



شناسایی گونه‌ی جدیدی از عقرب‌های جنس

DNA Barcoding برای فلات ایران با استفاده از روش *Odontobuthus Vachon, 1950*

سارا ازغدی^{۱*}، امید میرشمسی^۲، شاهرخ نویدپور^۳، منصور علی آبادیان^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوسیستماتیک جانوری؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

sara_a80529@yahoo.com

۲. استادیار، بیوسیستماتیک جانوری، دکتری؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. استادیار، انگل‌شناسی، دکتری؛ آزمایشگاه مرجع عقرب، مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک کرج

چکیده

عقرب‌های جنس (1950) *Odontobuthus* (Vachon, 1950) متعلق به خانواده‌ی Buthidae و دارای چهار گونه‌ی *O. brevidigitus*, *O. bidentatus*, *O. odonturus*, *O. doriae* می‌باشند که در کشورهای ایران، هند، پاکستان، افغانستان، عراق و عمان توزیع شده‌اند. اعضای این تاکسون که همگی عقرب‌هایی حفار می‌باشند، در ایران به وسیله حداقل دو گونه‌ی *O. bidentatus* و *O. doriae* شناخته می‌شوند. حضور این جنس در نواحی شرقی ایران بر اساس گزارش‌های پراکنده‌ای تایید شده است، اما در مورد وضعیت گونه‌ای جمعیت‌های این عقرب در این نواحی اظهار نظر قطعی نشده است. در این مطالعه، مقایسه‌ی گونه‌های *Odontobuthus* بر اساس داده‌های توالی مربوط به ژن میتوکندریالی *COXI* با ۷۰۸ جفت نوکلئوتید انجام شد. مقایسه جمعیت‌های *Odontobuthus* sp. نواحی شرق و شمال شرق ایران، *O. doriae* مربوط به فلات مرکزی ایران و *O. bidentatus* مربوط به نواحی غرب و جنوب غرب ایران، با استفاده از روش بیشینه درست نمایی (Likelihood) و استنباط بیز (Bayesian) صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده، تک نیایی (Maximum Likelihood) و گونه‌های *O. bidentatus* و *O. doriae* را اثبات می‌کند، همچنین واگرایی قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت‌های *Odontobuthus* sp. نسبت به دو گونه‌ی دیگر مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از بررسی مقادیر فوائل زنتیکی، واگرایی زنتیکی قابل ملاحظه‌ای را بین کladهای به دست آمده نشان می‌دهند که مؤید وجود سه گونه کامل از این جنس در ایران می‌باشد.



بنابراین جمعیت‌های مربوط به نواحی شرق و شمال شرق ایران به گونه‌ی مجزا تعلق دارند که تصمیم گیری تاکسونومیک در مورد آن‌ها پس از انجام نمونه برداری‌های تکمیلی و مطالعات ریخت‌شناسی مقایسه‌ای ممکن خواهد بود.
واژه‌های کلیدی: عقرب - *COXI* - بیشینه درست نمایی - بیزن

Abstract

The genus *Odontobuthus* (Vachon, 1950) belongs to the family Buthidae which includes four species *O. doriae*, *O. odonturus*, *O. bidentatus* and *O. brevidigitus*. These species are distributed in Iran, India, Pakistan, Afghanistan, Iraq and Oman. Members of this taxon are burrowing scorpions which are known in Iran by at least two species *O. doriae* and *O. bidentatus*. The existence of this genus in the eastern regions of Iran was confirmed on the basis of scattered reports, but the exact taxonomic status of these populations has not clarified yet. In this study, sequence data from a ~708 bp fragment of *COXI* was compared and analyzed for *O. doriae*, from central Iranian Plateau, *O. bidentatus*, from southwest of Iran and *Odontobuthus* sp. from eastern Iran. The molecular phylogenetic analyses performed using maximum likelihood and Bayesian inferences. The results support the monophyly of *O. doriae* and *O. bidentatus*, but there is also a deep divergence between *Odontobuthus* sp. and other two species. In addition, the results of genetic distances revealed a considerable genetic divergence between the resulting clades which confirm the existence of three good species belong to the genus *Odontobuthus* in Iran. Therefore, the populations of the east and northeast Iran belong to separate species that taxonomic decisions about it will be possible after performing a detailed morphological study.

Key Words: Scorpion - *COXI* - Maximum likelihood - Bayesian

برخلاف تحقیقات وسیعی که روی ریخت‌شناسی عقرب‌ها انجام شده است، اخیراً روش‌های مولکولی در مطالعات سیستماتیک این راسته مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از ژن میتوکندریایی *16S rRNA* برای اولین بار توسط Gantenbein et al., (1999) به منظور بررسی فیلوژنی جنس *Euscorpius* صورت گرفت و اولین تحلیل فیلوژنی مولکولی برای این راسته نیز در ایران توسط Mirshamsi et al., (2010) روی گونه‌ی *Mesobuthus eupeus* از خانواده Buthidae با استفاده از ژن میتوکندریایی *COXI* انجام گرفت. تحلیل‌های فیلوژنی مولکولی بر



اساس مارکرهای میتوکندریالی و ژنوم هسته‌ای برای سایر گونه‌های عقرب در ایران تاکنون انجام نگرفته است و به همین دلیل، در مورد روابط درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای خانواده‌های عقرب در ایران اطلاعات جامعی در دسترس نیست. در این میان جنس *Odontobuthus* نیز از این قاعده مستثنی نمی‌باشد. عقرب‌های جنس (*Odontobuthus* Vachon, 1950) متعلق به خانواده *O. brevidigitus* و *O. bidentatus*, *O. odonturus*, *O. doriae* Buthidae و دارای چهار گونه‌ی *O. bidentatus*, *O. odonturus*, *O. doriae* و *O. brevidigitus* می‌باشند که در کشورهای ایران، هند، پاکستان، افغانستان، عراق و عمان پراکنده شده‌اند. اعضای این تاکسون که همگی عقرب‌های حفار می‌باشند، در ایران به وسیله حدائق دو گونه‌ی *O. doriae* و *O. bidentatus* شناخته می‌شوند. حضور این جنس در نواحی شرقی ایران بر اساس گزارش‌های پراکنده‌ای تایید شده است (Lowe, 2010)، اما در مورد وضعیت گونه‌ای جمعیت‌های این عقرب در این نواحی اظهار نظر قطعی نشده است. بر همین اساس این مطالعه با هدف مقایسه‌ی گونه‌های جنس *Odontobuthus* بر اساس داده‌های توالی مربوط به یک قطعه ۷۰۰ نوکلئوتیدی از ژن میتوکندریالی *COX1* انجام گردید.

در مجموع ۱۸ نمونه *Odontobuthus crassicauda* (Olivier, 1807) و یک نمونه *Androctonus* به عنوان گروه خارجی در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت (GenetBioTM(Seoul, South Korea)) صورت گرفت. واکنش زنجیره ای پلی مراز برای تکثیر یک بخش حدوداً ۷۰۰ نوکلئوتیدی از زیر واحد ۱ ژن سیتوکروم اکسیداز، با استفاده از یک جفت پرایمر (LCO1490, Nancy) انجام شد. توالی های میتوکندریالی به دست آمده پس از ویرایش با نرم افزار Sequencher 4.1.1 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) توسط نرم افزار ClustalW، هم ردیف شدند.

روابط فیلوزنیک پس از تعیین مدل تکاملی نوکلئوتیدی توسط نرم افزار Modeltest ، با استفاده از روش های بیشینه درست نمایی (Maximum Likelihood) و استنباط بیزین (Bayesian) و با کمک نرم افزار های MrBayes v.3.1 (Ronquist and Swofford 1998) PAUP

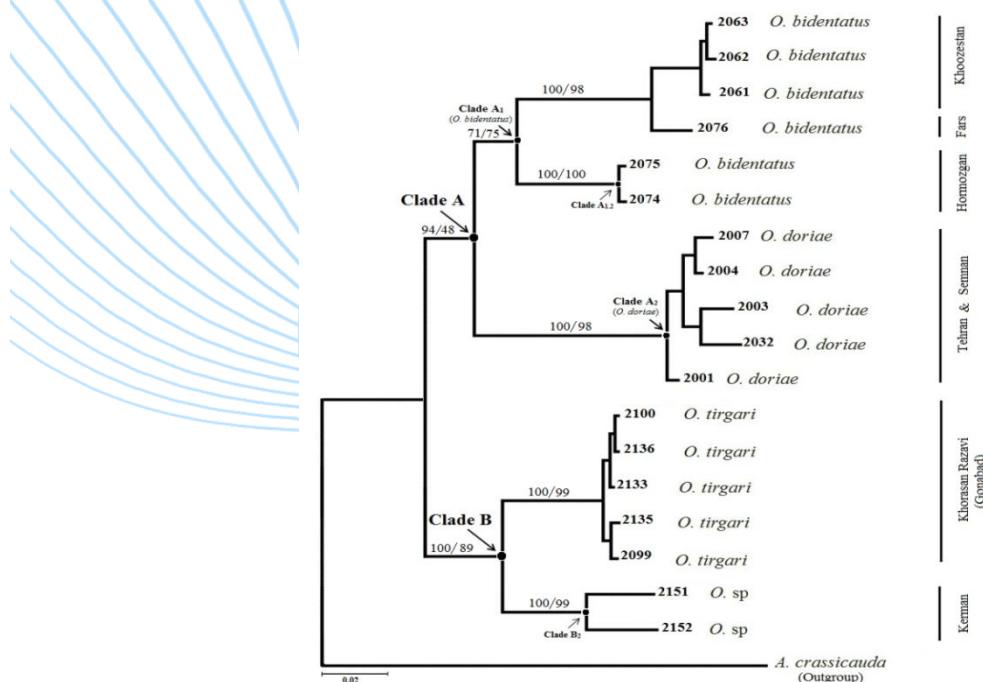


(Huelsenbeck 2003) مورد بررسی قرار گرفتند. در نتایج به دست آمده، درخت اجماع حاصل از تحلیل بیزن با توپولوژی حاصل از تحلیل بیشینه‌ی درست نمایی همخوانی دارد و تقریباً هیچ گره اصلی در تناقض با درخت ML نمی‌باشد. در هر دو درخت، دو کlad مجزای A و B قابل مشاهده می‌باشد. تقسیم بندی کlad A به دو زیر کlad (O. *bidentatus*) A₁ و A₂ (O. *doriae*) تایید کننده آخرین بررسی ریخت شناسی انجام شده بر روی این جنس است. بر اساس ویژگی‌های ریخت شناسی، اعتبار دو تاکسون O. *bidentatus* و O. *doriae* به عنوان دو گونه‌ی مجزا بر اساس تفاوت در صفات ساختاری کلیدی همانند تعداد لب‌های جانبی و شکمی کمان مخرجی، تعداد برآمدگی‌های کارن شکمی بند‌های دوم و سوم متازوما و تعداد دندانه‌های سری مورب لبه قدامی شکمی بند چهارم، مورد تایید واقع شده است که تمایز این دو گونه از هم در درخت‌های به دست آمده در این بررسی، توسط بوت استرپ‌های بالا حمایت می‌شوند.

استنباط فیلوزنتیکی بر مبنای توالی‌های سیتوکروم اکسیداز زیر واحد 1 در این تحلیل، به طور مشخصی نشان می‌دهد که نمونه‌های مربوط به جمعیت (کlad B) Odontobuthus sp. مربوط به نواحی شرقی ایران از نمونه‌های مربوط به دو گونه دیگر متمایز می‌باشند. این تمایز براساس فواصل ژنتیکی نیز مورد تایید واقع شد. در بررسی میانگین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای برای این سه گونه بر اساس فاصله O. *bidentatus* sp. و O. *doriae* sp. و بیشترین میزان آن (۱۲٪) بین گونه‌های O. sp. و O. *doriae* مشاهده شد که این میزان واگرایی ژنتیکی محاسبه شده بین این سه جمعیت، مؤید جدایی کامل آن‌ها از هم می‌باشد. این درحالی است که میانگین فاصله درون گونه‌ای در سه گونه مورد بررسی (۲٪) می‌باشد. یکی از مشخصه‌های جالب توجه درخت‌های حاصل از تحلیل‌های فیلوزنتیک داده‌های COXI در این مطالعه، حضور زیر کlad های کاملاً مجزای A_{1,2} و B₂ در توپولوژی‌های به دست آمده می‌باشد که با توجه به کمبود تعداد نمونه از این نواحی، تصمیم گیری تاکسونومیک در رابطه با این زیر گروه‌ها که با بوت استرپ‌های بالایی نیز حمایت می‌شوند، در حال حاضر دشوار بوده و نیازمند جمع آوری نمونه



های بیشتری از این نواحی می باشد. در نهایت، با توجه به نتایج به دست آمده از تحلیل های فیلوزنتیک و همچنین با توجه به مقایسات ریخت شناختی و ریخت سنجی روی نمونه های حاضر، به نظر می رسد جمعیت های *Odontobuthus* مربوط به نواحی شرق و شمال شرق ایران (به گونه ای مجزا تعلق دارند که تصمیم گیری تاکسونومیک در مورد آن ها پس از انجام نمونه برداری های تکمیلی و مطالعات ریخت شناسی مقایسه ای ممکن خواهد بود.



شکل ۱- فیلوگرام حاصل از آنالیز Bayesian توالی های *COXI* گونه های جنس *Odontobuthus*. احتمال پسینی (چپ) و مقادیر بوت استرپ (راست) مربوط به درخت BI و ML بالای هر شاخه مشخص شده است.



منابع

- Gantenbein B, Fet V, Largiadèr, C.R, Scholl A. First DNA phylogeny of the genus *Euscorpius* Thorell, 1876 (Scorpiones: Euscorpiidae) and its bearing on the taxonomy and biogeography of this genus. *Biogeographica* (Paris) 1999; 75: 59–72.
- Lowe G. A new species of *Odontobuthus* (Scorpiones: Buthidae) from northern Oman. *Euscorpius* 2010; 96: 1-22.
- Mirshamsi O, Sari A, Elahi E, Hosseinie S. Phylogenetic relationships of *Mesobuthus eupeus* (C.L. Koch, 1839) inferred from COI sequences (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Natural History* 2010; 44: 2851-2872.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19:1572–1574.
- Swofford DL. 1998. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland (MA): Sinauer Associates.