

بررسی فیلوژنیک عقرب *Mesobuthus eupeus* (Scorpions: Buthidae) با استفاده از توالی ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ میتوکندریایی در استان خوزستان

نسترن نیکخواه^۱، عباس جلودار^{۲*} و احمد تقوی مقدم^۳

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۷

چکیده

به منظور انجام مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۱۰ عقرب مزوبوتوس/اپئوس از منطقه‌ی باغملک استان خوزستان صید و پس از شناسایی در آزمایشگاه رفرانس عقرب مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز به منظور استخراج DNA به روش دستی فنل/کلروفرم به آزمایشگاه بیولوژی ملکولی دانشکده‌ی دامپزشکی شهید چمران اهواز منتقل گردید. تعداد ده نمونه به کمک PCR ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ (COXI) با اندازه‌ی ۶۲۳ نوکلئوتید با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت تکثیر گردید. پس از خالص‌سازی محصول PCR از ژل آگاروز، توالی‌یابی در دو جهت رفت و برگشت صورت گرفت. به منظور مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن از برنامه‌ی nBLAST موجود در پایگاه اینترنتی NCBI استفاده گردید. هم‌ترازی اسید آمینه‌ای ژن سیتوکروم اکسیداز با توالی‌های مشابه از عقرب‌های دیگر و همچنین بررسی‌های فیلوژنیک نشان داد که این ژن با ژن‌های مشابه جدا شده از عقرب‌های دیگر نظیر عقرب مزوبوتوس مارتنزی و مزوبوتوس گیبوسوس در ۹۹ درصد طول به میزان به ترتیب، ۹۲ و ۹۱ درصد یکسان است. این توالی با ژن مشابه از عقرب مزوبوتوس/اپئوس فیلیپینی در ۹۹ درصد طول به میزان ۹۳ درصد یکسان بود، که این میزان بیش‌ترین میزان یکسانی را با ژن مورد بررسی در این پژوهش نشان داد. با توجه به تفاوت توالی ژن مزوبوتوس/اپئوس استان خوزستان با ژن مشابه از مزوبوتوس/اپئوس فیلیپینی، که در دو سطح نوکلئوتید و اسید آمینه انجام گردید، می‌توان نتیجه گرفت که این دو گونه احتمالاً متعلق به دو زیرگونه‌ی متفاوت هستند.

کلمات کلیدی: مزوبوتوس/اپئوس، عقرب، فیلوژنیک، سیتوکروم اکسیداز، خوزستان

مقدمه

جنس و ۵۲۹ گونه بزرگ‌ترین خانواده‌ی عقرب‌هاست که یکی از جنس‌های آن مزوبوتوس/اپئوس است. تحت گونه‌های زیادی از مزوبوتوس/اپئوس عمدتاً بر اساس رنگ یا آرایش سطحی شناسایی شده‌اند. مزوبوتوس/اپئوس شامل حداقل ۱۴ تحت گونه معتبر از نظر تاکسونومی است که از ترکیه تا چین توزیع شده است (Fet 1994). از آنجایی که صفات مورفولوژیکی مربوط به وضعیت خویشاوندی و تاکسونومیک جامع و دقیق

عقرب‌ها می‌توانند به عنوان فسیل زنده در نظر گرفته شوند، چرا که در طول ۴۰۰ میلیون سال اخیر تغییرات ناچیزی کرده‌اند (Largiadier and Gantenbein 2002). به طور کلی راسته‌ی عقرب‌ها شامل ۲۸ خانواده است که حدود نصف این خانواده‌ها منقرض شده‌اند. گونه‌های زنده‌ی فعلی شامل ۱۴ خانواده هستند که بیش از ۱۶۰۰ گونه را شامل می‌شوند و در بیش از ۲۰۰ جنس گروه-بندی شده‌اند (Farzanpay 1987). خانواده‌ی بوتیده با ۷۳

^۱ دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

^{۲*} دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

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

(نویسنده‌ی مسئول)

E-mail: jolodara@scu.ac.ir

منظور مطالعات فیلوژنی در سطح گونه‌ای گروه‌های مختلف از پستانداران سم‌دار، مگس سرکه و خرچنگ‌های نعل اسبی استفاده شده است (Gantenbein et al. 2003). از میان ژن‌های کد کننده پروتئین در ژنوم میتوکندریایی حیوانات که به منظور مطالعات فیلوژنیک در فرآیند تکامل از آن‌ها استفاده می‌شود، ژن کد کننده سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ حفاظت شده‌ترین است (Brown 1985). نتایج مطالعات اخیر که بر اساس توالی این ژن صورت گرفته است، به طور واضح عقرب مزوبوتوس /پتوس را در دو سویه‌ی منشعب نشان داده است (Mirshamsi et al. 2010). هر چند جمعیت مزوبوتوس /پتوس ایران از نظر مورفولوژیکی مشابه می‌باشند، اما وجود آن‌ها حاکی از تفاوت تکاملی سویه‌ها است. نتیجه‌ی این مطالعات به طور واضح نشان داد که این فرضیه که مزوبوتوس /پتوس یک گونه چند نوعی پیچیده و احتمالاً شامل بیش از یک گونه است، معتبر است (Mirshamsi 2011).

مواد و روش کار

ده نمونه عقرب مزوبوتوس /پتوس پس از صید در منطقه‌ی باغملک از استان خوزستان در آزمایشگاه فرانس عقرب مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز مورد شناسایی قرار گرفتند. در ادامه، استخراج DNA به روش دستی فنل / کلروفرم صورت گرفت. در روش فنل / کلروفرم پس از تکه تکه کردن بافت عقرب، ۶۰۰ میکرولیتر بافر RSB (حاوی 25 mM EDTA، Tris- 10 mM NaCl و 10 mM HCl) و ۶۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ درصد SDS به آن اضافه گردید. پس از کشیدن مایع در میکروتیوپ، هم‌حجم آن فنل / کلروفرم با نسبت ۲۴/۲۵ اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در سانتریفیوژ قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی را به میکروتیوپ جدید منتقل کرده و ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن افزوده و با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی را در

نیستند، بنابراین بعضی از آن‌ها از نظر اعتبار مشکوک‌اند و بازبینی کامل این گونه‌ها به وسیله‌ی نویسندگان مختلف پیشنهاد شده است (Gantenbein et al. 2003, Kovarik 1997).

عقرب‌های ایران متعلق به سه خانواده‌ی بوتیده، اسکوریپونیده و همی‌اسکوریپونیده می‌باشند. پنج گونه از جنس مزوبوتوس به نام‌های مزوبوتوس /پتوس، مزوبوتوس گیبوسوس، مزوبوتوس مارتنزی، مزوبوتوس تامولوس و مزوبوتوس واچون موجود است (Gantenbein et al. 2003, Kovarik 1997, Vignoli et al. 2003). مزوبوتوس /پتوس یکی از فراوان‌ترین گونه‌های جنس مزوبوتوس می‌باشد که بین ۵ تا ۹ تحت گونه از آن در ایران ثبت شده است. این عقرب از بیش‌تر نقاط ایران گزارش شده است و یکی از عوامل اصلی عقرب-زدگی در کشور محسوب می‌شود (Dehghani et al. 2002, Kadkhodaie et al. 2006).

عقرب مزوبوتوس /پتوس که در مناطق کویری و گرمسیری ایران از جمله استان خوزستان به فراوانی یافت می‌شود، در هر نقطه از این استان به جز بیابان‌های ماسه‌ای وجود دارد (Navidpour et al. 2008). اندازه، رنگ و تزیینات این عقرب بر حسب فرم محلی متفاوت است، ولی اندازه‌ی آن حداکثر حدود ۶ سانتی‌متر است. رنگ بدن از زرد شفاف تا زرد کدر دیده می‌شود. رنگ یک-دست با لکه‌های تیره روی مزوزوما همراه است، که در صورت اخیر ممکن است گسترش یافته و انعکاسی سیاه رنگ در سطح پشتی به جانور بدهد و یا به صورت مخطط دیده شود (Farzanpay 1987).

توالی DNA میتوکندریایی در تعیین روابط فیلوژنیک داده‌ی ارزشمندی به حساب می‌آید (Sanjayan and Habeeb 2011). اخیراً آنالیز مقایسه‌ای ژن ۱۶S ریپوزومال RNA میتوکندریایی برای انجام فیلوژنی در سطح گونه‌ای عقرب‌ها استفاده شده است. آنالیزهای مقایسه‌ای از توالی‌های RNA ریپوزومال میتوکندریایی (12S و 16S) اکنون به طور روزمره در سیستم مولکولی به

تخلیص محصول PCR از روی ژل آگارز، از کیت استخراج GF-GP-050 شرکت ویوانتیس (مالزی) استفاده شد. مراحل تخلیص مطابق بروشور شرکت سازنده انجام گرفت.

قطعات DNA خالص شده به کمک آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت به صورت جداگانه توسط شرکت ژن فناوران در تهران توالی‌یابی گردیدند. با انجام عمل هم‌ترازی رشته‌ی رفت با مکمل توالی برگشت به کمک نرم‌افزار BioEdit، توالی کامل ژن تکثیر شده به دست آمد. به منظور مقایسه‌ی توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن، از برنامه‌ی nBLAST موجود در پایگاه اینترنتی NCBI (ncbi.nlm.nih.gov) استفاده گردید. جهت ترجمه‌ی توالی نوکلئوتیدی به اسیدآمینه‌های مربوطه، از نرم‌افزار Expasy (expasy.org/tools) استفاده شد. با استفاده از برنامه‌ی CLUSTAL_W عمل هم‌ترازی چند توالی انجام و با کمک برنامه‌ی BOXSHADE (ch.embnet.org/software/BOX_form.html) ویرایش گردید. جهت جستجوی موتیف از نرم‌افزار آنلاین موجود (pfam.sanger.ac.uk/search/sequence) استفاده شد. ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 انجام شد.

نتایج

تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز (COXI)

طی انجام PCR که با آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت صورت گرفت، ژن‌های سیتوکروم اکسیداز زیر - واحد ۱ با اندازه‌ی تقریبی ۷۰۰ نوکلئوتید تولید گردید (تصویر ۱).

میکروتیوپ جدید کشیده، ۱۰ میکرولیتر 5 M NaCl و ۱۲۰۰ میکرولیتر اتانول خالص سرد به آن افزوده و در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. این بار پس از دور ریختن مایع رویی ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید و در همان دور و مدت مذکور سانتریفوژ شد. در نهایت پس از دور ریختن مایع رویی و خشک شدن رسوب ته میکروتیوپ ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه شد.

به منظور تکثیر قطعات ژنی سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت PCR انجام شد. در این آزمایش از آغازگرهای - F) 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG (COI-5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA Folmer 1994, Gantenbein et al. 1999). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی بافر 1x PCR، dNTP (۰/۲۵ mM)، کلرید منیزیم (۱/۵ mM)، آغازگر رفت و برگشت (هر کدام 0.4 μM)، DNA پلی‌مراز Taq (۰/۵ U) و ۱۰۰ نانوگرم الگو DNA انجام گرفت. برنامه‌ی حرارتی به صورت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه (۳۲ سیکل) و نهایتاً ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

به منظور بررسی محصول واکنش PCR و اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری X6 مخلوط گردید و به چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد ساخته شده از بافر TAE و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر DNA safe stain بارگذاری گردید. پس از قرار دادن ژل در تانک الکتروفورز با شدت ۵ ولت به ازای هر سانتی‌متر فاصله‌ی بین دو الکتروود به مدت ۵۰ دقیقه الکتروفورز شد و سپس با استفاده از دستگاه ژل داک از آن عکس‌برداری صورت گرفت. به منظور

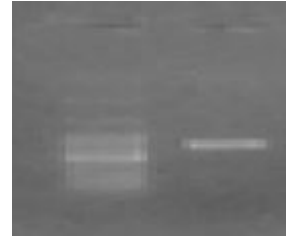
کنار هم قرار دادن توالی‌های مربوطه و بررسی نواحی همپوشان، طول کامل قطعه به دست آمد. طول توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده پس از حذف آغازگرهای رفت و برگشت برای هر نمونه ۶۲۳ نوکلئوتید بود که تشابه صد در صدی با هم نشان می‌دادند.

همترازی و بررسی فیلوژنیک

با مقایسه‌ی توالی اسیدآمینه‌ای قطعه‌ی ژن COXI جدا شده از عقرب مزوبوتوس/پئوس خوزستان با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI، مشاهده شد که ژن مربوطه با ۱۳۸ مورد از توالی‌های مشابه که در قالب ۷۵ اورگانسیم یافت گردید، مشابهت نشان می‌دهد. در میان این تعداد سهم مزوبوتوس ۴۰ توالی بود که از این تعداد، ۱۶ توالی مربوط به مزوبوتوس/پئوس است. نتایج نشان داد که ژن مربوطه با پروتئین سیتوکروم اکسیداز جدا شده از مزوبوتوس/پئوس فیلیپینی در ۹۹ درصد طول به میزان ۹۳ درصد یکسانی نشان می‌داد که این میزان بیش‌ترین میزان یکسانی با ژن مورد بررسی در این پژوهش است. این ژن با ژن‌های مشابه جدا شده از عقرب‌های دیگر نظیر عقرب مزوبوتوس مارتنزی و مزوبوتوس گیوسوس در ۹۹ درصد طول به میزان به ترتیب، ۹۲ و ۹۱ درصد یکسان است (تصویر ۲).

1 2

0.5 kb-



تصویر ۱: الکتروفورز محصول واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های سیتوکروم اکسیداز زیرواحد ۱ (COI) از عقرب مزوبوتوس/پئوس بر روی ژل آگارز یک درصد. مارکر در ستون اول و در ستون دوم محصول واکنش PCR عقرب مزوبوتوس/پئوس برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک قرار دارند.

تعداد سه نمونه از محصول خالص شده PCR ژن (COXI)، به منظور تعیین توالی انتخاب و توالی‌یابی گردیدند. پس از توالی‌یابی، با هم‌ترازی توالی رشته‌های رفت و مکمل توالی برگشت که با استفاده از نرم‌افزار BioEdit صورت گرفت، توالی کامل قطعه‌ی ژن تکثیر شده هر نمونه به دست آمد. لازم به ذکر است که در تعیین توالی نوکلئوتیدی اغلب حدود ۳۰-۲۰ نوکلئوتید ابتدای رشته قابل خوانش نیست، ولی با توجه به هم-پوشانی حدوداً صد نوکلئوتیدی بین دو قطعه‌ی ۷۶۰ و ۸۳۰ نوکلئوتیدی رفت و برگشت مربوطه، توالی کامل با

Me (Kh)	1	-----SMVGTALSLLIRGEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIFFMVPIIGGFGNLIG
Mep	1	-----ASMVGTALSLLIRGEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Me	1	-----ASMVGTALSLLIRGEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Mepv	1	-----GWSMVGTALSLLIRGEIGMPGSLIGDDQYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Bsp	1	-----VGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Aa	1	-----TMYLVLGWASMVGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Ob	1	-----SMVGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Ot	1	-----SMVGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Bd	1	-----VGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Ah	1	-----MYLVLGWASMVGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Ab	1	-----VGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Bo	1	MRWLYSTNHKDIGTMYLVLGWASMVGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Am	1	-----GWSMVGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Mm	1	-----TMYLVFGWASMVGTALSLLIRGEIGMPGSLIGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Hg	1	-----VXASMVGTALSLLIRGEIGMPGSLVGGDDQYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Lq	1	-----SMVGTALSLLIRGEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
B1	1	-----VGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Oi	1	-----WASMVGTALSLLIRGEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Mg	1	MRWLYSTNHKDIGTMYLVFGWASMVGTALSLLIRGEIGMPGSLIGDDQYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Bp	1	-----VGTALSLLIRSEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Met	1	-----SMVGTALSLLIRGEIGMPGSLVGGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Gf	1	-----MYLVLGWASMVGTALSLLIRSEIGMPGSLIGDDQYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Lm	1	-----MYLVLGWASMVGTALSLLIRSEIGMPGSLIGDDQYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Cv	1	-----WASMVGTALSLLIRGEIGMPGSLIGDDQVYNNVVVTAHAFVIMFFMVPIIMIGGFGNWLV
Me (Kh)	57	FLMVGAPDMAFPRINNMSFWLLPPAFFLLSSAMLKRGAGTC.TVYPPPLSSNAHMGGSCDLTIFSLHLGAVSSILGAIN

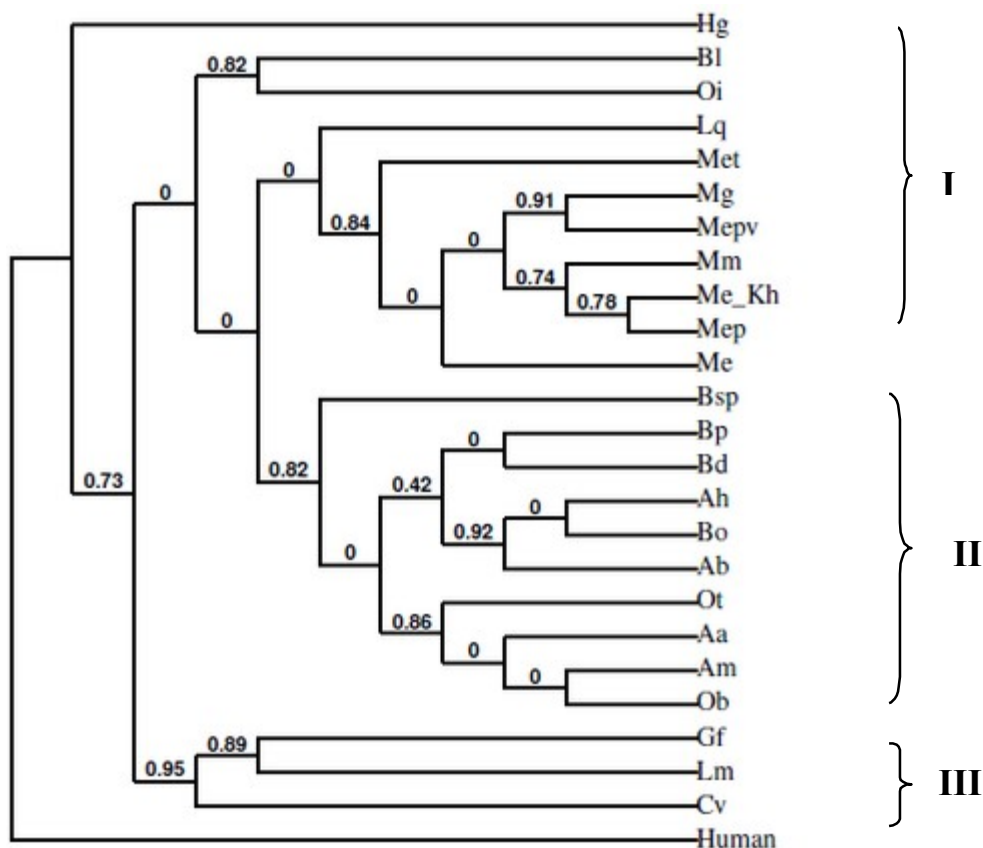
Mep	59	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Me	59	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Mepv	62	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Bsp	56	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Aa	68	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Ob	58	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Ot	58	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Bd	56	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Ah	67	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Ab	56	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Bo	81	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Am	62	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Mm	68	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Hg	61	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Lq	58	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Bl	56	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Oi	61	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Mg	81	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Bp	56	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Met	58	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Gf	67	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Lm	67	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Cv	61	PLMVGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPAFFLLLSAMLESGAGTGWTVPPLSSSLAHMGGSDVLTIFSLHLGAVSSILGAIN
Me (Kh)	136	FMTTINMRRIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Mep	139	FMTTINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFF-----
Me	139	FMTTINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFF-----
Mepv	142	FMTTINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFF-----
Bsp	136	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Aa	148	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Ob	138	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEV
Ot	138	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEV
Bd	136	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Ah	147	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEV
Ab	136	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGH---
Bo	161	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEV
Am	142	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Mm	148	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Hg	141	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Lq	138	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEV
Bl	136	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFF-----
Oi	141	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGH---
Mg	161	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFLAHPEV
Bp	136	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFF-----
Met	138	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFF-----
Gf	147	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLF-----
Lm	147	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEV
Cv	141	FITTIINMRSIGMTLDKVPFLVWSVFVAVLLLSLPLVLAGAITMLLTDNRNNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEV

تصویر ۲: مقایسه‌ی توالی اسیدآمینهای ژن COXI عقرب مزوبوتوس اپئوس خوزستان با ژن‌های مشابه از عقرب‌های دیگر. اسیدآمین‌های کاملاً یکسان با رنگ تیره نشان داده شده‌اند. اسیدآمین‌هایی که مشابه و محافظت شده‌اند با رنگ خاکستری مشخص گردیده‌اند. مشخصات توالی پروتئین‌های استفاده شده در این هم‌ترازی به شرح زیر می‌باشند:

Mep: cytochrome c oxidase subunit I *Mesobuthus eupeus phillipsi* (ADL16717), Mg: cytochrome c oxidase subunit I *Mesobuthus gibbosus* (YP_161157), Me: cytochrome c oxidase subunit I *Mesobuthus eupeus* (ADL16754), Mesobuthus eupeus cytochrome c oxidase subunit I (ADL16744), Mm: cytochrome oxidase subunit I *Mesobuthus martens* (AEH94102), Mesobuthus gibbosus cytochrome oxidase subunit I (AIY72709), Mep: cytochrome oxidase subunit I *Mesobuthus eupeus philippovitschi* (ADL16720.1), Hg: cytochrome oxidase subunit I *Hottentotta gentili* (AEG90960), Lq: cytochrome oxidase subunit I *Leiurus quinquestriatus* (AFD04756), Bsp: cytochrome oxidase subunit I *Buthus* sp. Sc376 (AFF57371), Ob: cytochrome oxidase subunit I *Odontobuthus bidentatus* (AHC02717), Odontobuthus bidentatus cytochrome oxidase subunit I (AHC02720), Aa: cytochrome oxidase subunit I *Androctonus australis* (AAL11674), Am: cytochrome oxidase subunit I *Androctonus mauritanicus* (AEG90964), Bd: cytochrome oxidase subunit I *Buthus draa* (AFF57355), Ot: cytochrome oxidase subunit I *Odontobuthus tigrari* (AHC02722), cytochrome oxidase subunit I *Buthacus* sp. PLC-2013 (AGZ13732.1), Odontobuthus bidentatus cytochrome oxidase subunit I (AHC02718), Met: cytochrome oxidase subunit I Mesobuthus eupeus thersites (ADL16747), Bl: cytochrome oxidase subunit I *Buthus lienhardi* (AGZ13726), Bp: cytochrome oxidase subunit I *Buthus paris* (AGZ13727), Oi: cytochrome oxidase subunit I *Orthochirus innesi* (AFD04742), Ah: cytochrome oxidase subunit I *Androctonus hoggarensis* (AEL96857), Ab: cytochrome oxidase subunit I *Androctonus bicolor* (AGZ13736), Gf: cytochrome oxidase subunit I *Grosphus flavopiceus* (AEL96859), Lm: cytochrome oxidase subunit I *Lychas mucronatus* (AEL96860), Bd: cytochrome oxidase subunit I *Buthus draa* (AFF57345), Bo: cytochrome oxidase subunit I *Buthus occitanus* (YP_001936212), Bd: cytochrome oxidase subunit I *Buthus draa* (AFF57354), Lm: cytochrome oxidase subunit I *Lychas mucronatus* (AEL96918) Cv: cytochrome oxidase subunit I *Centruroides vittatus* (ABL75160)

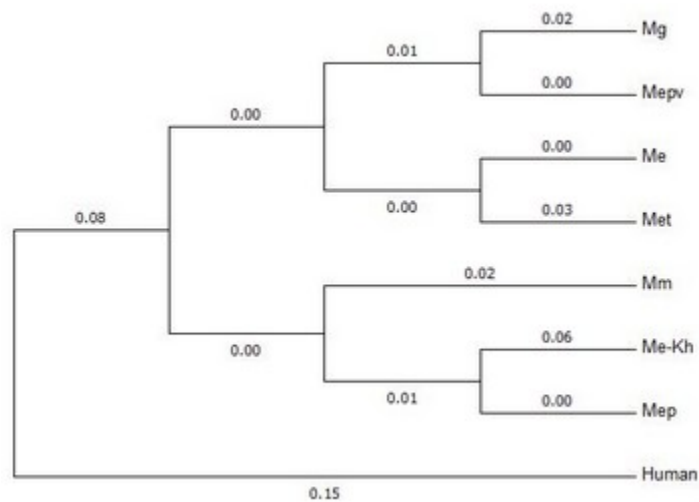
Mesobuthus *Mesobuthus martensii philippovitschi*
 I *Mesobuthus eupeus eupeus phillipsi*
 در دسته‌ی I قرار می‌گیرند. در حالی که ژن‌های مشابه از عقرب‌های
Buthus draa *Buthus paris* *Buthacus sp*
Buthus occitanus *Androctonus hoggarensis*
Odontobuthus turgari *Androctonus bicolor*
Androctonus mauritanicus و *Androctonus australis*
 باهم قرابت دارند و دسته‌ی دوم را تشکیل می‌دهند. در
 این پژوهش از ژن مشابه در انسان به عنوان out group
 استفاده گردید.

برای رسم درخت فیلوژنیک بر اساس ژن COXI از
 هم‌ترازی توالی‌هایی که در تصویر ۲ نشان داده شده است،
 استفاده گردید. همان‌طور که در تصویر ۳ مشاهده می-
 شود، توالی‌های موجود علی‌رغم تشابه اولیه‌ی آن‌ها در
 سطح اسید آمینه، به سه دسته مجزا قابل تقسیم هستند.
 در این تصویر دیده می‌شود که ژن مربوط به عقرب
 مزوبوتوس اپئوس استان خوزستان (Me-Kh) به همراه
 سایر عقرب‌های مزوبوتوس نظیر *Hottentotta gentili*
Leiurus *Orthochirus innesi* *Buthus lienhardi*
Mesobuthus eupeus thersites *quinquestriatus*
Mesobuthus eupeus *Mesobuthus gibbosus*



تصویر ۳: درخت فیلوژنیک عقرب مزوبوتوس اپئوس خوزستان بر اساس توالی ژن COXI و توالی‌های مشابه از دیگر ارگانسیم‌ها.
 فیلوژنی بر اساس هم‌ترازی توالی‌هایی که قبلاً در تصویر ۲ آورده شده است رسم گردید. اعداد در بالای خط‌ها نشان دهنده‌ی
 ارتباط بین گروه‌ها است.

در ادامه، رسم درخت فیلوژنی که منحصراً با مقایسه‌ی توالی‌های مربوط به جنس مزوبوتوس انجام شده است، در تصویر ۴
 مشاهده می‌گردد.



تصویر ۴: درخت فیلوژنیک عقرب مزوبوتوس اپئوس خوزستان بر اساس توالی قطعه ژن COXI و توالی‌های مشابه از دیگر عقرب‌های جنس مزوبوتوس. فیلوژنی بر اساس هم‌ترازی توالی‌هایی که قبلاً در تصویر ۲ آورده شده است، رسم گردید.

خوزستان بیش‌ترین یکسانی را با توالی مزوبوتوس اپئوس فلیپسی نشان داد.

در جدول ۱ اطلاعات مربوط به مقایسه‌ی توالی ژن COXI مربوط به دو عقرب مزوبوتوس اپئوس خوزستان با عقرب مزوبوتوس اپئوس فلیپسی در دو سطح پروتئین و نوکلئوتید آورده شده است.

همان‌طور که در تصویر ۴ مشاهده می‌شود، توالی‌های موجود علی‌رغم تشابه اولیه‌ی آن‌ها در سطح اسید آمینه، به دو دسته‌ی مجزا قابل تقسیم هستند. همان‌طور که انتظار می‌رفت ژن مزوبوتوس اپئوس استان خوزستان Me-Kh به همراه توالی‌های جدا شده از مزوبوتوس مارتنزی و مزوبوتوس اپئوس فلیپسی در یک دسته قرار می‌گیرند که در این دسته توالی مزوبوتوس اپئوس

جدول ۱: تفاوت توالی ژن COXI عقرب مزوبوتوس اپئوس خوزستان با توالی همین ژن از مزوبوتوس اپئوس فلیپسی

در دو سطح نوکلئوتید و پروتئین

Name	Identities	Positives	Gaps
Me-Kh (DNA)	584/630(93%)	-	0/630(0%)
Me-Kh (Protein)	197/210(94%)	206/210(98%)	0/210(0%)

فلیپسی، هم‌ترازی اسید آمینه‌ای توالی ژن COXI منحصراً در این دو عقرب انجام گردید (تصویر ۵).

به منظور تخمین میزان قرابت ژنتیکی عقرب مزوبوتوس اپئوس خوزستان با عقرب مزوبوتوس اپئوس

Me-Kh	1	AS	MV	GT	AL	SL	LR	GE	IG	PG	SL	VG	DD	QV	YN	VV	VT	AH	AF	VI	IF	FM	VI	PI	IG	GF	GN	WL	GL	PM	VG	AP	DM	AF	PR	LN	NM	SF	WL					
Mep	1	AS	MV	GT	AL	SL	LR	GE	IG	PG	SL	VG	DD	QV	YN	VV	VT	AH	AF	VM	IF	FM	VI	PI	IG	GF	GN	WL	GL	PM	VG	AP	DM	AF	PR	LN	NM	SF	WL					
consensus	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*					
Me-Kh	81	PP	AF	FL	LL	SS	AM	LR	KG	AG	TG	WT	VY	P	PL	SS	MA	H	MG	GS	DL	TI	FS	LL	LA	GV	SS	IL	GA	IN	FM	TT	I	N	MR	RI	GM	TL	N	K	V	PL	FL	
Mep	81	PP	AF	FL	LL	SS	AM	LR	ES	AG	TG	WT	VY	P	PL	SS	MA	H	MG	GS	VD	LI	FS	LL	LA	GV	SS	IL	GA	IN	FM	TT	I	N	MR	RS	GM	TL	N	K	V	PL	FL	
consensus	81	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Me-Kh	161	WS	VF	VT	AV	LL	LS	LP	VL	AG	AI	T	M	L	L	T	D	R	N	F	N	T	S	F	F	D	P	A	G	G	D	P	I	L	Y	Q	H	L	F					
Mep	161	WS	VF	VT	AV	LL	LS	LP	VL	AG	AI	T	M	L	L	T	D	R	N	F	N	T	S	F	F	D	P	A	G	G	D	P	I	L	Y	Q	H	L	F					
consensus	161	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

تصویر ۵: هم‌ترازی توالی ژن COXI عقرب مزوبوتوس اپئوس خوزستان و مزوبوتوس اپئوس فلیپسی در سطح اسید آمینه. اسید آمینه‌های کاملاً یکسان و محافظت شده به ترتیب با رنگ‌های تیره و خاکستری مشخص گردیده‌اند.

اپتوس، مزوبوتوس مارتنزی، مزوبوتوس فیلیپوویچی، مزوبوتوس اپتوس ترسریس با استفاده از نرم افزار MEGA7 در جدول ۲ آورد داده شده است.

تفاوت ژنتیکی در خصوص توالی ژن COXI در عقرب‌های مزوبوتوس اپتوس خوزستان با مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی، مزوبوتوس گیوسوس، مزوبوتوس

جدول ۲: فاصله‌ی ژنتیکی بین مزوبوتوس اپتوس خوزستان، مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی، مزوبوتوس گیوسوس، مزوبوتوس اپتوس،

مزوبوتوس مارتنزی، مزوبوتوس فیلیپوویچی، مزوبوتوس اپتوس ترسریس و انسان

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Me-Kh								
2. Mep	0.065							
3. Mg	0.097	0.040						
4. Me	0.070	0.010	0.030					
5. Mm	0.076	0.025	0.045	0.020				
6. Mepv	0.081	0.020	0.020	0.010	0.025			
7. Met	0.108	0.045	0.065	0.035	0.055	0.045		
8. Human	0.272	0.222	0.228	0.222	0.228	0.216	0.259	

بحث

گزارش شده است، به نظر می‌رسد که عدد ۴/۶۱ میلیون سال برای زمان انشقاق گونه‌ای مناسب‌تر باشد (Martin and Palumbi 1993). این دوره که مقارن با پیدایش فلات ایران و سلسله جبال زاگرس در جنوب و سر برآوردن کوه‌های البرز در شمال است، می‌تواند تکامل این عقرب در این منطقه را تحت تأثیر قرار داده باشد.

از آنجایی که ژن سیتوکروم اکسیداز در بیش‌تر جانداران و به ویژه در همه‌ی موجودات هوازی وجود دارد، استفاده از آن در ترسیم درخت فیلوژنیک بسیار مرسوم است. به منظور تأیید داده‌های فیلوژنیک مبنی بر قرابت ژنتیکی عقرب مزوبوتوس اپتوس خوزستان با عقرب مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی، هم‌ترازی توالی ژن COXI منحصرأ در این دو عقرب در سطح اسیدآمینه هم-ترازی صورت گرفت، که تفاوت‌هایی مشاهده گردید (تصویر ۵). این تفاوت‌ها به صورت جابجایی در جایگاه ۱۳ اسیدآمینه (۶ اسیدآمینه‌ی کاملاً متفاوت و ۷ اسیدآمینه-های محافظت شده) دیده می‌شوند. در ژن جدا شده از عقرب مزوبوتوس اپتوس خوزستان اسیدآمینه‌های

قبل از استفاده از خصوصیات ژنومی به منظور تبارشناسی، عمدتاً مرسوم بود که از داده‌های مورفولوژیکی به منظور تعیین قرابت بین گونه‌ها استفاده شود. استفاده از روش‌های ملکولی در تشخیص و شناسایی میکروارگانیسم‌ها این امکان را فراهم می‌کند که تشخیص و شناسایی گونه‌های نزدیک به هم که دارای شباهت بالای مورفولوژیکی می‌باشند، میسر گردد.

گر چه شواهد فسیلی در خصوص تکامل جنس مزوبوتوس ناچیز است، ولی بر اساس بررسی‌های ملکولی که بر روی ژن سیتوکروم اکسیداز صورت گرفته است، زمان انشقاق گونه‌ای در این جنس به ۴/۶۱-۳/۱۵ میلیون سال پیش برمی‌گردد (Quek et al. 2004). گفته شده است که تفاوت در نرخ تغییر ژنتیکی عمدتاً وابسته به سرعت تولید نسل و نرخ متابولیسمی در ارگانیسم می‌باشد (Towler et al. 2001). در بین بندپایان، عقرب دارای طولانی‌ترین دوره‌ی زندگی و پایین‌ترین نرخ متابولیسم است. لذا، با توجه به نرخ نسبتاً پائین ۱/۳ درصدی تغییر ژنتیکی به ازای هر یک میلیون سال که در این موجود

اپتوس خوزستان با مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی، مزوبوتوس گیوسوس، مزوبوتوس اپتوس، مزوبوتوس مارتنزی، مزوبوتوس فیلیپویچی، مزوبوتوس اپتوس ترسریس که در ستون ۱ جدول ۲ داده شده است، تفاوت ژنتیکی در این جنس را بین ۱۰/۸ - ۶/۵ درصد نشان می‌دهد. بنابراین، نزدیک‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی مزوبوتوس اپتوس خوزستان با ۶/۵ درصد تفاوت ژنتیکی به مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی می‌باشد. این در حالی است که تفاوت توالی ژن COXI در گونه‌ی خوزستان با مابقی مزوبوتوس‌های آورده شده در جدول ۲ بیش‌تر است. این بدین معنی است که تفاوت‌های مشاهده شده در سطح DNA (جدول ۱) و همین‌طور در ۱۳ جایگاه اسیدآمینه‌ای (۶ اسیدآمینه‌ی کاملاً متفاوت و ۷ اسیدآمینه‌ی محافظت شده) معنی‌دار است که ناشی از عملکرد اشتباه آنزیم پلی‌مراز *Taq* نمی‌باشد. بنابراین، با توجه به تفاوت توالی ژن COXI در دو سطح نوکلئوتید و اسیدآمینه‌ای در عقرب مزوبوتوس اپتوس مورد بررسی در این تحقیق و ژن مشابه از مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی، می‌توان نتیجه گرفت که این دو گونه گرچه نزدیک‌ترین فاصله‌ی ژنتیکی را از یکدیگر دارا می‌باشند، ولی احتمالاً متعلق به دو زیرگونه‌ی جداگانه هستند.

گلایسین (G₅₈)، لیزین (K₉₄)، آرژنین (R₉₅)، گلایسین (G₁₁₈)، آرژنین (R₁₄₈)، آسپارژین (N₁₅₄) به ترتیب جایگزین اسیدآمینه‌های کاملاً متفاوتی به نام‌های والین (V₅₈)، اسیدگلوتامیک (E₉₄)، سرین (S₉₅)، والین (V₁₁₈)، سرین (S₁₄₈)، اسید آسپارتیک (D₁₅₄) در عقرب مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی شده است. تغییرات در سطح اسیدآمینه‌های محافظت شده همین ژن در عقرب مزوبوتوس اپتوس خوزستان به این صورت است که اسیدآمینه‌های ایزولوسین (I₁₈)، ایزولوسین (I₄₀)، ایزولوسین (I₄₆)، ایزولوسین (I₄₉)، ایزولوسین (I₇₂)، ایزولوسین (I₁₄₉)، ایزولوسین (I₁₇₁) به ترتیب جایگزین متیونین (M₁₈)، متیونین (M₄₀)، متیونین (M₄₆)، متیونین (M₄₉)، متیونین (M₇₂)، والین (V₁₄₉)، لوسین (L₁₇₁) در عقرب مزوبوتوس اپتوس فیلیپسی گردیده است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که توالی آمینواسیدی این ژن در این دو گونه عقرب طی تکامل گرچه محافظت شده بوده است، ولی تفاوت‌های آشکاری را نشان می‌دهد.

نشان داده شده است که وقتی فرآیند PCR در ۳۰ سیکل انجام می‌شود، نرخ اشتباه قطعی آنزیم پلی‌مراز *Taq* به ازای هر نوکلئوتید 2.5×10^{-5} است که این میزان برابر با ۰/۷۶٪ اشتباه به ازای هر کیلوباز است (Xavier 2011). مقایسه‌ی توالی ژن COXI در عقرب‌های مزوبوتوس

منابع

- Brown, W.M. (1985). The mitochondrial genome of animals. In: Molecular Evolutionary Genetics, R.J. MacIntyre (ed.). In press, New York, pp: 95-130.
- Dehghani, R.A.; Tirgari, S.; Vatandoust, H. and Zargan J. (2002) Evaluation of distribution of the scorpion *Mesobuthus eupeus* in Kashan. *Feyz*, 5 (4): 61-67.
- Farzanpay, R. (1987). Scorpion recognition. Publication Center for Academic Publishing, 231. (In Persian)
- Fet, V. (1994). Fauna and zoogeography of scorpions (*Arachnidae*: Scorpions) in Turkmenistan. In: Biogeography and Ecology of Turkmenistan, 525-534.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.L. and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3 (5): 294-299.
- Gantenbein, B.; Largiader, C.R. and Scholl, A. (1999). Nuclear and mitochondrial gene variation of *Buthus occitanus* (Amoreux, 1789) across the Strait of Gibraltar. *Revue Suisse de Zoologie* 106: 760.
- Gantenbein, B. and Largiader, C.R. (2002). *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae) on the island of Rhodes: hybridization between Ulysses' stowaways and native scorpions. *Molecular ecology*, 11(5): 925-938.

- Gantenbein, B.; Fet, V. and Gromov, A.V. (2003). The first DNA phylogeny of four species of *Mesobuthus* (Scorpiones, Buthidae) from Eurasia. *The Journal of Arachnology*, 31 (3): 412-420.
- Habeeb, S.K.M. and Sanjayan, K.P. (2011). Sequencing and phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I of the *oxycarenum laetus* (hemiptera: lygaeidae). *International journal of plant, animal and environmental science*, 1(3): 1-8.
- Kadkhodaie, M.; Hanifi, H. and Amoozegary, Z. (2006) Isolation and purification of toxic fractions from the venom of *Mesobuthus eupeus*. *Iranian South Medical Journal*, 9 (1): 9-19.
- Kovarik, F. (1997). Results of the Czech biological expedition to Iran. Part 2. Arachnida: Scorpiones, with descriptions of *Iranobuthus krali* gen. n. et sp. n. and *Hottentotta zagrosensis* sp. n. (Buthidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 61:39-52.
- Martin, A.P. and Palumbi, S.R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc National Academy of Sciences*, 90 (9): 4087-4091.
- Mirshamsi, O.; Sari, A.; Elahi, E. and Hosseinie, S. (2010). Phylogenetic relationships of *Mesobuthus eupeus* (C.L. (Koch, 1839) inferred from COI sequences (Scorpiones: Buthidae). *The Journal of Natural History*, 44 (47): 2851-2872.
- Mirshamsi, O. (2011). *Mesobuthus eupeus* (Scorpiones: Buthidae) from Iran: A polytypic species complex. *Zootaxa*, 2929: 1-21.
- Navidpour, S.; Kovarik, F.; Soleglad, M.E. and Fet, V. (2008). Scorpions of Iran (Arachnida, Scorpiones). Part I. Khoozestan Province. *Euscorpius*, 65: 3-43.
- Quek, S.P.; Davies, S.J.; Itino, T. and Pierce, N.E. (2004). Codiversification in an ant-plant mutualism: stem texture and the evolution of host use in *Crematogaster* (Formicidae: Myrmicinae) inhabitants of *Macaranga* (Euphorbiaceae). *Evolution* 58(3): 554-570.
- Towler, W.I.; Ponce, S.J; Gantenbein, B. and Fet, V. (2001). Mitochondrial DNA reveals a divergent phylogeny in tropical *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from Mexico. *Biogeographica*, 77(4): 157-122.
- Vignoli, V.; Kovarik, F. and Crucetti, P. (2003). Scorpiofauna of Kashan (Esfahan Province, Iran) (Arachnida: Scorpiones). *Euscorpius*, 9: 1-7.
- Xavier, F. (2011). Taq polymerase errors in PCR: Frequency and management. *UMR Fruit Biology and Pathology, INRA and University of Bordeaux*, Pp: 1-20.

Phylogenetic analysis of cytochrome oxidase subunit 1 from the *Mesobuthus eupeus* (Scorpions: *Buthidae*) of Khuzestan province

Nikkhah, N.¹; Jolodar, A.² and Taghavi Moghadam, A.³

Received: 07.06.2017

Accepted: 06.02.2018

Abstract

Ten Scorpion samples *Mesobuthus eupeus* were collected from Baghmalek region in the Khuzestan province of Iran before were identified by Razi Vaccine and Serum Research Institute reference laboratory of Ahvaz. Then, DNA was extracted by phenol/chloroform method in the Laboratory of Molecular Biology in the Faculty of Veterinary Medicine of Shahid Chamran University of Ahvaz. The molecular phylogenetic analysis of *Mesobuthus eupeus* is carried out based on sequence data of 623 nucleotides fragment of cytochrome C oxidase subunit I. The gene fragments were amplified by PCR using the specific forward and reverse primers. PCR products were fractionated by agarose gel electrophoresis prior to purifying using gel extraction kit. The purified DNA was sequenced by an Applied Biosystems DNA sequencer via Gene Fanavaran Company. In order to confirm the sequencing data, each gene fragment was sequenced in both directions. In order to compare the sequence data with the similar sequences from other scorpions, the target sequence data from different scorpions were retrieved from the Genbank using nblast program via NCBI website. Multiple alignments of the deduced amino acid sequence of cytochrome C oxidase subunit I exhibited 92 and 91% identity to the homologous *M. martensii* and *M. gibbosus*, respectively. The highest level of identity was scored with *M. eupeus philipsi* (93%). The results of phylogenetic analysis using cytochrome oxidase subunit 1 indicate that the sequence data of Khuzestan scorpion *Mesobuthus eupeus* is slightly different from *M. eupeus philipsi* gene. As regards of this discrepancy, it concluded that these two *Mesobuthus* species with highly similar morphological features possibly belonging to two different subspecies.

Key words: *Mesobuthus eupeus*, Scorpion, Phylogenetic, Cytochrome oxidase, Khuzestan

1- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, 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- Expert of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Jolodar, A., E-mail: jolodara@scu.ac.ir