

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Кафедра морфологии
и экологии животных

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ
MESOBUTHUS EUPEUS (C.L. KOCH, 1839)
В НИЖНЕМ ПОВОЛЖЬЕ И ЮЖНОМ КАЗАХСТАНЕ

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ ВЫПУСКНОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 242 группы
Специальности 06.04.01 – Биология
Биологического факультета
Поверенного Никиты Максимовича

Научный руководитель:

д.б.н., профессор



В.В.Аникин

Зав. кафедрой морфологии и экологии животных:

д.б.н., профессор



Г.В.Шляхтин

Саратов 2019

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение исследований.

Актуальность темы исследования

Человечество сталкивалось со скорпионами на протяжении всего своего существования. Изначально люди относились к этим членистоногим с опаской в связи с болезненностью их укусов, приводящих зачастую к гибели укушенного. Однако было замечено, что яды скорпионов могут быть полезны при лечении таких тяжелых болезней, как малярия, артриты и даже рак мозга.

Многие древние целители использовали яды скорпионов в лечебной практике при изготовлении лекарств и снадобий. Важно отметить, что у определенных видов скорпионов яд оказывался более эффективным при лечении определенной группы заболеваний. Именно поэтому многие виды скорпионов хорошо известны уже на протяжении 2000 лет и описаны во множестве литературных источниках как массовые, широко распространенные виды членистоногих. Тем не менее, отдельные таксоны до сих пор остаются мало изученными. Так, внутри массового рода *Mesobuthus*, с течением времени в условиях, например географической изоляции (или других факторов), могли формироваться новые таксономические единицы.

Цели и задачи исследования

Целью работы является выявление филогенетических связей вида *Mesobuthus eupeus* с территории Нижнего Поволжья и Южного Казахстана с другими таксонами рода *Mesobuthus* и определение таксономического статуса скорпионов, обитающих на территории Саратовской области (памятника природы «Нижне-Банновский»), Астраханской области («Богдинско-Баскунчакский» заповедника), Волгоградской области (природного парка «Щербаковский»). Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести анализ научных источников по данному вопросу;

2. Установить современные места обитания исследуемых таксонов на территории Нижнего Поволжья (в ООПТ – Богдинско-Баскунчакского заповедника, Астраханская обл., Ахтубинский р-н; памятника природы «Нижне-Банновский», Саратовская область, Красноармейский район, природного парка «Щербаковский», Волгоградская область, Камышинский район); Южного Казахстана (Жамбылская область, Кызылординская область).
3. Выявить морфологические особенности представителей рода *Mesobuthus*, обитающих на территории Нижнего Поволжья и Южного Казахстана;
4. Установить особенности экологии представителей рода *Mesobuthus*;
5. Сделать множественный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК по гену *COI* с привлечением данных Gen Bank по видам рода *Mesobuthus*;
6. Определить филогенетические связи исследуемых скорпионов *Mesobuthus eurus* Нижнего Поволжья и Южного Казахстана с другими видами рода *Mesobuthus*;

Научная новизна

Впервые проведён комплексный анализ *Mesobuthus eurus* с учётом внешней морфологии имаго, экологических предпочтений, сиквенсов ДНК по гену *COI*, с исследованных территорий.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты работы вносят вклад в изучение систематики, филогении, биологии и распространения представителей вида *Mesobuthus eurus* в Европейской и Азиатской частей ареала. Анализ распространения ряда таксонов позволил дополнить существующую картину зоогеографического районирования. Большинство представителей рода, встречаются на территории европейской и азиатской частей ареала очень локально. Как показали современные данные иностранных учёных, некоторые виды рода подвержены сильной антропогенной нагрузке при уничтожении местообитаний (при выпасе

скота, пожаре степной растительности и т.п.). Поэтому сохранение видов, их мест обитания, особенно на границах ареала (север северо-восток европейской части и юго-запад азиатской части), является важной составляющей в природоохранном аспекте этого вопроса и заслуживает внимания при утверждении видов необходимых для внесения в региональные Красные книги Нижнего Поволжья (Калмыкии, Астраханской и Волгоградской областей).

Структура и объем работы. Работа изложена на 53 страницах машинописного текста и включает в себя определения, введение, 8 основных разделов с 30 рисунками и выводами. Список использованных источников содержит 41 наименования.

ОСНОВНОЕ СОЖЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 История изучения представителей рода *MESOBUTHUS*

История изучения рода начинается с XIX века (с 1839 года). первую морфологическую характеристику виду *Androctonus eupeus* дал Карл Людвиг Кох в 1839 году в 5-й части своей книги «System der bayerischen Zoologie». Он систематизировал вид на основе морфологических особенностей: окраске, форме и положения килей, зернистость хитинового покрова. Существенный вклад в формирование взглядов о роде *Mesobuthus* внёс Алексей Андреевич Бялыницкий-Бируля. В 1900 году он изучал географическое распространение скорпионов (на тот момент вид *eupeus* был в составе рода *Buthus*) и отмечал, что вид является полиморфным и обладает огромным ареалом. Изучив распространение подвидов *Mesobuthus eupeus afghanus*, *Mesobuthus epeus kirmanensis*, *Mesobuthus eupeus thersites*, *Mesobuthus eupeus typicus*, он определил, что область распространения вида начинается от Уральских гор до Персидского залива. Также им были описаны морфологические особенности каждого подвида. На основе данных Бирули французский зоолог Вашон Макс продолжил изучение семейства *Buthidae* и дополнил морфологические характеристики по представителям этого рода. Очень большое внимание уделяется географическому распространению рода, и по сей день.

1 Материал и методы исследования

Работа проводилась в 2014-2018 г.г. на базе кафедры морфологии и экологии животных и лаборатории молекулярной биологии биологического факультета Саратовского государственного национального исследовательского университета имени Н. Г. Чернышевского.

Объектом исследования является скорпион *Mesobuthus eupeus* (C.L. Koch, 1839). Сборы материала проводились в апреле-сентябре 2014-2018 г.г. на территории Саратовской области (ООПТ «Нижне-Банновский»), Астраханской области (ООПТ «Богдинско-Баскунчакский» заповедник, в окрестностях горы

Богдо), Волгоградской области (ООПТ Природный парк «Щербаковский»). Всего было собрано и зафиксировано 23 экземпляра. Остальные образцы были собраны В.В. Аникиным (на территории Даниловского оврага на границе Саратовской и Волгоградской областей) и Дмитрием Шовкуным в ходе летней экспедиции в Жамбылской и Кызылординской областях Казахстана и предоставлены для исследования.

Сбор материала проводился с помощью пинцета и контейнера. Скорпион помещался в контейнер с песком, где находилась смоченная водой вата и два мраморных таракана в качестве корма. В тёмное время суток использовалась лампа ДРЛ и экран для сбора насекомых.

Как известно, сравнение нуклеотидных последовательностей максимально консервативных генов дает возможность с высокой точностью оценить филогенетические связи в пределах систематических таксонов. В нашей работе для молекулярно-генетического анализа был выбран ген цитохром С оксидазы субъединица I, к которому были подобраны специфические праймеры Fo-94 5'-ggg-caa-caa-atc-atc-ata-aag-ata-ttg-g-3' 28 нуклеотидов Si-94 5'-ccc-ggt-aaa-att-aaa-ata-taa-act-tc-3' 26 нуклеотидов. ДНК была выделена из метасомы с помощью набора Qiagen dna microkit (производство германия). С помощью прибора Quantus Fluorometer и набора реагентов Promega QuantiFluor Dye Systems была измерена концентрация полученной ДНК, которая составляет в среднем 7 мкл. Выделенная ДНК была амплифицирована, с помощью для постановки ПЦР-реакции encyclo pcr kit Мы добавляли: 2,5 мкл encyclo buffer, 0,5 мкл dNTP, каждый праймер по 0,5 мкл, DNA 2 мкл, H₂O -18,5, encyclo полимераза 0,5 мкл. Амплификационный профиль: 1- 96 C (1 мин.) ; 2- 96 C (40 сек.); 3- 50 C (5 сек.); 4- 60 C (4 мин.). Электрофорез показал, что размер фрагментов выделенной ДНК, в среднем, составляет 7000-10000 пар нуклеотидов. ПЦР реакция была поставлена с помощью прибора для ПЦР, в реальном времени «АНК-32» . ДНК была очищена от посторонних примесей ферментативным методом с использованием набора SAP-Eco Kit фирмы Jena Bioscience GmbH, (Германия) В качестве

ферментов были использованы: щелочная фосфатаза, экзонуклеаза I (термолабильная). Секвенирование ПЦР-продуктов осуществлялось с помощью генетического анализатора «НАНОФОР-05». Фотографии скорпиона сделаны с помощью микроскопа Carl Zeiss Primo Star, видеокамерой Ucmos 3,1 мп, объективом 4x увеличения.

Множественный анализ проводился с помощью программы MEGA 6. Филогенетическое древо было построено методом статистического конструктора UPGMA, филогенетический тест и оценка достоверности полученной топологии выполнялась с использованием bootstrap-теста в 1000 повторностях. Расчет границ нуклеотидной изменчивости выполнялся в пакете программ Statistica 8 [14]. Поддержка бутстреп составляет: у первого кластера – 100%, у второго – 100%, у третьего – 72%, у четвертого – 100%, у пятого – 65%. Помимо нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов (4) в анализ, были введены известные нуклеотидные последовательности, взятые из Gen Bank: 5 – подвида *M. e. philippovitschi* (3), 3 – номинативного подвида *M. e. eureus* (2), 13 – образцов подвида *M. e. thersites* (1, 5), 6 – вида *M. e. phillipsi* (7), 1 у вида *M. caucasucus* (6).

2 Результаты множественного анализа

Построена кладограмма, на основе расшифрованных нуклеотидных последовательностей (11 сиквенсов), представителей популяций Саратовской, Волгоградской, Астраханской, Жамбылской и Кызылординской областей Южного Казахстана.

Помимо исследуемых образцов в анализ были внесены сиквенсы из базы GenBank 5 образцов подвида *M. e. philippovitschi*, 3 номинативного подвида *M. e. eureus*, 13 образцов подвида *M. e. thersites*, 6 вида *M. e. phillipsi*, 1 вида *M. caucasucus*). Как видно на представленной кладограмме (рисунок), видовые таксоны формируют два больших кластера.

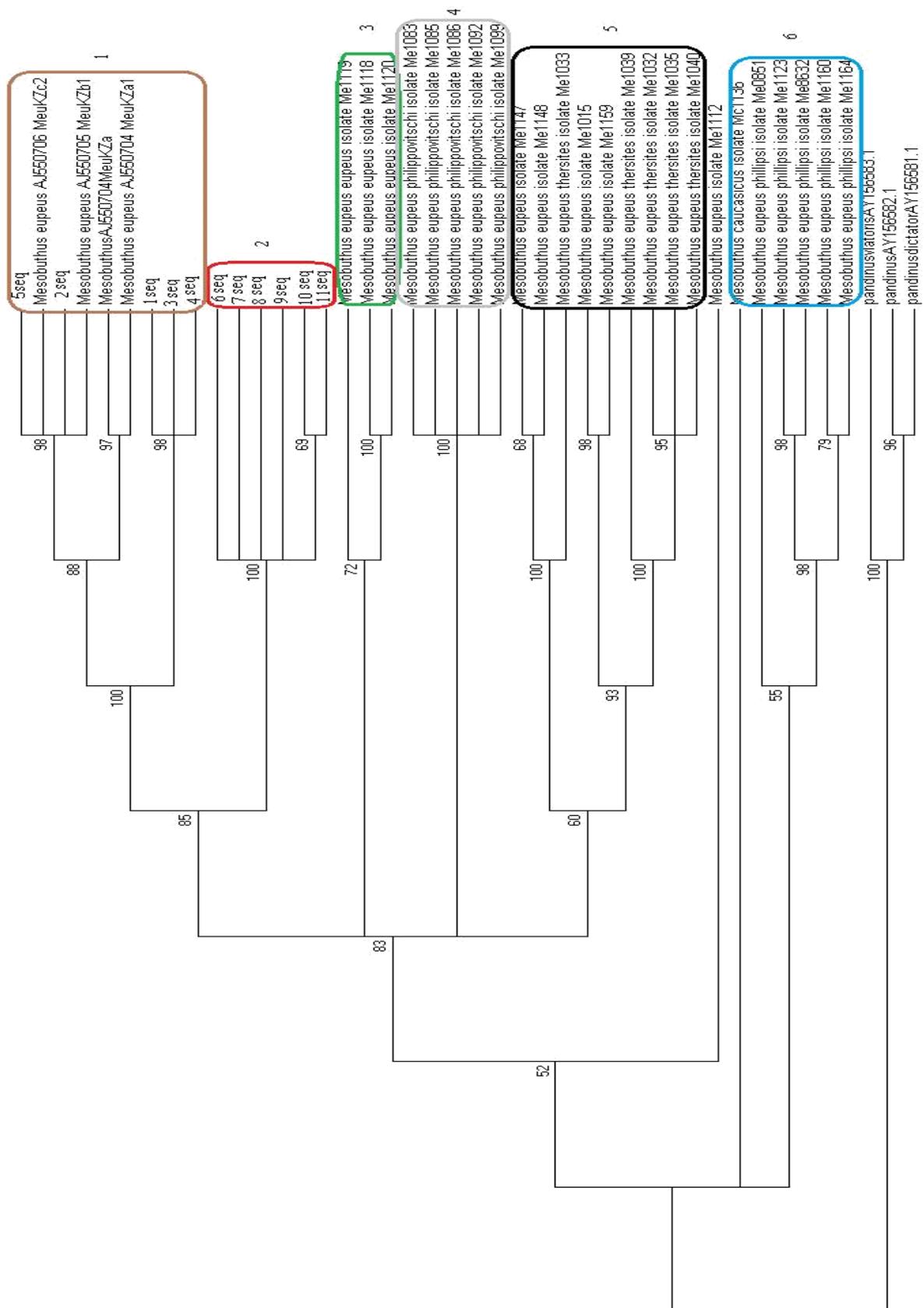


Рисунок – Кладограмма множественного анализа ДНК представителей рода *Mesobuthus*

Первый кластер, состоит из 4 субкластеров, где первый представлен сборной группой северо-казахскими популяциями *M. e. thersites*, второй – из отдельной клады изолированной кавказской популяции *M. e. eupeus*, третий – клады южно-каспийской популяции подвида *M. e. philippovitschi*, четвёртый субкластер сформирован двумя кладами, где первая представлена казахско-волжскими популяциями (собственные сиквенсы собранных скорпионов изученной территории Нижнего Поволжья), а вторая – хоросано-туркменскими популяциями *M. e. thersites*. Второй большой кластер, сформирован ирано-турецкими популяциями *M. e. phillipsi*. Изученные популяции скорпионофауны Жамбылской, Кызылординской областей Казахстана с высокой долей вероятности относятся к хоросано-туркменской популяции (*M. e. thersites*), но внутри кластера существует разделение (100% bootstrap), в котором особи, формируют одну кладу с хоросано-туркменской популяцией (*M.e. thersites*). Последовательности особей, обитающих на территории Саратовской области, Волгоградской области, Астраханской области формируют отдельный кластер. Анализ показал родство между представителями Жамбылско-Кызылординской фауны с представителями Волжской популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали проведённые исследования и изученные результаты в виде кладограммы, казахско-волжские, (изученные популяции скорпионов), не имеют близких связей с кавказскими. Можно констатировать, что распространение казахско-волжского таксона шло, несомненно, с востока, а не с юго-запада как можно было бы предположить ранее. Анализ показал родство между представителями жамбылско-кызылординской популяции с волжской популяцией, но 100% bootstrap поддержка доказывает обособленность волжской популяции от самого ближайшего подвида обитающего на территории Южного Казахстана.

Таким образом, нами установлено, что скорпион, обитающий на территории Нижнего Поволжья, представляет собой самостоятельный таксон и, исходя из географического положения, молекулярно-генетических данных по нему, претендует на статус самостоятельного вида *Mesobuthus volgensis* (Birula, 1925).

Выводы

1. Анализ литературных источников показал крайне слабую изученность данного вопроса.
2. Материал собранный на территории Богдинско-Баскунчакского заповедника (Астраханская обл., Ахтубинский р-н), памятника природы «Нижне-Банновский» (Саратовская обл, Красноармейский район) природного парка «Щербаковский» (Волгоградская обл., Камышинский р-н), Жамбылской, Кызылординской областей Южного Казахстана позволил установить места современного обитания скорпионов в центральной Азии и по северной границе ареала в Европейской части России.
3. К особенностям морфологии скорпионов рода *Mesobuthus* обитающих на территории Нижнего Поволжья и Южного Казахстана относятся: тело вместе с конечностями имеет тёмно-песочный оттенок, на анальной доле имеется два зубчика, на третьем каудальном сегменте (длина 2,5 мм) имеется 8 зубчиков, задний концевой зубчик сильно увеличен и имеет форму конуса. Высота третьего каудального сегмента (2 мм) меньше, чем нижние кили того же сегмента (2,5 мм), а вентральная поверхность метасомы (пятый членистый постабдомен) гладкая. На цефалоторэксе есть неотчётливый узор, из закруглённых тупых вершин треугольника. У пятого каудального сегмента высота (1,7 мм) меньше длины (2,5 мм) каждого из остальных каудальных сегментов и он темнее остальных.
4. Скорпионы на территории Нижнего Поволжья обитают исключительно в субаридных ландшафтах . Активно охотятся на протяжении всей ночи на кузнечиков (*Orthoptera*), тараканов (*Blattoptera*), пауков (*Araneae*), а при случайных встречах могут питаться мухами (*Diptera*) и фалангами (*Solifugae*). На территории Южного Казахстана скорпионы обитают на нагорно-ксерофитных ландшафтах сухих и полупустынных степей и основу их рациона составляют прямокрылые и чешуеобразные.

5. Данные сиквенсов по гену COI у скорпионов изученных популяций показывают отсутствие близкородственных связей с кавказским подвидом, т.е. распространение казахско-волжского таксона шло, несомненно, с востока, а не с юго-запада.
6. Данные 100% bootstrap доказывают обособленность популяции скорпионов Южного Казахстана от ближайших популяции, обитающих на территории Нижнего Поволжья.
7. Вид скорпиона с территории Нижнего Поволжья (исходя из его распространения, особенностей морфологии и молекулярно-генетических данных) представляет собой самостоятельный таксон (вид).

Лопат