

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 595.46

К МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛОГЕНИИ *EUSCORPIUS*
(SCORPIONES, EUSCORPIIDAE) ИЗ ТУРЦИИ

© 2003 г. В. Фет¹, Ай. Караташ², Э. В. Фет¹, А. Караташ²

¹Университет Маршалла, Хантингтон, Западная Виргиния, 25755–2510 США

²Университет Нигде, Нигде, Турция

e-mail: fet@marshall.edu

Поступила в редакцию 28.11.2002 г.

Видовой состав и таксономический ранг большинства скорпионов рода *Euscorpium* Thor. из Турции неясны (Fet, Braunwalder, 2000; Fet, Sissom, 2000). Малоизученный вид *E. ciliciensis* Birula 1898 был описан из Киликийского Тавра (Анатолия, Турция), с рекордной для рода *Euscorpium* высоты над уровнем моря (2400 м) (Birula, 1898). Кесслер (1874) описал из Грузии вид *E. mingrelicus*, впоследствии отмеченный в Турции (Бялыницкий-Бирюля, 1917; Kinzelbach, 1975) и на Балканах (Bonasina, 1980). В настоящее время *E. ciliciensis* считается либо синонимом, либо подвидом *E. mingrelicus* Kessl. (Kinzelbach, 1975; Fet, Sissom, 2000). Типовые экземпляры *E. ciliciensis* хранятся в ЗИН РАН (С.-Петербург); Фет (Fet, 1986) исследовал их и подтвердил, что они принадлежат к комплексу "*E. mingrelicus*", но не установил точного таксономического статуса. Морфологическая изменчивость *E. mingrelicus* из Грузии и России (Краснодарский край) была подробно описана (Fet, 1993), однако анатолийские популяции комплекса "*E. mingrelicus*" остаются неизученными. В недавнем "Каталоге скорпионов Мира" ряд балканских и анатолийских подвидов был перечислен в составе *E. mingrelicus* (Fet, Sissom, 2000). В последнее время использование новейших методов молекулярной филогенетики (Scherabon et al., 2000) позволило вывести европейский вид *E. gamma* Sarogiacco 1950 (Австрия, Италия, Словения, Хорватия) из состава *E. mingrelicus*. Продолжая это направление исследований, мы проанализировали последовательность ДНК гена 16S митохондриальной рибосомальной РНК (16S рРНК) для двух анатолийских популяций *Euscorpium*.

Материалы. 2 взрослые самки *Euscorpium*, использованные нами для анализа ДНК, имели следующие этикетки: 1 ♀, Турция, вилайет Нигде: Улукишла, дорога Гюмюш–Маден, 37°28' с.ш., 34°37' в.д., около 1750 м над ур. м., № 69, 23.V.2001, ZDUN/S 2001/69 (А. Караташ leg.); 1 ♀, Турция, вилайет Эскишехир: Алпу, дер. Отлук, 39°46' с.ш., 30°57' в.д., около 1200 м над ур. м., 6.IV.2001 (Ф. Калишкан leg.), ZDUN/S 2001/41. Скорпионы были зафиксированы в 96% этило-

вом спирте и отправлены на анализ ДНК в Университет Маршалла, Западная Виргиния, США. Были просмотрены также дополнительные экземпляры из Гюмюш–Маден.

Анализ ДНК. Лабораторная работа выполнена В. Фетом и Э.В. Фет в Университете Маршалла. Использовали стандартные протоколы (Gantenbein et al., 1999, 2000). Геномную ДНК выделяли из свежих или фиксированных в 96% этаноле тканей (нога) с помощью набора для экстракции Qiagen™ DNeasy. Выделенную ДНК амплифицировали в ходе ПЦР (полимеразной цепной реакции) в термоциклере Perkin Elmer 2400, при стандартных параметрах цикла (температура гибридизации 50°C). Праймеры для ПЦР были синтезированы в Университете Маршалла и имели последовательности: CGATTTGAACCTCAGATCA (18 нуклеотидов) and GTGCAAAGGTAGCATAATCA (20 нуклеотидов), что соответствует позициям 11.173–11.190 и 11.625–11.606 в митохондриальном геноме атлантического мечехвоста (*Limulus polyphemus*) (Lavrov et al., 2000). Продукт ПЦР выявляли электрофорезом в 1% агарозном геле и очищали с помощью нитроцеллюлозных фильтров Ultrafree MC 30000 (Millipore, Inc.). Автоматическое секвенирование по Сэнгеру проводилось в центре молекулярной генетики Университета Джорджии (Афины, Джорджия, США) на аппарате ABI 9600.

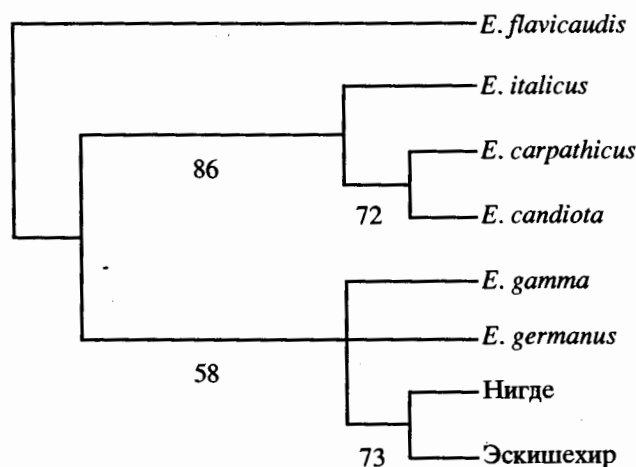
Филогенетический анализ. Выравнивание последовательностей ДНК, соответствующих 8 индивидуальным гаплотипам, производили с помощью компьютерной программы Clustal X (Thompson et al., 1997). Две новые последовательности из Турции были депонированы в электронной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) под номерами доступа AY152394 (EciGU1, Гюмюш–Маден, Nigde) и AY152395 (EciES1, Эскишехир, Eskisehir). Шесть последовательностей ДНК, опубликованных ранее нашей исследовательской группой (Fet et al., 2002; Gantenbein et al., 1999, 2000, 2001; Scherabon et al., 2000; Huber et al., 2001), были извлечены из базы данных GenBank. Таксоны, географическое происхождение, аббревиатуры и номера доступа для этих последовательностей

тей были: *E. flavicaudis* (DeGeer 1778): Лори, Воклюз, Франция, EfLA (AJ389381); *E. italicus* (Herbst 1800): Торторето, Аbruццо, Италия, EiT01 (AJ298067); *E. carpathicus* (Linnaeus 1767), Байле Геркулане, Румыния, EcRO1 (AY172337); *E. "carpathicus candiota"* Virula 1903: Калликратис, Крит, Греция, EcKA1 (AJ309213); *E. germanus* (C.L. Koch 1837): Обердраубург, Каринтия, Австрия, EgOB (AJ249553); *E. gamma* Сарогиаско 1950: Трогернер-Клам, Каринтия, Австрия, EgaTR (AJ249555). В качестве внешней группы использовали вид *E. flavicaudis*. Для филогенетического анализа использовали методы максимальной парсимонии (MP) и ближайшего связывания (NJ) компьютерной программы PAUP* 4(beta).10 (Swofford, 1998). Значимость внутренних ветвей филогенетического дерева определяли бутстрэп-тестом (1000 повторностей).

Итак, из 380 признаков 28 содержали информацию для парсимонии. Алгоритм MP "Исчерпывающий поиск" в программе PAUP* (исследовались схемы взвешивания транзиций: трансверсий: пробелов 2 : 1 : 0, 2 : 1 : 4, 3 : 1 : 0, 3 : 1 : 1, 3 : 1 : 4, 5 : 1 : 0 и 5 : 1 : 4) нашел единственное кратчайшее филогенетическое дерево (кладограмму) длиной 109 шагов, CI = 0.82, RI = 0.53 при схеме взвешивания 3 : 1 : 0. При анализе методом ближайшего связывания (NJ) при всех шести моделях генетического расстояния (абсолютное, Кимуры, Фелзенштейна, Джукса-Кантора, НКУ85, Тамуры-Неи) была получена дендрограмма, идентичная дендрограмме, полученной методом парсимонии. На рисунке представлена кладограмма, полученная методом MP.

Наибольшая статистическая поддержка (бутстрэп 86% для MP и NJ) была выявлена для ветви, включающей *E. italicus* и виды комплекса "*E. carpathicus*". Два вида комплекса "*E. carpathicus*" также образовывали монофилетическую ветвь (бутстрэп 72% для MP и 63% для NJ).

При проведении того и другого анализов сестринской группой двух азиатских популяций выступал европейский вид *E. germanus*; однако



Филогенетическое дерево (кладограмма) для изученных видов и популяций рода *Euscorpius*, полученное методом максимальной парсимонии. Цифрами обозначены показатели статистической поддержки ветвей (бутстрэп).

этот порядок ветвления не был статистически поддержан. Бутстрэп (58% для MP и 68% для NJ) показал только политомию трех ветвей: азиатских популяций, *E. germanus* и *E. gamma* (рисунок). Кроме того, монофилия двух азиатских популяций (73%) была выявлена только методом MP.

В таблице представлены данные по генетическому расстоянию (расстояние Кимуры).

Морфологическое обследование экземпляров из вилайета Нигде (Гюмюш-Маден), собранных поблизости от типового местонахождения *E. ciliciensis* (Болкар-Даг), показало, что они могут принадлежать к комплексу "*E. mingrelicus*", судя по гладкой поверхности сегментов метасомы, расстоянию между трихоботриями на неподвижном пальце клешни педипальп и наличию 3 трихоботрий в медиальной группе (*em* = 3) на внешней поверхности пателлы педипальп. В то же время экземпляры из вилайета Эскишехир имели *em* = 3, но также имели выраженные кили с зубчиками на сегментах метасомы, что обычно явля-

Генетическое расстояние (%), согласно модели Кимуры)

№	Популяция, вид	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Нигде	—							
2	Эскишехир	0.045	—						
3	<i>E. germanus</i>	0.069	0.070	—					
4	<i>E. gamma</i>	0.047	0.054	0.074	—				
5	<i>E. flavicaudis</i>	0.107	0.109	0.115	0.094	—			
6	<i>E. italicus</i>	0.068	0.065	0.100	0.061	0.097	—		
7	<i>E. carpathicus</i>	0.065	0.069	0.091	0.061	0.094	0.047	—	
8	<i>E. candiota</i>	0.093	0.096	0.114	0.078	0.122	0.065	0.059	—

ется диагностическим признаком для видового комплекса "*E. carpathicus*" (Fet, Soleglad, 2002). Более того, *E. carpathicus* (L.) из Румынии обычно имеет $em = 3$; также имеют $em = 3$ некоторые неясные формы с Балкан (например, "*E. germanus croaticus* Сарогіассо" из Хорватии и не имеющая названия форма из Родоп в Болгарии (Fet, 1993, 2000; Gantenbein et al., 2000). Некоторые из этих форм, помимо того, имеют редуцированные кили на метасоме. Таким образом, наблюдаемые признаки очевидно не являются диагностическими для анатолийских популяций.

Данные нашего предварительного анализа ДНК показывают, что ближайшими таксонами к анатолийским популяциям могут быть европейские виды *E. gamma* и *E. germanus*. Напротив, отдельная ветвь с сильной статистической значимостью была представлена комплексом "*E. carpathicus*" (и примаикающим к нему видом *E. italicus*). Этот комплекс был представлен видами *E. carpathicus* из Румынии и *E. "carpathicus candiota"* из Греции; первый из них недавно был восстановлен в ранге вида и подробно диагностирован на основе морфологических (Fet, Soleglad, 2002) и молекулярных (Fet et al., 2002) данных; статус греческой формы пока неясен. Наши молекулярные данные заставляют предположить, что комплекс "*E. carpathicus*" не находится в близком родстве с анатолийскими популяциями, а сходные морфологические признаки ($em = 3$, скульптура метасомы) являются результатом гомоплазии.

Шерабон с соавторами (Bonacina, 1980; Scherabon et al., 2000) недавно подтвердили также статус вида для *E. gamma*, описанного как подвид *E. germanus* и позднее включенного в состав подвидов *E. mingrelicus* (Fet, Sissom, 2000). Наши данные по ДНК получены для наиболее западных (*E. gamma*) и восточных (Турция) популяций (возможным видам) этого комплекса (Bonacina, 1980; Fet, 1993, 2000).

Таксономическая принадлежность изученных анатолийских популяций остается неясной. Однако поскольку одна из этих популяций собрана вблизи типового местонахождения *E. ciliciensis* (Карагёль, Болкар Даг, около 10 км от поселков Гюмюш и Маден), это видовое имя можно использовать для обозначения данной популяции. Таврский хребет, на гребне которого расположено оз. Карагёль, является одним из важнейших зоогеографических барьеров в Анатолии, а также районом эндемизма для многих видов (например, *Rana holtzi*, *Vipera bulgardaghica*). В районе Гюмюш–Маден *Euscorpius* были найдены как под камнями, так и на альпийских лугах и в сосновом лесу (*Pinus brutia*, *P. nigra*). Для второго местонахождения (Алпу, Эскишехир) характерна комбинация сухих степей и сосновых лесов, и более высокие летние температуры, чем в горах Тавра.

Другие данные по молекулярной систематике комплекса "*E. mingrelicus*" пока недоступны. Дальнейшие исследования должны показать, достаточна ли морфологическая и молекулярная дивергенция между *E. ciliciensis* и *E. mingrelicus* для выделения двух (или большего числа) видов. Выявленное нами генетическое расстояние между двумя изученными анатолийскими популяциями составляло 4.5%. Дивергенция в таких пределах обычно отмечалась для гена 16S на внутривидовом уровне рода *Euscorpius* (Fet et al., 2002; Gantenbein et al., 1999, 2000, 2001; Scherabon et al., 2000). Заметим, однако, что генетическое расстояние между европейским *E. gamma* и анатолийскими популяциями также невелико (4.7–5.4%) (таблица), меньше, чем между альпийскими *E. germanus* и *E. alpha* (более 6%) (Gantenbein et al., 1999, 2000). Необходимы дальнейшие исследования большого количества популяций из Турции, с Кавказа и Балкан для выявления состава комплекса "*E. mingrelicus*" и его взаимоотношений с другими видовыми комплексами разнообразного европейского рода *Euscorpius*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарны М. Солегладу и Б. Гантенбайну за их постоянную поддержку и помощь в исследованиях *Euscorpius*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бялыницкий-Бируля А.А., 1917. Членистоногие паукообразные Кавказского края. Ч. 1. Скорпионы // Зап. Кавк. Музея, Тифлис. Сер. А, 5. С. 1–253.
- Кесслер К.Ф., 1874. О русских скорпионах // Тр. Русск. энтомол. об-ва. Т. 8. Вып. 1. С. 3–27.
- Birula A.A., 1898. Ein Beitrag zur Kenntniss der Skorpionenfauna Kleinasiens // Тр. Русск. энтомол. об-ва. Т. 33. Вып. 1–2. С. 132–140.
- Bonacina A., 1980. Sistematica specifica e sottospecifica del complesso "*Euscorpius germanus*" (Scorpiones, Chactidae) // Riv. Mus. Civ. Sci. Natur. "Enrico Caffi" (Bergamo). V. 2. P. 47–100.
- Fet V., 1986. Notes on some *Euscorpius* (Scorpiones: Chactidae) from Greece and Turkey // Riv. Mus. Civ. Sci. Natur. "Enrico Caffi" (Bergamo). V. 9(1985). P. 3–11. – 1993. Notes on *Euscorpius mingrelicus* (Kessler, 1874) from the Caucasus // Riv. Mus. Civ. Sci. Natur. "Enrico Caffi" (Bergamo). V. 16(1993). P. 1–8. – 2000. Scorpions (Arachnida, Scorpiones) from the Balkan Peninsula in the collections of the National Museum of Natural History, Sofia // Hist. Natur. Bulgarica. V. 11. P. 47–60.
- Fet V., Braunwalder M.E., 2000. The scorpions (Arachnida, Scorpiones) of the Aegean area: current problems in taxonomy and biogeography // Belg. J. Zool. V. 130 (Suppl. 1). P. 17–22.
- Fet V., Gantenbein B., Fet E.V., Popa V., 2002. *Euscorpius carpathicus* (Linnaeus, 1767) from Romania (Scorpiones: Euscorpiidae): mitochondrial DNA data // Biogeographica (Paris). V. 78. № 4. P. 141–147.

- Fet V., Sissom W.D., 2000. Family Euscorpiidae // Catalog of the Scorpions of the World (1758–1998). N. Y.: New York Entomological Society. P. 355–381.
- Fet V., Soleglad M.E., 2002. Morphology analysis supports presence of more than one species in the "*Euscorpius carpathicus*" complex (Scorpiones: Euscorpiidae) // *Euscorpius*. № 3. P. 1–55.
- Gantenbein B., Fet V., Barker M., Scholl A., 2000. Nuclear and mitochondrial markers reveal the existence of two parapatric scorpion species in the Alps: *Euscorpius germanus* (C.L. Koch, 1837) and *E. alpha* Caporiacco, 1950, stat. nov. (Scorpiones, Euscorpiidae) // *Rev. Suisse Zool.* V. 107. № 4. P. 843–869.
- Gantenbein B., Fet V., Largiadèr C.R., Scholl A., 1999. First DNA phylogeny of *Euscorpius* Thorell, 1876 (Scorpiones: Euscorpiidae) and its bearing on taxonomy and biogeography of this genus // *Biogeographica* (Paris). V. 75. № 2. P. 49–65.
- Gantenbein B., Soleglad M.E., Fet V., 2001. *Euscorpius balearicus* Caporiacco, 1950, stat. nov. (Scorpiones: Euscorpiidae): molecular (allozymes and mtDNA) and morphological evidence for an endemic Balearic Islands species // *Organisms, Diversity and Evolution*. V. 1. № 4. P. 301–320.
- Huber D., Gantenbein B., Fet V., Scherabon B., 2001. *Euscorpius carpathicus* (L.) from Austria (Scorpiones: Euscorpiidae): phylogenetic position clarified by mitochondrial DNA analysis // Eds. Fet V., Selden P.A. *Scorpions 2001. In memoriam Gary A. Polis*. Burnham Beeches, Bucks: British Arachnological Society. P. 273–278.
- Kinzelbach R., 1975. Die Skorpione der Ägäis. Beiträge zur Systematik, Phylogenie und Biogeographie // *Zool. Jahrb., Abt. Syst.* V. 102. № 1. P. 12–50.
- Lavrov D.V., Boore J.L., Brown, W.M., 2000. The complete mitochondrial DNA sequence of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* // *Mol. Biol. Evol.* V. 17. P. 813–824.
- Scherabon B., Gantenbein B., Fet V., Barker M., Kuntner M. et al., 2000. A new species of scorpion from Austria, Italy, Slovenia and Croatia: *Euscorpius gamma* Caporiacco, 1950, stat. nov. (Scorpiones: Euscorpiidae) // Eds. Gajdoš P., Pekár S. *Proc. 18th European Coll. Arachnol., Stará Lesná, 1999. Ekológia* (Bratislava). V. 19. Suppl. 3. P. 253–262.
- Swofford D.L., 1998. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucl. Acids Res.* V. 24. P. 4876–4882.

THE FIRST DATA ON MOLECULAR PHYLOGENY OF *EUSCORPIUS* (SCORPIONES, EUSCORPIIDAE) FROM TURKEY

V. Fet¹, Ay. Karataş², E. V. Fet¹, A. Karataş²

¹Department of Biological Sciences, Marshall University, Huntington, West Virginia 25755–2510, USA

²Department of Zoology, Niğde, Turkey

The first data on molecular phylogeny (DNA sequences for 16S rRNA) of Anatolian scorpion populations tentatively identified as *Euscorpius ciliciensis* Birula 1898 are presented. The phylogenetic analysis performed showed their affinities to the European species *E. gamma* and *E. germanus*, but not to the "*E. carpathicus*" complex.