

تنوع ژنتیکی عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس و سلسئی با استفاده از تکنیک RAMS (Random Amplified Microsatellites) در خوزستان

سعید پیرمرادی^۱، عباس جلودار^{۲*} و هدیه جعفری^۳

^۱ دانش‌آموخته‌ی دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ استادیار مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

دریافت: ۱۳۹۸/۵/۸

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۷

چکیده

عقرب‌های خانواده بوتیده دارای جنس‌های متنوعی در جهان و از جمله در ایران‌اند که یکی از آن‌ها جنس هوتنتوتا است. علی‌رغم این که این عقرب یکی از چند عقرب مهم از لحاظ پزشکی است، تا کنون مطالعه‌ی ملکولی در خصوص روابط فیلوژنتیکی آن در ایران صورت نگرفته است. در این مطالعه، ۱۰ نمونه از هر کدام از عقرب‌های گونه هوتنتوتا زاگروسنسیس و سلسئی از مناطق مختلف استان خوزستان جمع‌آوری گردید و سپس جهت بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از تکنیک RAMS (Random Amplified Microsatellites) و PCR-RFLP مورد مطالعه قرار گرفتند. آغازگر P-CCA از بین ۶ آغازگر RAMS که به کمک واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت، باندهای واضح و تکرارپذیری تولید کرد. از ۲۰ نمونه عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس و سلسئی تعداد کل ۷۸ باند تولید شد که از این تعداد باندهای پلی‌مورفیک و مونو‌مورفیک به ترتیب، ۹۴/۸ و ۵/۲ بودند. اندازه‌ی باندهای تولید شده با استفاده از این آغازگر بین ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید متفاوت بود. پس از امتیازدهی الگوی باندهای حاصله بر روی ژل الکتروفورز، گروه‌بندی نمونه‌ها با استفاده از ضریب شباهت دایس و الگوریتم UPGMA انجام شد. نتایج دندروگرام نشان داد که نمونه‌های مربوط به هوتنتوتا زاگروسنسیس و سلسئی با ضریب تشابه به ترتیب، ۰/۶۵ و ۰/۶۰ در یک گروه قرار گرفتند، هرچند که ناهمگونی بین نمونه‌های دو گونه مشاهده شد. دو نمونه گردآوری شده از دزفول (SE5 و HZ9) از بقیه‌ی نمونه‌های هم‌گروه خود کاملاً متفاوت بودند، که این نتیجه به وسیله‌ی آزمایش PCR-RFLP مورد تأیید قرار گرفت. نتایج حاصل از تحلیل دندروگرام تنوع و جدایی ژنتیکی درون گونه‌ای اعضای جمعیت عقرب جنس هوتنتوتا در استان خوزستان را نشان داد. این مطالعه کاربرد استفاده از تکنیک RAMS به عنوان ابزاری به منظور بررسی تنوع ژنتیکی عقرب‌ها در این منطقه را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: عقرب، هوتنتوتا زاگروسنسیس، هوتنتوتا سلسئی، فیلوژنی، RAMS

مقدمه

خانواده‌ی عقرب‌های بوتیده با ۱۰۵۳ گونه و تحت ۹۲ جنس بزرگترین خانواده در بین عقرب‌ها در جهان به شمار می‌آیند، هر چند که اطلاعات منتشر شده‌ی زیادی در مورد روابط فیلوژنتیک درون خانواده‌ای از آن‌ها در دسترس

* نویسنده مسئول: عباس جلودار، دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

E-mail: jolodara@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

عقرب اورتوشیروس ایرانوس (Jafari et al. 2017)، مزوبوتوس اپئوس (Nikkahah et al. 2019) و همی سکورپیوس لپتوروس (Jolodar 2019) اشاره کرد. همچنین در بررسی فیلوژنی جنس ادنتوبوتوس استان خراسان حداقل پنج گونه از این جنس در ایران گزارش شده است، که تحلیل‌های مورفومتریک آماری و شواهد مولکولی، جدایی این گونه‌ها را تایید می‌کند (Mirshamsi et al. 2010). مطالعه‌ی درون گونه‌ای دیگری که بر روی جنس آندروکتونوس کراسیکودا با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز در ترکیه انجام شد، عدم وجود تنوع درون گونه‌ای در نمونه‌های جدا شده را نشان می‌داد (Ozkan et al. 2007).

ریزماهواره‌ها توالی‌های ساده‌ی تکرار شونده‌ای هستند که به عنوان یک منبع ارزشمند به منظور بررسی پلی-مورفیسم ژنتیکی در پستانداران و گیاهان به کار می‌روند (Weber et al. 1990). از آن‌ها در حضور میزان ناچیز ژنومیک DNA و به کمک PCR و بدون نیاز به توالی‌یابی می‌توان در بررسی‌های تنوع ژنتیکی استفاده کرد. این یک روش ساده و ارزان است که اولین بار توسط Zietkiewicz و همکاران در ۱۹۹۴ توسعه داده شد. از این روش برای مطالعه‌ی گیاهی از جنس Arabidopsis و با طراحی آغازگرهایی بر اساس نوکلئوتیدهای CT تکرار شونده، تحت عنوان تکنیک Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP) استفاده گردید (Wu et al. 1994). از این تکنیک به منظور مطالعه‌ی ژنوم قارچ‌ها نیز استفاده شده است (Hantula et al. 1996).

در این مطالعه تنوع ژنتیکی دو گونه عقرب جنس هوتنتوتا در استان خوزستان برای اولین بار با استفاده از تکنیک RAMS و PCR-RFLP صورت می‌گیرد. با توجه به حضور جمعیت‌های نامشخص از این جنس، احتمال شناسایی گونه یا تحت گونه جدید محتمل است.

مواد و روش کار

تعداد ۱۰ نمونه از هر کدام از گونه عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس و هوتنتوتا سلسئی به طور شبانه و با استفاده

نیست (Rein et al. 2015). از طرفی نشان داده شده است که مورفوتاکسونومی‌ها محدودیت‌هایی در تمایز و تعریف مرزبندی‌های گونه‌ای دارند (Fet et al, 2003). به طوری که، اطلاعات حاصل از بیش تر این مطالعات به حدی ناکافی است که فقط اطلاعات در مورد تاکسون‌های چندگونه در دسترس است. بنابراین، مشخص است که بدون داشتن اطلاعات مولکولی از عقرب‌های این خانواده، کاستی بزرگی در درک تنوع، توزیع و تکامل درون گونه‌ای این تاکسون‌ها وجود دارد.

امروزه، تعداد محدودی از مطالعات ملکولی در دسترس است که به بررسی فیلوژنی مولکولی در بین اعضای خانواده بوتیده پرداخته‌اند (Gantenbein et al. 2003; Mirshamsi et al. 2010; Sousa et al. 2011). اولین مطالعه‌ی فیلوژنی مولکولی بر روی خانواده‌ی بوتیده با استفاده از ژن 16SrRNA انجام شد (Fet et al. 2003). مطالعه‌ی فیلوژنی مولکولی در ایران بر روی گونه مزوبوتوس اپئوس که با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز انجام شد، یک واگرایی واضح بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق شمالی و جنوبی را نشان داد. در این مطالعه دو دودمان مجزا از مزوبوتوس که مجموعه‌ای از گونه‌ها با ویژگی‌های مورفولوژیکی بسیار مشابه را تشکیل می‌دهند، مشاهده شد (Mirshamsi et al. 2010). نتیجه‌ی یک مطالعه‌ی دیگر نیز که بر اساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز صورت گرفت، جدایی نسبی این عقرب را در استان خوزستان علی‌رغم نزدیکی فاصله‌ی ژنتیکی، نشان می‌داد (Jolodar, 2019).

مطالعه بر روی ژن پپتیدتوکسین MeBTX غده زهر عقرب مزوبوتوس اپئوس استان خوزستان نشان داد که صرف نظر از تشابه بالای اسید آمینه‌ای و پل‌های محافظت شده دای سولفیدی، این ژن احتمالاً عضو جدیدی از خانواده‌ی پپتیدتوکسین‌های این عقرب محسوب می‌شود، هر چند که از منشاء مشترکی سرچشمه گرفته‌اند (Jolodar et al. 2013).

از دیگر مطالعات تنوع ژنتیکی که بر روی عقرب‌های دیگر استان خوزستان و با استفاده از ژن‌های میتوکندریایی صورت گرفته است، می‌توان به بررسی رابطه‌ی فیلوژنی

برنامه‌ی حرارتی PCR به صورت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۶/۹ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه با ۲۵ دور تکرار و نهایتاً ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

به منظور بررسی محصول واکنش PCR، ۱۰ میکرولیتر از نمونه با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و به چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد حاوی بافر TAE و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر Safe stain اضافه شد و با ولتاژ ۷-۵ ولت به ازای هر سانتی‌متر فاصله‌ی بین دو الکترود به مدت ۴۵ دقیقه در کنار مارکر DNA ۱۰۰ نوکلئوتیدی الکتروفورز گردید. سپس با استفاده از دستگاه ژل داک از آن عکس‌برداری صورت گرفت.

ده میکرولیتر از محصول PCR را در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱ میکروگرم محصول PCR در حضور ۲ میکرولیتر بافر X10 و ۱ یونیت آنزیم محدودالتر EcoRI هضم شد.

ترسیم دندروگرام با استفاده از نرم افزار NTSYS (Version 2.0) و به کمک الگوریتم UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) انجام گردید (Edgar et al. 2004; Sneath et al. 1973). درصد هم‌خوانی باندها با استفاده از ضریب تشابه دایس محاسبه گردید (Dice, 1945). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی جهت افتراق بین نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار PCoA (Principal Coordinate Analysis) انجام گردید.

نتایج

افزوده‌سازی قطعات ژنی به کمک تکنیک RAMS

با مقایسه‌ی متوسط صفات مورفومتریک، دو گونه‌ی عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس و هوتنتوتا سلسی فقط در سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند.

از نور ماورای بنفش از هشت منطقه مختلف استان خوزستان که از زیستگاه‌های این نوع عقرب به شمار می‌آید، جمع‌آوری گردید. محل جمع‌آوری نمونه‌ها به همراه طول و عرض جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری با استفاده از دستگاه مکان‌یاب (GPS) ثبت شد. پس از انتقال نمونه‌ها، جهت شناسایی آن‌ها از کلید تشخیص ارائه شده توسط (Vachon et al. 1974; Lamoral et al. 1979) استفاده گردید.

به منظور استخراج ژنومیک DNA عقرب، ۰/۱ تا ۰/۵ گرم از بافت پای عقرب در حضور نیتروژن مایع خرد گردید و سپس مقدار ۶۰۰ میکرولیتر میلی‌لیتر از بافر RSB (10 mM Tris-HCl pH 7.4/ 10 mM NaCl/ 25 mM EDTA, SDS 1%) اضافه شد و مخلوط به صورت هموژنیزه درآورده شد. ژنومیک DNA با میزان هم حجم فنل/کلروفرم و یک بار هم با میزان هم حجم کلروفرم استخراج گردید. در نهایت به وسیله‌ی اتانول خالص و ۳ مولار استات سدیم رسوب داده شد.

به منظور افزوده‌سازی قطعات ژنی 12SrRNA واکنش PCR برای هر نمونه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۳۵۰ نانوگرم الگوی DNA، بافر 1 X PCR، dNTPs (۰/۲۵mM)، کلرید منیزیم (۱/۵ mM)، آغازگر رفت و برگشت (هر کدام ۰/۴μM)، DNA پلی‌مراز Taq (۰/۵ U) انجام گرفت. برنامه‌ی حرارتی PCR به صورت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه با ۵ دور تکرار، سپس ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۵۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه با ۳۵ دور تکرار و نهایتاً ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

به منظور انجام واکنش RAMS هر نمونه در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰ نانوگرم ژنومیک DNA، بافر 1 X PCR، dNTPs (۰/۲۵mM)، کلرید منیزیم (۱/۵ mM)، آغازگر (1μM)، DNA پلی‌مراز Taq (۰/۵ U) انجام گرفت.

Table 1: Location of scorpion specimens along with latitude and longitude of sampling regions in Khuzestan province

Longitude	latitude	Region	Samples
"24'15°48	"06'46°32	Bidrobe	HZ10, HS8, HS10
"18' 47° 49	"29' 31° 31	Baghmalek	HZ8, HS1, HS3
"38' 00° 49	"55' 58° 31	Masjedsolei man	HZ3 HZ6,
"03' 32° 49	"07' 15° 31	Ramhormoz	HZ1, HZ4
"56'52° 49	"13' 46° 31	Izeh	HZ5, HZ2
"36'33°48	"41'36°32	Dezful	HZ9, HZ7, HS4, HS5
"78' 31° 48	"48' 00° 32	Shush	HS2 HS6,
"46'31°48	"45'12° 32	Chogha Zambil	HS7 HS9,

بر روی ژل آگاروز بر اساس وزن ملکولی دسته‌بندی می‌شود. تصویر شماتیک افزوده‌سازی قطعات ژنی با استفاده از آغازگر P-CCA در Fig. 1 نشان داده شده است.

در تکنیک RAMS توالی‌های بین بخش‌های انتهایی دو ریزماهواره که در فاصله‌ی مناسبی از هم قرار دارند، به کمک PCR افزوده‌سازی می‌شود و سپس محصول نهایی

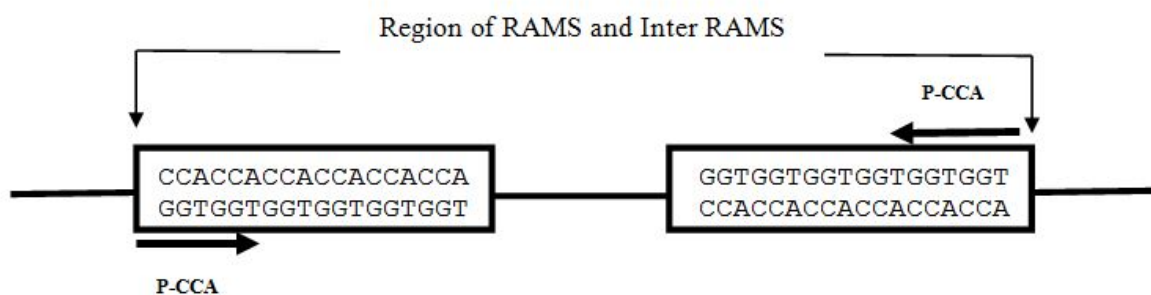


Fig. 1: Schematic image of the region was amplified by PCR using P-CCA primer in the RAMS technique

باند‌های واضح بر روی ژل آگاروز نمود. بقیه‌ی آغازگرها به دلیل افزوده‌سازی ضعیف و عدم تکرارپذیری از مطالعه کنار گذاشته شدند.

با مطالعه‌ی منابع و بر اساس ریزماهواره‌های موجود در بندپایان، ۶ آغازگر انتخاب شد (Hantula et al. 1996) که فقط آغازگر تکرار شونده سه نوکلئوتیدی P-CCA تولید

Table 2: The sequence of primers used in this study. The following symbols are used in the design of the primers: W(A/T), H(A/C/T), B(C/G/T), R(A/G) and D(A/G/T)

Primer	Tm	Nucleotides
16S-F	57.0	5'-AGAGTGACGGGCAATATGTG
16S-R	59.0	5'-CAGCGGCTGCGTTATAC
P-ACA	45.8	5'-BDBACAACAACAACAACA
P-CCA	50.3	5'-DDBCCACCACCACCACCA
P-CGA	50.3	5'-DHBCGACGACGACGACGA
P-GGA	50.3	5'-HHBGGAGGAGGAGGAGGA
P-GACA	48.0	5'-WBGACAGACAGACAGACA
P-RG	50.3	5'-RGCACACACACACACA

PCR، قطعات ژنی تولید شده در هر نمونه شمارش و با استفاده از الگوریتم صفر و یک دسته‌بندی شدند. با توجه به Fig 2، تولید بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد قطعات ژنی مربوط به نمونه عقرب HZ4 و HZ1 با تعداد به ترتیب، ۷ و ۴ بود. تعداد باندهای RAMS تولید شده برای آغازگر P-CCA بین ۳-۷ با میانگین ۵ برای هر آغازگر بود.

افزوده‌سازی قطعات ژنی که بر روی ده نمونه از عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس استان خوزستان با استفاده از آغازگر P-CCA و به کمک تکنیک RAMS صورت گرفت، در Fig 2 دیده می‌شود. در این تصویر یک ستون نیز مربوط به نمونه کنترل خارج از گروه مربوط به گونه‌ی عقرب همی اسکورپیوس لپتوروس قرار دارد. با الکتروفورز محصول

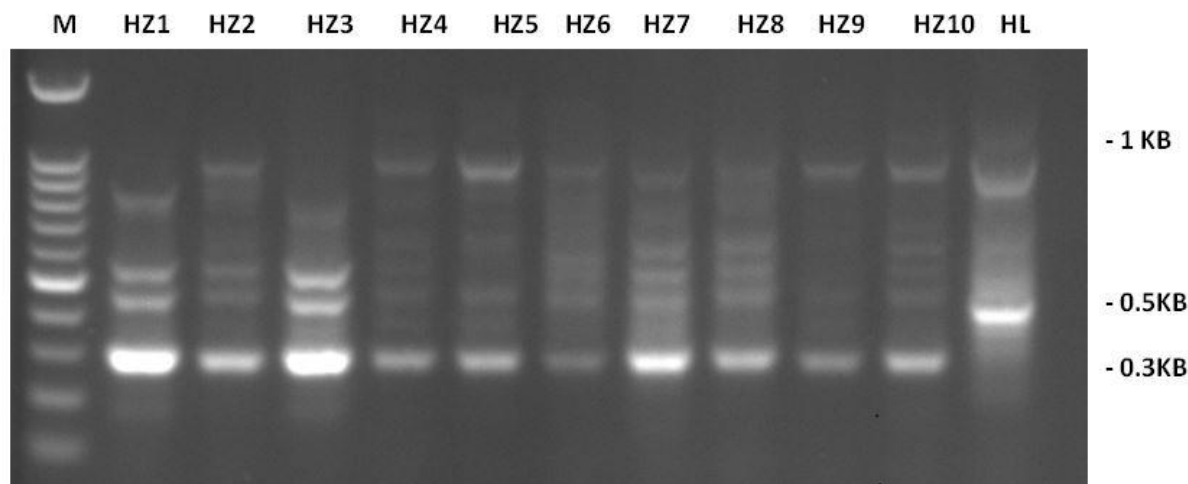


Fig. 2: Agarose gel electrophoresis of the amplified PCR products using RAMS technique on 1% agarose gel. DNA marker in column M and PCR products of scorpion *Hottentotta Zagrosensis* in columns HZ1 to HZ10. *Hemiscorpius lepturus* specimen (HL) was considered as an out group species

P-CCA و به کمک تکنیک RAMS صورت گرفت، در Fig. 3 نشان داده شده است. در این تصویر ستون HL به عنوان نمونه کنترل خارج از گروه مربوط به گونه عقرب همی اسکورپیوس لپتوروس قرار دارد. الگوی تولید باند در عقرب هوتنتوتا سلسی نسبت به هوتنتوتا زاگروسنسیس نسبتاً ساده‌تر بود. با الکتروفورز محصول PCR، قطعات ژنی مربوطه شمارش و با استفاده از الگوریتم صفر و یک دسته‌بندی شدند. با توجه به Fig 3، بیش‌ترین تعداد قطعات ژنی مربوط به نمونه عقرب HS6 با تعداد قطعات ژنی ۶ بود.

افزوده‌سازی با آغازگر P-CCA در عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس الگوی نسبتاً پیچیده‌ای نشان داد، به طوری که در سه ناحیه وزن ملکولی تولید باندهای پلی‌مورفیک نمود. در ناحیه‌ی 1Kb به جز دو نمونه HZ1 و HZ3 همه‌ی نمونه‌ها این باند را تولید نمودند. نکته جالب این که در همه‌ی نمونه‌ها باندی در ناحیه‌ی ۲۵۰ نوکلئوتیدی قابل مشاهده بود، که این امر نشان می‌داد که احتمالاً این باند یک مارکر محافظت شده پلی‌مورفیک در این گونه عقرب است. در ناحیه‌ی وزن ملکولی ۴۵۰-۵۵۰ نوکلئوتیدی نیز دو نمونه HZ1 و HZ3 تولید باند واضح نمودند (Fig. 2). افزوده‌سازی قطعات ژنی که بر روی ده نمونه عقرب هوتنتوتا سلسی استان خوزستان با استفاده از آغازگر

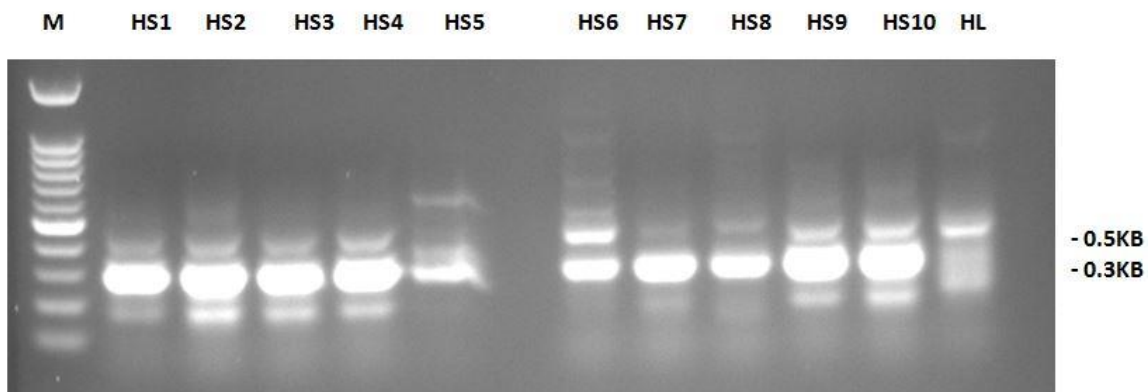


Fig. 3: Agarose gel electrophoresis of the amplified PCR products using RAMS technique on 1% agarose gel. DNA marker in column M and PCR products of scorpion *Hottentotta saulcyi* in columns HS1 to HS10. *Hemiscorpis lepturus* specimen (HL) was considered as an out-group species.

نسبتاً ضعیف‌تر مشاهده گردید. در نمونه HS5 یک باند منحصر به فرد در ناحیه‌ی ۷۰۰ نوکلئوتیدی دیده شد که در دیگر نمونه‌ها مشاهده نگردید. بر خلاف عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس، در نمونه‌های عقرب هوتنتوتا سلسی در ناحیه‌ی وزن ملکولی ۱۰۰۰ نوکلئوتیدی باندی مشاهده نشد.

نتیجه‌ی افزوده‌سازی آغازگر P-CCA در همه‌ی نمونه‌های عقرب هوتنتوتا سلسی تولید یک باند قوی در ناحیه‌ی وزن ملکولی ۲۵۰ نوکلئوتیدی بود که احتمالاً نشان‌دهنده‌ی یک باند پلی‌مورفیک و محافظت شده در این گونه از عقرب است. علاوه بر آن، در همه‌ی نمونه‌ها در ناحیه‌ی وزن ملکولی ۴۰۰ نوکلئوتیدی، به جز نمونه HS5، یک باند پلی-مورفیک دیده شد، که این باند در نمونه‌های HS7 و HS8

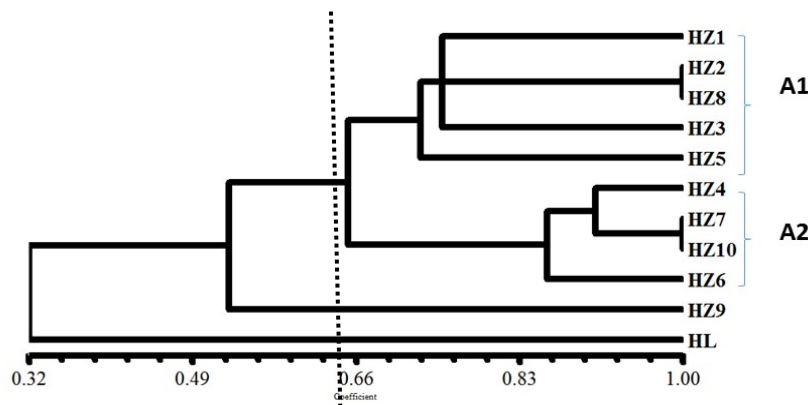


Fig. 4: Dendrogram derived from cluster grouping based on Dice similarity coefficient using the band pattern of *Hottentotta Zagrosensis* scorpion specimens using UPGMA algorithm and NTSYS software. The coefficient of similarity (0.65) shown by the dotted line

همان طور که در دندروگرام Fig 4 مشاهده می‌شود، تعداد ۱۰ نمونه عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس بر اساس پروفایل ایجاد شده به کمک تکنیک RAMS به دو دسته مجزای A1 و A2 قابل تقسیم‌اند. گروه A1 شامل نمونه‌های HZ1, HZ2, HZ3, HZ8 و HZ5 می‌باشد. نمونه‌ی

به طور کلی با افزوده‌سازی به کمک آغازگر P-CCA از ۲۰ نمونه عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس و سلسی تعداد کل ۷۸ باند بین ۱۰۰-۱۰۰۰ نوکلئوتید تولید شد که از این تعداد باندهای پلی‌مورفیک و مونومورفیک به ترتیب، ۹۴/۸ و ۵/۲ بودند.

است. در واقع، پراکنش نمونه‌ها در گروه A بیان‌گر گوناگونی و تنوع در بین نمونه‌های این گروه است. نکته جالب در این دندروگرام نمونه‌ی HZ9 است که به طور کلی از بقیه‌ی نمونه‌ها جدا افتاده، که این نشان از تفاوت زیاد آن با بقیه‌ی نمونه‌ها دارد. نمونه‌ی HL به خوبی نیز به صورت خارج از گروه قرار دارد.

HZ5 نیز گرچه در این همین گروه قرار دارد، ولی از بقیه نمونه‌ها جدا افتاده است. نمونه‌های HZ4, HZ6, HZ7 و HZ10 در زیر گروه A2 جای گرفتند. نمونه‌ی HZ9 نیز از بقیه‌ی نمونه‌ها در هر دو زیر گروه به صورت مجزا قرار گرفته است. نمونه‌های گروه A1 و A2 گرچه تفاوت‌هایی با هم دارند ولی در عین حال نشان از قرابت آن‌ها با یکدیگر

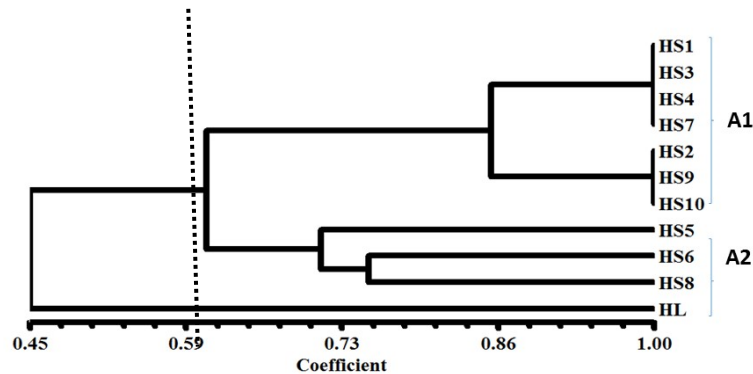


Fig. 5: Dendrogram derived from cluster grouping based on Dice similarity coefficient using the band pattern of *Hottentotta saulcyi* scorpion specimens using UPGMA algorithm and NTSYS software. The coefficient of similarity (0.60) shown by the dotted line.

گرفته‌اند. نمونه‌ی HS5 در این شاخه از بقیه‌ی نمونه‌ها جدا افتاده است، به طوری که می‌توان آن را به عنوان یک نمونه‌ی منحصر به فرد از نظر تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های گروه A2 قلمداد کرد. نمونه HL نیز به عنوان نمونه خارج گروه به خوبی به صورت جدای از بقیه‌ی نمونه‌ها قرار گرفته است.

همان طور که در Fig 5 مشاهده می‌شود، تعداد ۱۰ نمونه عقرب هوتنتوتا سلسئی بر اساس الگوی باند ایجاد شده به کمک تکنیک RAMS به دو دسته‌ی کاملاً مجزای A1 و A2 تقسیم می‌شوند. گروه A1 شامل نمونه‌های HS9, HS10, HS2, HS7, HS4, HS3, HS1 و HS8 در حالی که نمونه‌های HS5, HS6 و HS8 در شاخه‌ی A2 جای

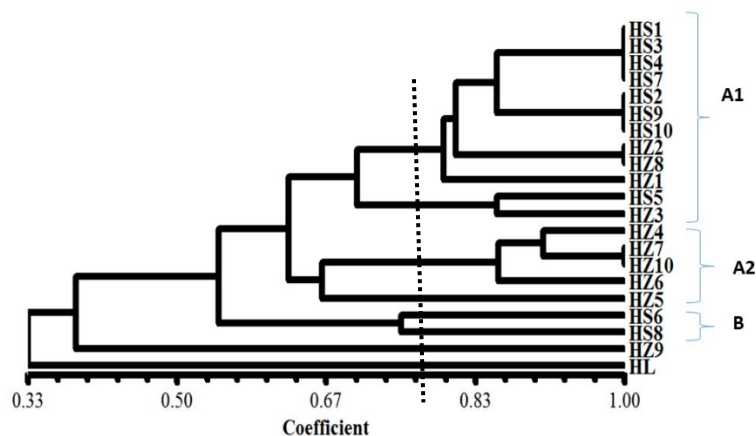


Fig. 6: Dendrogram derived from cluster grouping based on Dice similarity coefficient using the band pattern of *Hottentotta saulcyi* and *H. Zagrosensis* scorpion specimens using UPGMA algorithm and NTSYS software. The coefficient of similarity (0.53) shown by the dotted line.

در کنار هم قرار گرفته‌اند در حالی که نمونه HZ5 از بقیه جدا افتاده است. در گروه B نیز HS6 و HS8 قرار دارند که از بقیه‌ی نمونه‌های HS جدا قرار دارند. نکته جالب این که نمونه متفاوت HZ9 در کنار نمونه‌ی HS5 که هر دو تفاوتی آشکار را با نمونه‌های هم گروه خود نشان می‌دهند، هر دو از منطقه‌ی دزفول گردآوری شده بودند. در کل می‌توان چنین نتیجه گرفت که عمده نمونه‌های HZ و HS با هم گروه‌های خودشان مشابهت دارند، هرچند که ناهمخوانی در بین نمونه‌های هم گروه نیز مشاهده شد. نمونه‌ی HL به عنوان نمونه خارج گروه قرار گرفت.

با توجه به Fig 6 تعداد ۲۰ نمونه عقرب هوتنتوتا سلسی و زاگروسنسسیس بر اساس الگوی باندهای ایجاد شده با استفاده از تکنیک RAMS به سه گروه مجزا قابل تقسیم‌اند. گروه A شامل ۱۷ نمونه می‌باشد، که این گروه به دو زیر گروه A1 (شامل: HZ3, HS5, HZ1, HZ8, HZ2, HS10, HZ5, HS1, HS9, HS2, HS7, HS4, HS3, HS1) و A2 (شامل: HZ6, HZ10, HZ7, HZ4) تقسیم می‌شوند. در این گروه ۸ نمونه HS در کنار هم‌اند، ولی ۴ نمونه HZ نیز علی‌رغم در کنار هم بودن، در این گروه قرار گرفته‌اند. در گروه A2 نیز نمونه‌های HZ6, HZ10, HZ7, HZ4, HZ5

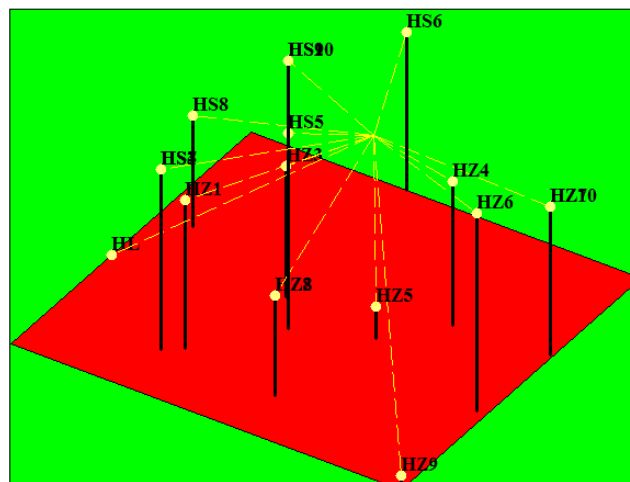


Fig. 7: Three-dimensional graph of PCoA analysis of *Hottentotta saulcyi* and *H. Zagrosensis* scorpion specimens with NTSYS software. This graph shows the genetic differences between the HZ9 and HS5 specimens in Khuzestan province

۱۲srRNA ژن PCR-RFLP

با توجه به این که نمونه‌های HZ9 و SE5 در استفاده از تکنیک RAMS در بین نمونه‌ها متفاوت بودند، به منظور صحت نتایج RAMS و تایید این تفاوت، اقدام به انجام واکنش PCR-RFLP بر روی محصول PCR ژن 12SrRNA شد. طی انجام واکنش PCR که با آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت صورت گرفت، ژن 12SrRNA با اندازه‌ی ۵۰۰ نوکلئوتید تولید گردید (Fig 8). سپس محصول PCR با آنزیم EcoRI هضم گردید.

نتایج نمودار سه بعدی (Fig. 7)، تنوع در مارکرهای افزوده‌سازی شده و همین طور توزیع پراکندگی این تنوع در بین افراد گونه‌های عقرب این جنس را در خوزستان نشان می‌دهد. بدین ترتیب نتایج حاصل از گروه‌بندی نمودار PCoA حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای که با استفاده از ضریب تشابه دایس انجام شد، علی‌رغم وجود دو نمونه متفاوت HZ9 و HS5، تفکیک نمونه‌ها را به صورت دو گونه اصلی مورد تأیید قرار داد.

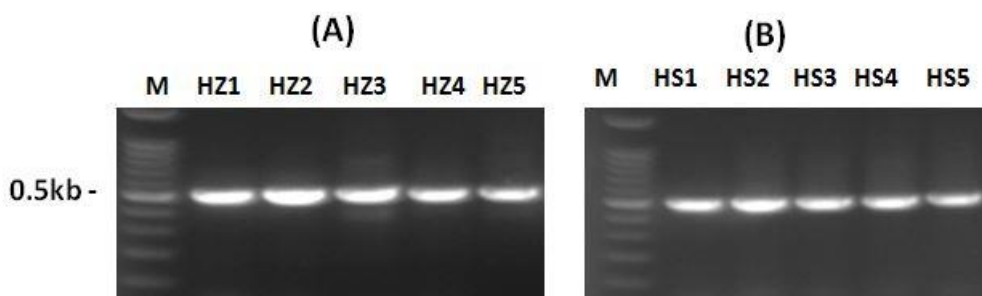


Fig. 8: Agarose gel electrophoresis of the 12SrRNA gene related to some scorpions *Hottentotta* on a 1% gel. The DNA marker is in column M. In the HZ1 to HZ5 columns (*Hottentotta Zagrosensis*) (A), and HS1 to HS5 (*Hottentotta saulcyi*) (B) the PCR-RFLP of 12SrRNA gene related to scorpion specimens were loaded

در ناحیه‌ی ۴۰۰ نوکلئوتیدی، الگوی باندهای متفاوتی نسبت به بقیه‌ی نمونه‌ها ایجاد کرد (Fig. 9). بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این نمونه نسبت به دیگر نمونه‌های هم گروه خود متفاوت است.

مشاهده‌ی الگوی باندهای PCR-RFLP ده نمونه عقرب هوتنتوتا زاگروسنسیس نشان داد که به جز نمونه‌ی HZ9 بقیه نمونه‌ها به وسیله‌ی آنزیم EcoRI در یک مکان مشابه برش خورده‌اند، که در نتیجه، این نمونه با عدم ایجاد باندهای

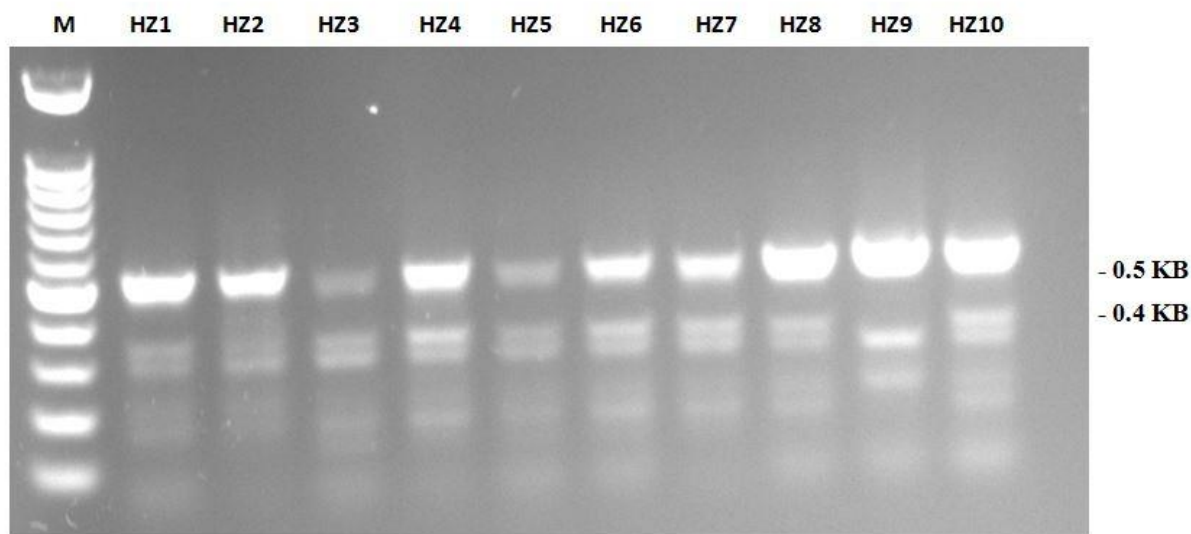


Fig. 9: Agarose gel electrophoresis PCR-RFLP of the 12SrRNA gene related to *Hottentotta Zagrosensis* on a 1% gel. The DNA marker is in column M. In the HZ1 to HZ10 columns, the PCR-RFLP of 12SrRNA related to *Hottentotta Zagrosensis* scorpion specimens were loaded.

است که این نمونه اساساً فاقد جایگاه برش برای این آنزیم است (Fig. 10). این امر نشان از تفاوت بارز این نمونه با دیگر نمونه‌های مورد مطالعه دارد.

مشاهده‌ی تفاوت در الگوی باندهای ۱۰ نمونه از عقرب هوتنتوتا سلسسی پس از انجام واکنش PCR-RFLP نشان داد که به جز نمونه HS5 بقیه نمونه‌ها توسط آنزیم EcoRI در یک مکان مشابه برش خورده‌اند، که این امر بیانگر این

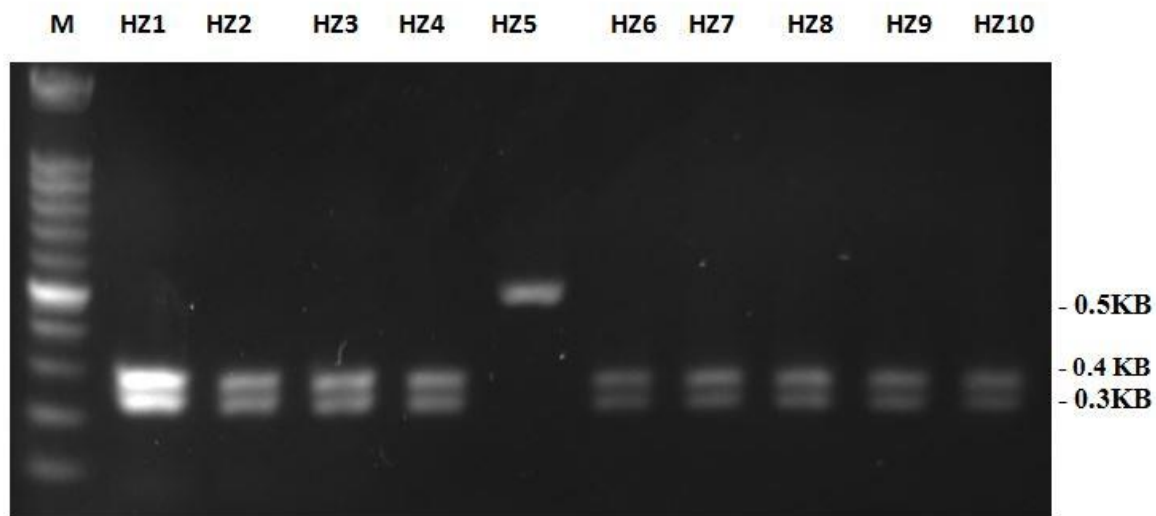


Fig. 10: Agarose gel electrophoresis PCR-RFLP of the 12SrRNA gene related to *Hottentotta saulcyi* on a 1% gel. The DNA marker is in column M. In the HZ1 to HZ10 columns, the PCR-RFLP of 12SrRNA related to *Hottentotta saulcyi* scorpion specimens were loaded.

بحث

مطالعات تاکسونومیک لازم است که با تعداد زیاد نمونه انجام شود، و دسترسی به ژنومیک DNA نیز با محدودیت همراه است، استفاده از ریزماهورها در تکنیک RAMS به دلیل سادگی و ارزانی ارجحیت دارد. استفاده از آغازگرهای حاوی توالی‌های تکرار شونده سه نوکلئوتیدی از دیگر محاسن این تکنیک است که می‌توان از آن‌ها برای تاکسونومی اورگانسیم‌های مختلفی اعم از گیاهان، حشرات، قارچ و حتی باکتری‌ها، بدون داشتن هیچ گونه اطلاعات قبلی از توالی ژنومیک DNA بهره برد. بنابراین، استفاده از این آغازگرها که عموماً در نواحی بین ژنی و اینترون‌ها در بندپایان یافت می‌شود، توصیه شده است (Toth et al, 2000). این گونه آغازگرها نه تنها قادر به تشخیص گونه‌های نزدیک به هم‌اند، بلکه توانایی تشخیص افتراق بین جمعیت‌های مختلف را نیز دارا می‌باشند (De Leon et al. 2010).

این مطالعه اهمیت بالقوه استفاده از این آغازگرها در به کارگیری تکنیک RAMS را به منظور یافتن تنوع ژنتیکی را در سطح گونه‌های عقرب هوتنتوتا در استان خوزستان نشان داد. این تکنیک با تمرکز بر استفاده از ریزماهورهایی

به علت بالا بودن میزان تنوع گونه‌ای در عقرب‌های ایران، این منطقه از جهان به عنوان یکی از غنی‌ترین فون‌ها عقرب برای مطالعه‌ی این بندپا محسوب می‌شود (Dehghani et al, 2016). به خوبی آشکار است که با وجود شباهت‌های نزدیک ریخت‌شناختی، تشخیص عقرب‌ها با استفاده از این ویژگی به تنهایی مشکل است (Polis et al, 1990). بدین خاطر مطالعه‌ی تاکسونومیک در سطح مولکولی می‌تواند راه حل مناسبی برای حل این مشکل باشد. از آن جایی که مطالعه‌ی فیلوژنیک جامعی بر اساس مارکرهای ملکولی برای گونه‌های عقرب به ویژه جنس هوتنتوتا در ایران تا کنون انجام نگرفته است، این باعث نامشخص ماندن وضعیت تاکسونومیک و توزیع جغرافیایی آن شده است. به همین علت در مورد روابط درون گونه‌ای و بین‌گونه‌ای این عقرب به ویژه در استان خوزستان نیاز به بررسی و بازنگری‌های تاکسونومیک دقیق گونه‌های این جنس می‌باشد.

استفاده از توالی ژن‌های هسته‌ای و میتوکوندریایی به دلیل نیاز به فرآیند توالی‌یابی که تکنیکی نسبتاً گران است، با محدودیت‌هایی روبروست. بنابراین، در شرایطی که

تاکسونومی آن‌ها با توجه به داده‌های ریخت‌شناسی کلاسیک مطابقت داشت. این میزان نسبتاً بالای تنوع بین گونه‌ای با توجه به وجود چرخه‌ی جنسی در تولید مثل عقرب، قابل انتظار نبود. بنابراین، احتمال دارد که این حد از تغییرپذیری و تنوع ژنتیکی، همان طور که در مورد جنس حلزون *Biomphalaria* پیشنهاد شده است (Paraense et al. 1957; Jarne et al. 1991) به دلیل عوامل مؤثر دیگری نظیر نوترکیبی، جهش و یا جریان ژنی قابل توجیه باشد. آنالیز تصویر سه بعدی PCoA توزیع جمعیتی نسبتاً یکنواختی را به غیر از دو نمونه‌ی متفاوت (HS5 و HZ9) در پراکنش گونه‌ای هر دو گونه‌ی این عقرب را در مناطق مختلف استان خوزستان نشان داد. این ویژگی عموماً در مناطقی شبیه فلات ایران به دلیل اتصال سرزمینی که تسهیل امر جریان ژنی را از سرزمین‌های مجاور به دنبال دارد، و همین طور به دلیل عدم بروز پدیده‌ی جدا افتادگی ژنی، قابل تصور است. بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که توزیع و پراکنندگی عمدتاً نرمال نمونه‌های هر دو گونه‌ی این جنس عقرب، نشان از سازگاری آن‌ها نسبت به شرایط اقلیمی و اکوسیستم متفاوت استان خوزستان دارد.

که در ژنوم یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند را دارد، در مقایسه با روش‌های مشابهی نظیر *Arbitrary Primer (AP-PCR)* متکی به استفاده از آغازگرهای تصادفی جهت مطالعه‌ی پلی‌مورفیسم است، ارجحیت دارد (Oliveira et al. 1997). به منظور تحلیل داده‌ها در این مطالعه، ابتدا الگوی باندهای ایجاد شده از نمونه‌های دو گونه عقرب هونتوتوتا *Zagrosensis* و *Salsesia* بر روی ژل آگاروز به صورت حضور باند (یک) و عدم حضور (صفر) تقسیم‌بندی شدند. فقط باندهایی که به سادگی قابل تشخیص باشند مورد ارزیابی قرار گرفتند. باندهای مشکوک، ضعیف و غیرقابل تشخیص از مطالعه حذف شدند. از بین الگوریتم‌های متفاوت *NTSYS*، الگوریتم *UPGMA* نتیجه‌ی مناسب‌تری نسبت به سایر الگوریتم‌ها نشان داد. در مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی که بین گونه‌ای عقرب هونتوتوتا *Zagrosensis* و *Salsesia* استان خوزستان که بر اساس الگوی تولید باند با استفاده از تکنیک *RAMS* انجام گرفت، دو نمونه (HS5 و HZ9) گردآوری شده از دزفول کاملاً متفاوت بودند. این دو نمونه بیش‌ترین جدا افتادگی از نمونه‌های هم‌گروه خود را نشان دادند. شایان ذکر است که علی‌رغم تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا در سطح مولکولی در بین عقرب‌های هر دو گونه،

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای حمایت مالی این پژوهش، قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

منابع مالی

این مقاله با استفاده از پژوهانه که از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تامین گردید، انجام شده است.

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.
- Dehghani, R.; Motevali Haghi, F.; Mogaddam, M.; Sedaghat, M.M. and Hajat, H. (2016). Review study of scorpion classification in Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, (4): 440-444.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3): 297-302.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32: 1792-1797.
- Fet, V.; Gantenbein, B.; Gromov, A.V.; Lowe, G. and Lourenco, W.R. (2003). The first molecular phylogeny of Buthidae (Scorpiones). *Euscorpius*, 4: 1-10.
- Gantenbein, B; and Largiader, C.R. (2003). The phylogeographic importance of the Strait of Gibraltar as a gene flow barrier in terrestrial arthropods: a case study with the scorpion *Buthus occitanus* as model organism. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 28: 119-130.
- Hantula, J.; Dusabenyagasaniy, M.; and Hamelin, R.C. (1996). Random amplified microsatellites (RAMS) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Eur. J. For. Path*, 26: 159-166.
- Jafari, H.; Saalabi, F.; Jelodar, A.; Navidpour, S.H.; Jahanifard, E. and Forouzan, A. (2017). Phylogenetic study on *Orthochirus iranus* by using morphological and molecular methods (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3): 304-309.
- Jolodar, A. (2019). Molecular Characterization and Phylogeny Analysis Based on Sequences of Cytochrome Oxidase gene From *Hemiscorpius lepturus* of Iran. *Iran J. Vet. Med*, 13 (1): 59-67.
- Jolodar, A.; Masoudi, A.R.; Mehrzadi, S. and Davoudi, A. (2013). A. Molecular identification of peptide toxin MeBTX from the Iranian scorpion *Mesobuthus eupeus*. *Iranian Journal of Veterinary*, 9 (2): 24-33.
- Kovarik, F. (2007). A revision of the genus *Hottentotta* Birula, 1908, with descriptions of four new species (Scorpiones, Buthidae). *Euscorpius*, 58: 1-107.
- Lamoral, B.H. (1979). The scorpions of Namibia. *Annals of the Natal Museum*, 23: 497-784.
- Mirshamsi, O.; Sari, A.; Elahi, E. and Hosseini, S. (2010). Phylogenetic relationships of *Mesobuthus eupeus* (C.L. (Koch, 1839) inferred from COI sequences (Scorpiones: Buthidae). *The Journal of Natural History*, 44: 2851.
- Mirshamsi, O. (2011). *Mesobuthus eupeus* (Scorpiones: Buthidae) from Iran: A polytypic species complex. *Zootaxa*, 2929: 1-21.
- Nejati, J., Mozafari, E.; Saghafipour, A. and Kiyani, M. (2014). Scorpion fauna and epidemiological aspects of scorpionism in southeastern Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(1): S217-S221.
- Nikkhah, N.; Jolodar, A. and Taghavi Moghadam, A. (2018). Phylogenetic analysis of cytochrome oxidase subunit 1 from the *Mesobuthus eupeus* (Scorpiones: Buthidae) of Khuzestan province. *Iranian Veterinary Journal*, 14: 102-111.
- Oliveira, R.P.; Macedo, A.M.; Chiari, E. and Pena S.D.J. (1997). An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol Today*, 5:196-200.
- Ozkan, O.; Adiguzel, S.; Kar, S.; Kurt, M.; Yakistiran, S.; Cesaretli, Y.; Orman, M. and Karaer, K.Z. (2007). Effects Of *Androctonus crassicauda* (Olivier, 1807) (Scorpiones: Buthidae) venom on rats: correlation among acetyl cholinesterase activities and electrolytes levels. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 13(1): 69-81.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sousa, P.; Froufe, E.; Alves, P.C. and Harris; D.J. (2011). Genetic diversity within scorpions of the genus *Buthus* from the Iberian Peninsula: mitochondrial DNA sequence data indicate additional distinct cryptic lineages. *Journal of Arachnology*, 38 (2): 206-211.
- Sousa, P.; Froufe, E.; Harris, D.J.; Alves, P.C. and Van der Meijden, A. (2011). Genetic diversity of Maghrebian *Hottentotta* (Scorpiones: Buthidae) scorpions based on CO1: new insights on the genus phylogeny and distribution. *African Invertebrates*, 52 (1): 135-143.
- Vachon, M. (1974). Etude des caracteres utilises pour classer les familles et les genres de Scorpions (Arachnides). 1. La trichobothriotaxie en arachnologie. Sigles trichobothriaux et types de trichobothriotaxie chez les scorpions. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle*, 3: 857-958.

Weber, J.L. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530.

Wu, K.S.,; Jones, R.; Danneberger, L. and Scolnik, P.A. (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Res*, 22: 3257-3258.

Zietkiewicz, E.,; Razaeski, A. and Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by simple

sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.

Received:30.07.2019

Accepted: 16.02.2020

Genetic Diversity of *Hottentotta Zagrosensis* and *H. saulcyi* (Scorpions: Buthidae) using RAMS (Random Amplified Microsatellites) in Khuzestan

Saeid Pirmoradi¹, Abbas Jolodar^{2*} and Hediye Jafari³

¹ PhD Graduated of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine at the Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Assistant Professor, Razi Vaccines and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran

Received:30.07.2019

Accepted: 16.02.2020

Abstract

Scorpions belong to the Buthidae family have several genera in the World. One of the genuses is *Hottentotta* which is located in Iran. There is no phylogenetic data regarding to this scorpion, in spite of its medical importance. Ten scorpion samples of *Hottentotta Zagrosensis* and *H. saulcyi* were collected from different regions of Khuzestan province in Iran. The molecular phylogenetic analysis was carried out using RAMS (Random Amplified Microsatellites) and PCR-RFLP. Of the 6 RAMS primers, that were checked, P-CCA generated 78 sufficiently clear and reproducible bands. The band sizes from 20 scorpion samples ranged from 200-1000 bp. The percentages of the polymorphic and monomorphic bands are 94.8 and 5.2%, respectively. After band score calculations, the similarity level was measured using the Dice coefficient, and dendrogram were obtained by the UPGMA algorithms. The results show that the scorpions within the *Hottentotta* genus has been grouped in two species *H. zagrosensis* and *H. saulcyi* with mean percentage of shared bands 65% and 60%, respectively. Two scorpion samples from Dezful (HZ9 and HS5) are significantly dissimilar within their groups. This result was confirmed by PCR-EFLP. Dendrogram results for scorpions in *Hottentotta* genus located in the Khuzestan showed intraspecies genetic diversity. This study shows RAMS primers could be useful tools to assess genetic diversity in *Hottentotta* scorpions in Khuzestan.

Keywords: *Hottentotta Zagrosensis*, *H. saulcyi*, Scorpion, phylogenetic, RAMS

* **Corresponding Author:** Abbas Jolodar, Associate Professor in the Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

E-mail: jolodara@scu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).