olivierus* пересекаются с ареалами обитания видов рода *Mesobuthus*. В частности, на территории республики Казахстан встречается вид *Olivierus gorelovi*, чей ареал обитания совпадает с ареалом обитания вида *Mesobuthus thersites*. Поскольку видовой статус некоторых популяций скорпионов, обитающих на территории республики Казахстан, до сих пор остается неопределённым и слабоизученным, авторами предпринята попытка определить филогенетические связи особей из разных популяций, используя данные полученных результатов молекулярно-генетического баркодирования. Анализ проводился по трём ядерным и одному митохондриальному фрагментам генов у скорпионов, обитающих на территориях Жамбылской, Карагандинской, Атырауской, Туркестанской, Абайской, Алматинской областей. Полученные результаты свидетельствуют, что скорпионы рода *Olivierus* обитают на территориях Атырауской, Алматинской, Карагандинской и Туркестанской областей, а скорпионы рода *Mesobuthus* обитают на территориях Жамбылской, Карагандинской и Абайской областей. Данная работа вносит непосредственный вклад в изучение биоразнообразия скорпионофауны Средней Азии.

Ключевые слова: фауна, скорпионы, *Mesobuthus*, *Olivierus*, протеинкиназа, секвенирование, филогеография, Средняя Азия

Благодарности. Авторы выражают благодарность Сергею Вячеславовичу Малярову (г. Темиртау, Республика Казахстан) за возможность использовать собранный материал для исследования.

Для цитирования: Поверенный Н. М., Аникин В. В. Филогенетический анализ скорпионов рода *Mesobuthus* (Vachon, 1950), обитающих на территории Казахстана, на основании анализа фрагментов митохондриальных и ядерных генов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2023. Т. 23, вып. 3. С. 331–336. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-331-336>, EDN: AREZLW

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Phylogenetic analysis of scorpions of the genus *Mesobuthus* (Vachon, 1950), inhabiting the territory of Kazakhstan, based on the analysis of fragments of mitochondrial and nuclear genes.

N. M. Poverenniy ✉, V. V. Anikin

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Nikita M. Poverenniy, nikitapov64@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9958-9342>

Vasily V. Anikin, anikinvasiliiv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8575-5418>

Abstract. The taxonomy of scorpions belonging to the genus *Mesobuthus* has undergone significant revisions in recent times. Initially, based on the morphological characteristics, scientists identified and described a considerable number of subspecies within different species of this



genus. However, in the last decade, modern researchers have “revised” the species diversity of the genus based on the results of genetic and morphological analyses, forming new separate species complexes. As a result, a species complex called “*Mesobuthus caucasicus*” was identified, which was later reassigned to the genus *Olivierus* by František Kovařík in 2019. Currently, the genus *Olivierus* comprises 18 species, with 7 of them inhabiting the territory of Central Asia. The distribution ranges of most Central Asian species of the genus *Olivierus* overlap with those of the genus *Mesobuthus*. Specifically, in the territory of the Republic of Kazakhstan, the species *Olivierus gorelovi* occurs, whose distribution range coincides with that of *Mesobuthus thersites*. Due to this overlap, the taxonomic status of some scorpion populations inhabiting the territory of the Republic of Kazakhstan remains uncertain and poorly studied. The authors of this study attempted to determine the phylogenetic relationships among individuals from different populations using data obtained from molecular genetic barcoding. The analysis was conducted on three nuclear and one mitochondrial gene fragments of scorpions inhabiting the regions of Zhambyl, Karaganda, Atyrau, Turkestan, Abay, and Almaty. The obtained results indicate that scorpions of the genus *Olivierus* inhabit the territories of Atyrau, Almaty, Karaganda, and Turkestan regions, while scorpions of the genus *Mesobuthus* inhabit the territories of Zhambyl, Karaganda, and Abay regions. This study makes a direct contribution to the study of scorpion fauna biodiversity in Central Asia.

Key words: *Mesobuthus*, protein kinase, sequencing, *Olivierus*, scorpion

Acknowledgements. The authors are grateful to Sergey V. Malyarov (the city of Temirtau, Kazakhstan) for the opportunity to collect the material used for the study.

For citation: Poverenniy N. M., Anikin V. V. Phylogenetic analysis of scorpions of the genus *Mesobuthus* (Vachon, 1950), inhabiting the territory of Kazakhstan, based on the analysis of fragments of mitochondrial and nuclear genes. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 3, pp. 331–336 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-3-331-336>, EDN: AREZLW

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Род *Mesobuthus* был недавно пересмотрен и на данный момент насчитывает 29 видов [1]. Центром видового разнообразия скорпионов рода *Mesobuthus* является территория Ирана. В Средней Азии обитают всего семь видов из этого рода, но эти виды широко распространены в регионе. В Казахстане массово распространен вид *Mesobuthus thersites*. Недавние молекулярно-генетические данные авторов продемонстрировали, что сборы из Казахстана относились исключительно к этому виду, но в анализ не были введены последовательности фрагментов генов скорпионов рода *Olivierus* [2]. Недавние научные таксономические события, а именно восстановление рода *Olivierus* [3] и выделение трёх новых видов из Узбекистана и Казахстана этого рода [4], актуализировали использование данных молекулярно-генетического анализа по видам данного рода. Были привнесены в анализ расшифрованные нуклеиновые последовательности представителей скорпионов рода *Olivierus* при исследовании результатов баркодинга скорпионов рода *Mesobuthus*. Известно, что в южной части Казахстана обитают скорпионы вида *Olivierus gorelovi*, ареал которых совпадает с ареалом вида *Mesobuthus thersites* [1]. В связи с этим целью работы было проведение филогенетического анализа различных таксонов скорпионов по современным образцам (сборам) из различных мест обитания на территории Казахстана (Жамбылской, Карагандинской, Атырауской,

Туркестанской, Абайской и Алматинской областях) с определением таксономического статуса скорпионов из этих регионов республики.

Материалы и методы

Сбор скорпионов проводился с июня по август 2020–2021 гг. Коллектирование скорпионов было произведено на территориях в окрестностях села Шокай (Жамбылская область), посёлка Доссор (Атырауская область), города Саптаев, города Балхаш (Карагандинская область), береговой линии озера Алаколь (Абайская область), берега Шардаринского водохранилища (Туркестанская область), города Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область) (рис. 1).

Выполнение работ по пробоподготовке материала, выделение ДНК, амплификация, секвенирование и анализ полученных данных осуществлялся на базе учебно-молекулярной лаборатории биологического факультета и кафедре морфологии и экологии животных Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского.

Результаты и их обсуждение

Для проведения молекулярно-генетических исследований был взят митохондриальный ген цитохром-с-оксидазы первый субъединицы (COI) [6,7], а также ядерные гены: тиоредоксин-1 (Txr1), дефенсин (4kD) и протеинкиназа [8]. Для амплификации и секвенирования были выбраны специфичные праймеры:



Рис. 1. Места сбора скорпионов, обитающих на территории Казахстана. Чёрными точками отмечены места сборов: 1 – село Шокай (Жамбылская область), 2 – посёлок Доссор (Атырауская область), 3 – окрестности города Саптаев (Карагандинская область), 4 – озёра Алаколь (Абайская область), 5 – Балхаш (Карагандинская область), 6 – берег Шардаринского водохранилища (Туркестанская область), 7 – окрестности города Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область) [5]

Fig. 1. Places of collection of scorpions living on the territory of Kazakhstan. Black dots mark collection sites: 1 – Shokai village (Zhambyl region), 2 – Dossor village (Atyrau region), 3 – neighborhood of the city of Saptaev (Karaganda region), 4 – Alakol lakes (Abai region), 5 – Balkhash (Karaganda region), 6 – shore of the Shardara reservoir. (Turkestan region), 7 – neighborhood of the city of Kapchagay (now Konaev) (Almaty region) [5]

Цитохром-с-оксидаза 1 субъединица:

5'-GGTCAACAAATCATCATAAAGATATTGG-3',

5'-CCCGGTA AAAAT TAAAATATAAACTTC-3';

протеинкиназа: 5'-TCTGATGTATGGCAGATGGCAATG-3',

5'-CGAACTCAAGATCCACTCCTGTA CT CG-3';

дефенсин: 5'-GCCATGAAAGCCGTTGCTATTCT-3'

5'-ACGACACAAATACAGGTGA-3';

тиоредоксин-1: 5'-TAACTTGACCATTTACCTAGAATGTCAC-3'

5'-CATGTA CTGACGCTGGCATTGCC-3'.

Для нашего исследования ДНК была выделена из заднебрюшья скорпионов, в некоторых случаях использовалось переднебрюшье, но без многолопастной печени, так как она токсична и может повлиять на выход чистой ДНК. ДНК была выделена с помощью набора DNA mini kit (Qiagen, США). Размер ДНК оценивался с помощью метода гель-электрофореза. Для окрашивания ДНК использовался 6-кратный DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, США). Для постановки использовался 1% агарозный гель, однократный трис-боратный буфер. Напряжение составляло 120 В, для сравнительной оценки использовался маркер GenRuler 100bp plus. Процедуру проводили в течение 15 мин. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали следующий амплификационный профиль: 1-й шаг – 1 мин 96°C (1 шаг –

цикл), 2-й шаг – 20 с 96°C, 3-й шаг – 30 с 64°C, 4-й шаг – 40 с 72°C (2–4-е шаги – 24 цикла).

В реакцию было добавлено: 6 мкл 10-кратного Tersus-буфера, 1 мкл Tersus-полимеразы, 0,5 мкл 50-кратной смеси dNTP, 5 п/моль каждого праймера и 50 нг ДНК. Реакция по Сэнгеру, очистка ее продуктов и секвенирование проводилось по соответствующим протоколам.

Филогенетическое древо построено с использованием модели максимального правдоподобия, модель Джукса–Кантора использовалась в качестве модели замещения [9]. Для того чтобы оценить генетическое расхождение между образцами, мы применили метод bootstrap с использованием 2000 репликаций. Для построения дендрограммы использовали программный пакет Mega X. Выравнивание расшифрованных нуклеотидных последовательностей выполнено вручную.



Для анализа, кроме наших собственных образцов из Казахстана, были введены последовательности из базы данных NCBI. Использовались последовательности скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Olivierus gorelovi*, обитающих на территории Туркменистана, Узбекистана, Казахстана. Кроме того, в анализ были

введены последовательности, полученные в ходе работы авторов по определению видового статуса популяций скорпионов из Нижнего Поволжья (Саратовская, Волгоградская, Астраханская области) [2]. Полученные результаты по разным генам представлены на кладограммах I и II (рис. 2).



Рис. 2. Дендрограммы, построенные на основе анализа расшифрованных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов: COI (I), дефенсина, протеинкиназы и тиоредоксина (II) скорпионов, обитающих в Нижнем Поволжье (Саратовская, Волгоградская, Астраханская области), а также Туркменистана, Узбекистана, Казахстана

Fig. 2. Dendrograms built on the basis of the analysis of the decoded nucleotide sequences of gene fragments: COI (I), defensin, protein kinase and thioredoxin (II) of scorpions living in the Lower Volga region (Saratov, Volgograd, Astrakhan regions), as well as Turkmenistan, Uzbekistan, Kazakhstan



Первичный анализ фрагментов генов COI показал наличие двух кластеров, первый из которых включает в себя 2 клады, одна из которых состоит из сборной группы туркменских, узбекских и казахских популяций. Вторая клада включает в себя сиквенсы наших образцов из Казахстана (Доссор (Атырауская область), Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область)) и образцов казахско-узбекских популяций *Olivierus gorelovi*. Второй кластер также представлен двумя кладами. Первая состоит в большинстве из казахских популяций *Mesobuthus thersites*. Вторая клада представлена сиквенсами скорпионов Саратовской, Волгоградской и Астраханской областей. Внутри клады, но отдельной ветвью, обособленно находится образец, собранный в окрестностях села Шокай (Жамбылская область).

Вторичный анализ, основанный на сравнении комплекса ядерных генов (дефенсин, тиоредоксин-1, протеинкиназа), показал наличие двух кластеров. Первый кластер состоит из представителей скорпионов Атырауской, Алматинской, Карагандинской, Туркестанской областей. Второй кластер представлен сборной группой представителей популяций Жамбылской, Карагандинской, Абайской областей.

Заключение

Исходя из полученных данных по первичному анализу, можно предположить, что скорпионы, обитающие на территориях Атырауской и Алматинской области, относятся к виду *Olivierus gorelovi*. Также следует, что скорпионы, обитающие на территории села Шокай Жамбылской области относятся к роду *Mesobuthus*, а именно, вероятнее всего, являются близкородственными к узбекским популяциям скорпионов вида *Mesobuthus barszcevszkii*. Близкородственность между этими узбекскими и нижневолжскими популяциями была установлена в недавней ревизии рода [1]. Вторичный анализ данных по комплексу ядерных генов частично подтверждает полученные результаты по гену COI, что скорпионы *Olivierus gorelovi* обитают на территориях в окрестностях посёлка Доссор (Атырауская область), города Капчагай (ныне Конаев) (Алматинская область), города Балхаш (Карагандинская область), береговой линии Шардаринского водохранилища (Туркестанская область). Скорпионы, обитающие на территориях в окрестностях села Шокай (Жамбылская область), города Саптаев (Кара-

гандинская область), озера Алаколь (Абайская область), относятся к виду *Mesobuthus thersites*. Таким образом, благодаря полученным результатам удалось установить таксономический статус скорпионов из разных популяций, обитающих в схожих ландшафтах и биотопах Казахстана, и ответить на вопрос о присутствии близкородственных видов скорпионофауны в данном регионе.

Список литературы

1. Kovařík F., Fet V., Gantenbein B., Graham M. R., Yağmur E. A., Štáhlavský F., Poverennyi N. M., Novruzov N. E. A revision of the genus *Mesobuthus* Vachon, 1950, with a description of 14 new species (Scorpiones: Buthidae) // *Euscorpius*. 2022. № 348. P. 1–189.
2. Поверенный Н. М., Аникин В. В. Филогенетические связи скорпиона *Mesobuthus eupeus volgensis* (Birula, 1925) из Нижнего Поволжья с близкородственными видами скорпионов Центральной Азии на основе анализа ДНК по гену COI // *Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье*. 2020. Вып. 17. С. 12–16.
3. Kovařík F. Taxonomic reassessment of the genera *Lychas*, *Mesobuthus*, and *Olivierus*, with descriptions of four new genera (Scorpiones: Buthidae) // *Euscorpius*. 2019. № 288. P. 1–27.
4. Fet V., Kovařík F., Gantenbein B., Graham M. R. Three new species of *Olivierus* (Scorpiones: Buthidae) from Kazakhstan and Uzbekistan // *Zootaxa*. 2021. Vol. 5006, № 1:29 Jul. P. 54–72. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.5006.1.9>
5. Карта – Сервис Google Планета Земля. URL: <https://www.google.ru/intl/ru/earth/> (дата обращения: 27.05.23).
6. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. Vol. 3, № 5. P. 294–299.
7. Raharimalala F. N., Ravaomanarivo L. H., Ravelonandro P., Rafaraso L. S., Zouache K., Tran-Van V. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar // *Parasites and Vectors*. 2012. № 5. Article number 56. P. 5–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-56>
8. Gantenbein B., Keightley P. D. Rates of molecular evolution in nuclear genes of east Mediterranean scorpions // *Evolution*. 2004. Vol. 58, iss. 11. P. 2490. PMID: 15612292.
9. Chor B., Tuller T. Maximum likelihood of evolutionary trees: Hardness and approximation // *Bioinformatics*. 2005. Vol. 21. Suppl. 1. P. i97–i106. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1027>



References

1. Kovařík F., Fet V., Gantenbein B., Graham M. R., Yağmur E. A., Šťáhlavský F., Poverennyi N. M., Novruzov N. E. A revision of the genus *Mesobuthus* Vachon, 1950, with a description of 14 new species (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*, 2022, no. 348, pp. 1–189.
2. Poverennyi N. M., Anikin V. V. The phylogenetic relations of scorio – *Mesobuthus eupeus volgensis* (Birula, 1925) from the Lower Volga Region with closely related species from Central Asia on the base of DNA analysis by gene COI. *Entomological and parasitological investigations in Volga Region*, 2020, iss. 17, pp. 12–16 (in Russian).
3. Kovařík F. Taxonomic reassessment of the genera *Lychas*, *Mesobuthus*, and *Olivierus*, with descriptions of four new genera (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*, 2019, no. 288, pp. 1–27.
4. Fet V., Kovařík F., Gantenbein B., Graham M. R. Three new species of *Olivierus* (Scorpiones: Buthidae) from Kazakhstan and Uzbekistan. *Zootaxa*, 2021, vol. 5006, no. 1:29 Jul., pp. 54–72. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.5006.1.9>
5. Karta – Servis Google Planeta Zemlja (Map – Google Earth Service). Available at: <https://www.google.ru/intl/ru/earth/> (accessed May 27, 2023).
6. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, vol. 3, no. 5, pp. 294–299.
7. Raharimalala F. N., Ravaomanarivo L. H., Ravelonandro P., Rafaraso L. S., Zouache K., Tran-Van V. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasites and Vectors*, 2012, no. 5, article no. 56, pp. 5–10. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-56>
8. Gantenbein B., Keightley P. D. Rates of molecular evolution in nuclear genes of east Mediterranean scorpions. *Evolution*, 2004, vol. 58, iss. 11, pp. 2490, PMID: 15612292.
9. Chor B., Tuller T. Maximum likelihood of evolutionary trees: Hardness and approximation. *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, suppl. 1, pp. i97–i106. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1027>

Поступила в редакцию 13.05.2023; одобрена после рецензирования 14.05.2023; принята к публикации 20.05.2023
The article was submitted 13.05.2023; approved after reviewing 14.05.2023; accepted for publication 20.05.2023