

## بررسی فیلوژنی ملکولی عقرب همی اسکورپیوس لپتوروس استان خوزستان بر اساس توالی DNA ریبوزومی در ناحیه Transcribed Spacers 2 (ITS2)

### • کبری چهری

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

### • عباس جلودار (نویسنده مسئول)

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

### • هدیه جعفری

انگل شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه اهواز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۱-۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۲-۰۶

Email: jolodara@scu.ac.ir



### چکیده

عقرب‌زدگی یکی از مشکلات جدی برای بهداشت عمومی بویژه در استان خوزستان است. عقرب‌های جنس *Hemiscorpius* به عنوان یک عامل مهم در زمینه عقرب‌زدگی و مرگ و میر ناشی از آن بویژه در کودکان مطرح است. یازده نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus* از ۶ منطقه استان خوزستان صید و پس از شناسایی، استخراج ژنومیک DNA به روش دستی فنل/کلروفرم انجام گرفت. به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ژن Internal transcribed spacer 2 (ITS2) با اندازه حدوداً ۳۵۰ نوکلئوتید با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت افزوده‌سازی و سپس توالی‌یابی گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از برنامه nBLAST موجود در پایگاه اینترنتی NCBI در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج فیلوژنی نشان داد که درخت فیلوژنی ترسیم شده دارای دو خوشه اصلی A و B است، که با میزان همبستگی ۸۵ درصدی از یکدیگر جدا شدند. خوشه‌ی A به سه زیر خوشه‌ی A1 (شامل: H2, H4, H5, H9, H11M, H8, A2 و H10) (شامل: H22 و H4) و A3 (شامل: H10M) قابل تقسیم است، که نمونه‌های موجود در این زیر خوشه‌ها با هم همبستگی بین ۸۵-۵۴٪ را نشان دادند. توالی‌های مورد مطالعه مشابهت نزدیکی (۹۸/۶-۸۱/۷٪) با تنها توالی عقرب *Hemiscorpius lepturus* (KU341981) ثبت شده در پایگاه بانک ژن به همراه تعدادی از عقرب‌های خانواده *Hemiscorpiidae* نشان دادند. تنها نمونه عقرب H9M در خوشه B با فاصله ژنتیکی نسبتاً بالایی (۱۹/۱-۱۱/۷٪) متمایز از بقیه نمونه‌ها قرار گرفت، که این یافته احتمالاً بیانگر وجود زیر گونه‌ای متفاوت از عقرب *Hemiscorpius lepturus* استان خوزستان می‌باشد.

کلمات کلیدی: *Hemiscorpius lepturus*، فیلوژنتیک، عقرب، Internal transcribed spacer 2 (ITS2)

- Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 112-122

### **Molecular phylogeny of Scorpion *Hemiscorpius lepturus* based on Sequences Ribosomal DNA in the Internal Transcribed Spacers (ITS2) in Khuzestan province**

By: *Chehari, K., Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Jolodar, A., (Corresponding Author) Department of Basic Sciences, Biochemistry and Molecular Biology Section, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Jafari, H., Parasitology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research education and extension Organization, Ahvaz, Iran.*

**Received: 2020-02-10      Accepted: 2020-04-25**

Email: jolodara@scu.ac.ir

Scorpion sting is one of the serious problems for public health especially in Khuzestan province. The genus *Hemiscorpius* scorpions are a major factor to scorpion sting and its related death particularly in children. Eleven specimens of *Hemiscorpius lepturus* scorpion were collected from 6 regions of Khuzestan province and after identification, genomic DNA extraction was performed by manual method of phenol / chloroform. The Internal transcribed spacers (ITS2) genes with about 350 nucleotides was amplified by PCR and then sequenced using forward and reverse primers. The nucleotide sequence was compared using the nBLAST program available at NCBI Web site GenBank database. The results of the phylogenetic showed that the samples can be identified in two clusters A and B, with 85% correlation. Cluster A is subdivided into three subclusters A1 (including: H8, H9, H11M, H5, H44, H2 and H10), A2 (H22 and H4), and A3 (H10M). The specimens in these subclusters, showed a correlation between 54-85%. The studied sequences showed similarity (81.7-98.6%) with the only *Hemiscorpius lepturus* scorpion sequence (KU341981) recorded at the GenBank database beside a number of scorpions of the *Hemiscorpionidae* family. The only H9M scorpion specimen in cluster B with a relatively high genetic distance (11.7-19.1%) was discriminated from the rest of the specimens, indicating that this specimen probably belongs to a subspecies different from the *Hemiscorpius lepturus* scorpion of Khuzestan province.

**Key words:** *Hemiscorpius lepturus*, phylogenetic, scorpion, Internal Transcribed Spacers2

بوتیده (Buthidae) با ۵۱ گونه، اسکورپیونیده (Scorpionidae) با ۳ گونه و همیاسکورپییده (Hemiscorpiidae) با ۶ گونه از قسمت‌های مختلف کشور گزارش شده است (۴). از میان گونه‌های عقربی که در ایران وجود دارند، عقرب زرد خوزستان (گادیم) با نام علمی همی اسکورپیوس لپتوروس (*Hemiscorpius lepturus*) یکی از شایع‌ترین و خطرناک‌ترین عقرب‌های موجود در ایران است (۱۷). این عقرب عضوی از خانواده همی اسکورپییده (Hemiscorpiidae) می‌باشد. بیش‌ترین تعداد مرگ و میر عقرب زدگی در ایران از استان خوزستان و در نتیجه گزش این عقرب بوجود می‌آید، چونکه زهر این عقرب منجر به ایجاد همولیز شدید، و اختلالات قلبی و عروقی می‌شود (۱۴). به نظر می‌رسد که توزیع عقرب *Hemiscorpius lepturus* به عراق و مناطق غربی و جنوب غربی ایران محدود شده است. با این حال، منطقه پراکنش این گونه شامل غرب پاکستان نیز است

#### مقدمه

در دو دهه گذشته تعداد گونه، جنس و خانواده عقرب‌ها در جهان به طور قابل توجهی تغییر کرده است، بطوریکه نزدیک به دو هزار گونه در سراسر جهان شناخته و توصیف شده‌اند. تاکنون ۲۲۳۱ گونه از عقرب‌ها به ۲۰۸ جنس و ۲۰ خانواده دسته‌بندی شده‌اند است (۱۷). فون عقرب‌های ایران یکی از متنوع‌ترین فون‌های منطقه غرب آسیا است که بدلیل تنوع گونه‌ای بالا، این ناحیه به عنوان یکی از غنی‌ترین فون‌ها برای مطالعه این بندپا محسوب می‌شود (۴). علیرغم این تنوع گونه‌ای بالا، فون و جغرافیای جانوری عقرب‌ها با توجه به گستردگی کشور ایران به طور کامل مطالعه نشده است. این گونه مطالعات در استان خوزستان که با توجه به شرایط اقلیمی آن محیط مناسبی برای رشد و تکثیر بندپایان است از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. از جمله عقرب‌ها می‌باشد. بر اساس آخرین تجدیدنظر در طبقه‌بندی عقرب‌ها در ایران سه خانواده

## روش‌ها

### جمع آوری و ریخت شناسی نمونه‌های عقرب

تعداد ۱۱ نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus* (هشت جنس ماده و سه جنس نر) بطور شبانه و با استفاده از نور فرابنفش از ۶ نقطه استان خوزستان شامل شهرستان‌های: ایذه، باغ ملک، بهبهان، چغازنبیل، مسجد سلیمان و لالی به کمک موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز صید گردید. محل جمع‌آوری نمونه‌ها، طول، عرض و ارتفاع جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری شده با استفاده از دستگاه مکان‌یاب (GPS) ثبت گردید. بررسی صفات ریخت شناختی بر روی نمونه‌های نر و ماده بالغ و با استفاده از استریومیکروسکوپ Olympus SZ10 و کولیس مدرج (mm ۳۰۰۰ Digital Caliper) مدرج صورت گرفت. محاسبه میانگین  $\pm$  خطای استاندارد، و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزارهای PAST و SPSS version ۱۶ انجام شد.

### استخراج ژنومی DNA

به منظور استخراج DNA عقرب‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در اتانول خالص نگهداری شدند. پس از خرد کردن ۱۰۰-۵۰ میکروگرم از قسمت متازوما (عضلات ناحیه دم) عقرب در حضور نیتروژن مایع، ۶۰۰ میکرولیتر بافر RSB (حاوی ۲۵ mM EDTA، ۱۰ mM Tris-HCl و ۱۰ mM NaCl) به همراه ۶۰ میکرولیتر ۱۰ درصد SDS به آن اضافه شد. DNA ژنومیک با میزان هم حجم فنل / کلروفرم مخلوط شده و سپس فاز آبی با میزان هم حجم کلروفرم استخراج گردید. در ادامه DNA ژنومیک در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی به همراه ۱۰ میکرولیتر ۵ NaCl و ۱۲۰۰ میکرولیتر اتانول خالص سرد مجدداً در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی و افزودن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد مجدداً در همان دور و مدت مذکور سانتریفوژ شد. در نهایت پس از دور ریختن مایع رویی و خشک شدن رسوب ته میکروتیوپ،

(۵). سه گونه مربوط به خانواده همی سکورپییده در ایران بنامهای H. persicus و H. gaillardi + lepturus وجود دارند (۱۰). امروزه، شناسایی عمومی گونه‌ها از صفات ظاهری به سمت جنبه‌های ژنتیک و تکامل آنها سوق پیدا کرده است. روش‌های مولکولی به عنوان ابزاری دقیق جهت شناسایی تنوع ژنتیکی و همچنین شناسایی و معرفی گونه‌های جدید کاربرد دارد. در این روش‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، ژن‌های میتوکندریایی نظیر سیتوکروم اکسیداز c زیرواحد ۸) و تکنیک DNA بارکدینگ (۱۶) ارزیابی‌های مولکولی انجام می‌گردد. در یک مطالعه، تعیین مرز گونه‌ای برای عقرب *Mesobuthus Przewalski* (خانواده Buthidae) از شمال غربی چین از طریق یک رویکرد ترکیبی شامل تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک با بکارگیری مارکر میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز c زیرواحد ۱، مدل‌سازی زیست محیطی و مقایسه مورفولوژیکی انجام گرفت (۲۱). از دیگر نشانگرهای مولکولی می‌توان به ژن‌های RNA ریپوزومی اشاره کرد که توسط فاصله اندازه‌های (Internal Transcribed Spacers) ITS1 و ITS2 از هم جدا می‌شوند. توالی ITS علاوه بر وجود نواحی حفاظت شده، دارای نواحی متغیری است که به منظور شناسایی ژنتیکی موجودات استفاده می‌شوند. فاصله اندازه‌گر ژنتیکی ITS2 یک نشانگر فیلوژنتیک است که با توجه به ترکیب توالی نوکلئوتیدی و ساختار دومش در بررسی‌های فیلوژنتیک از جمله در تعیین حدود گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). در تونس نیز در ارتباط با سه گونه آندرکتونوس از خانواده Buthidae بررسی‌هایی بر اساس تنوع توالی rDNA در منطقه ITS1 و ITS2 انجام گرفت که در نتیجه آن، اعتبار بعضی از این گونه‌ها به لحاظ طبقه‌بندی مورد تردید قرار گرفت (۱).

با توجه به اینکه تاکنون ارزیابی فیلوژنتیک مولکولی جامعی بر اساس نشانگرهای ریپوزومی در ناحیه (ITS2) بر روی گونه عقرب‌های جنس *Hemiscorpius lepturus* استان خوزستان انجام نگرفته است لذا، تنوع ژنتیک گونه‌ای این عقرب بر اساس توالی ITS2 مورد سنجش قرار گرفت.

جدول ۱- محل جمع‌آوری نمونه‌های عقرب *Hemiscorpius lepturus* به همراه طول، عرض و ارتفاع جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری در مناطق مختلف استان خوزستان

نمونه‌ها	منطقه نمونه‌برداری	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع جغرافیایی
H۲۲, H۴۴	باغ ملک	۱۵°۲۲'۴۹"E	۱۷°۵۵'۳۱"N	۱۸۵ m
HM <sup>۹</sup>	باغ ملک	۱۴°۲۰'۴۹"E	۱۶°۵۴'۳۱"N	۱۸۴ m
H۱۰M, H۱۱M	چغازنبیل	۰۳°۳۱'۴۸"E	۵۴°۰۰'۳۳"N	۶۷,۵ m
H۵	بهبهان	۱۷°۱۲'۵۰"E	۴۶°۱۴'۳۰"N	۱۲۷,۵ m
H۲	لالی	۳۸°۰۳'۴۹"E	۳۳°۱۸'۳۱"N	۳۲۸ m
H۴	مسجد سلیمان	۳۷°۰۰'۴۹"E	۳۰°۴۶'۳۱"N	۴۸,۵ m
H۸, H۹, H۱۰	ایذه	۱۳°۴۶'۳۱"E	۵۶°۵۰'۴۹"N	۳۵۰

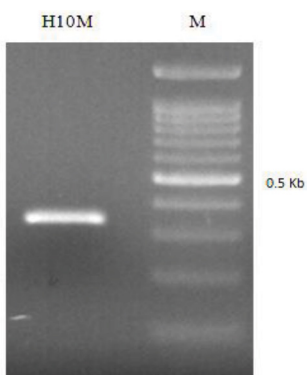
۵۰ میکرولیتر بافر TE به آن اضافه شد. بعنوان روش جایگزین، استخراج DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA از بافت Sina Pure (Tehran, Iran) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی و میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ در همه نمونه‌ها محاسبه گردید.

افزوده سازی ناحیه ITS۲ به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بمنظور تکثیر قطعات ژنی ITS۲ با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد. آغازگرهای رفت (5'-GGGTCGATGAAGAACGCAGC) و برگشت (5'-TATGCTTAAATTCAGGGGG) جهت تکثیر قطعه‌ی ژن مورد نظر بترتیب از ناحیه ۵،۸S و ۲۸S مطابق شکل شماتیک شکل (۱) انتخاب گردیدند (۱۱). ساخت آغازگرها به شرکت سیناژن در تهران، ایران سفارش داده شد که پس از تحویل با افزودن آب مقطر استریل تا غلظت ۱۰ μM رقیق شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی بافر ۱ (۰/۲۵mM) dNTP، PCR x (۰/۵ mM)، آغازگر رفت و برگشت هر کدام (۰/۴ μM) DNA، پلی مرز Taq U (۰/۵) و ۱۰ نانوگرم الگو DNA انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه دردمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۸ چرخه با واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. به منظور بررسی محصول PCR و اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر، ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و سپس با استفاده از دستگاه ژل داگ از آن عکسبرداری صورت گرفت.

### نتایج

#### شناسایی نمونه‌های عقرب

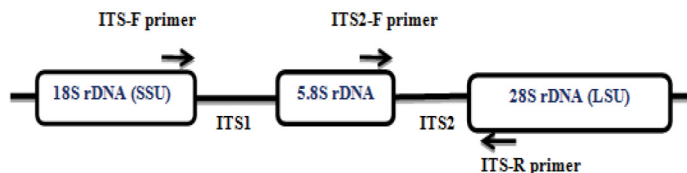
تعداد ۱۱ نمونه عقرب جنس Hemiscorpius شامل هشت جنس ماده و سه جنس نر (جنس نر با حرف M مشخص شده است) که از ۶ منطقه مختلف استان خوزستان جمع‌آوری گردیده بودند، پس از انتقال با



شکل ۲- الکتروفورز محصول واکنش PCR برای تکثیر قطعه‌ی ژن ITS۲ از عقرب *Hemiscorpius lepturus* بر روی ژل آگارز ۱ درصد. از راست به چپ به ترتیب در ستون اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی، در ستون دوم نمونه H1۰M

#### توالی‌یابی، آنالیز ژن و ترسیم درخت فیلوژنی

با توجه به کیفیت محصول PCR از نظر عدم تولید اسمیر و ایجاد تک باند شفاف، ۲۰ میکرولیتر معادل ۴ میکروگرم از محصول PCR بصورت مستقیم تعیین توالی گردید. با استفاده از نرم‌افزار nBLAST (ncbi.nlm)



شکل ۱- شکل شماتیک ژن ITS۲ به‌مراه جایگاه آغازگرهای رفت و برگشت بخش‌های انتهایی ۵،۸S و ۲۸S ریبوزوم.

برگشت بین ۲۲۷-۲۸۴ نوکلئوتید بودند. منظور مقایسه توالی نوکلئوتیدی هدف، همترازی با استفاده از برنامه Clustal\_w انجام شد (شکل ۳). همانطور که دیده می‌شود بیشترین نوکلئوتیدهای محافظت شده و کمترین میزان حذف شدگی در ناحیه ۵'-end توالی‌های نوکلئوتیدی هدف بویژه در محدوده نوکلئوتیدی ۶۰-۱ مشاهده گردید. کمترین میزان تشابه و بیشترین حذف در این ناحیه مربوط به نمونه‌های H۸ و H۹ بود. بیشترین عدم تشابه و همچنین بیشترین تفاوت و حذف شدگی مربوط به نمونه‌های H۹M و H۴ بویژه در بین توالی نوکلئوتید ۲۳۹-۱۷۸ دیده شد. با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی قطعات ژن ITS۲ هدف به دست آمده از عقرب‌های Hemiscorpius lepturus استان خوزستان، پس از عمل هم‌ترازی به کمک نرم‌افزار MEGA۷، رسم درخت فیلوژنیک صورت گرفت (شکل ۴). نتایج حاصل از شکل ۴ نشان داد که درخت فیلوژنی ترسیم شده دارای دو خوشه‌ی اصلی A و B است که با میزان همبستگی ۸۵ درصدی از یکدیگر جدا شده‌اند. خوشه‌ی A به سه زیر خوشه‌ی A۱ (شامل: H۸, H۵H۹, H۱۱M, H۴۴, H۲, H۱۰) و A۲ (شامل: H۲۲, H۴) و A۳ (شامل: H۱۰M) قابل تقسیم است، که نمونه‌های موجود در این زیر خوشه‌ها با هم تشابه نسبی بین ۸۵-۵۴٪ نشان دادند. نمونه‌های عقرب موجود در زیر شاخه‌های A۱ و A۲ با درصد همبستگی بترتیب ۳۹ و ۴۲ درصد از یکدیگر جدا شده‌اند، در حالی که نمونه H۱۰M به تنهایی در زیر شاخه A۳ از دیگر اعضای این شاخه جدا افتاده است (۸۵٪). در زیر خوشه A۱ دو نمونه‌ی H۸ و H۹ با درجه همبستگی ۵۳ درصدی در یک زیر خوشه جا گرفتند که با دیگر نمونه‌های خوشه‌ی A گرچه شباهت دارند، ولی بصورت یک خوشه جداگانه از بقیه‌ی نمونه‌ها متمایز بودند. تنها نمونه عقرب H۹M بود که بصورت جدا افتاده در خوشه B کاملاً متمایز از بقیه نمونه‌ها قرار گرفت. این پدیده احتمالاً بیانگر وجود تفاوت‌های درون جمعیتی بصورت درون گونه‌ای در نمونه‌های مورد مطالعه عقرب Hemiscorpius lepturus مناطق مختلف استان خوزستان می‌باشد. تنها توالی مربوط به Hemiscorpius lepturus ثبت شده در بانک ژن Amblyomma americanum (AF291874) و توالی کهن (KU341981)

استفاده از کلید تشخیص ارائه شده (۹،۱۸). شناسایی گردیدند (جدول ۱). با مقایسه نسبت‌های ریخت سنجی و فاکتورهای مورفومتریکی، گرچه دو ریختی جنسی نر و ماده کاملاً مشهود بود، ولی در داخل جنس تفاوت معنادار دیده نشد.

### افزوده‌سازی ژن Internal transcribed spacer ۲ (ITS۲)

منظور افزوده سازی ناحیه ITS۲ توالی بین بخش‌های انتهایی ۵،۸S و ۲۸S ریپوزومی آغازگرهای رفت و برگشت مطابق شکل شماتیک ۱ انتخاب، و سپس به کمک PCR افزوده سازی گردید. کمیت و کیفیت DNA ژنومیک استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ بررسی گردید که کیفیت نمونه‌ها در محدوده بین ۱/۹۳-۰/۷۶ تخمین زده شد. میزان غلظت DNA نمونه‌ها نیز بین ۵۵-۸ نانوگرم در هر میکرولیتر محاسبه گردید. طی انجام واکنش PCR که با آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت انجام گرفت، قطعه‌ی ژن ITS۲ با اندازه حدوداً ۳۵۰ نوکلئوتید تولید گردید. با توجه به اینکه تنها ۵ میکرولیتر از محصول PCR بمنظور الکتروفوروز بر روی ژل آگارز برده شده است، مراتب بر تکثیر کارآمد ژن هدف و بهینه بودن شرایط واکنش دلالت می‌کند (شکل ۲).

### آنالیز جریان ژنی و تمایز ژن

توالی‌های نوکلئوتیدی قطعات ژن ITS۲ به دست آمده از ۱۱ نمونه عقرب Hemiscorpius lepturus استان خوزستان بین ۲۲۷-۲۸۴ نوکلئوتید مشخص گردید. تعداد ۱۱ هاپلوتیپ و ۸۰ نقطه پلی‌مورفیسم در رابطه با این ۱۱ نمونه توسط نرم‌افزار DnaSP نسخه ۶/۱ ثبت شد. تنوع نوکلئوتیدی Pi: ۰،۹۱۱۷ و تتا دلبیو Theta-W: ۰،۱۳۱۳۱ محاسبه شد. آنالیز جریان ژنی و تمایز ژن نشان می‌دهد که میزان Fst (تمایز ژنتیکی) بین دو گروه جمعیت کمتر از ۰/۳۳ است (جدول ۲).

### همترازی و ترسیم درخت فیلوژنیک

توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده پس از حذف آغازگرهای رفت و

جدول ۲- تمایز ژنتیکی میان جمعیت‌های متفاوت از عقرب Hemiscorpius lepturus استان خوزستان

جمعیت ۱	جمعیت ۲	Fst
باغملک (H۲۲, H۴۴, H۸)	(چغازنبیل و مسجد سلیمان)	۰/۰۴۲۷۶
باغملک	ایذه	۰/۱۲۹۲۴
(چغازنبیل و مسجد سلیمان) (H۱۰M, H۱۱M, H۴)	ایذه (H۸, H۹, H۱۰)	۰/۱۱۰۱۷

H2	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGATTCTTCGAACGCACA
H10	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGATTCTTCGAACGCACA
H11M	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGATTCTTCGAACGCACA
H5	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGATTCTTCGAACGCACA
H10M	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGATTCTTCGAACGCACA
H44	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGATTCTTCGAACGCACA
H22	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGATTCTTCGAACGCACA
H9M	1	CAGATGCGAGACTTGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCACTGA-TCTTCGAACGCACA
H4	1	CAGAA GCGA A CATGGTGTGAATTGCAGGACACATTGAGCCCTGCTTTCGACGCACA
H8	1	-----CTGA-TCTTCGA-----CG
H9	1	-----CTGATTCTCAAGC-----CA
H2	61	TTGCGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H10	61	TTGCGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H11M	61	TTGCGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H5	61	TTGCGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H10M	61	TTGCGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H44	61	TTGCGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H22	60	TTGTTGGCCTCGGGTCCCTCCCGGGCCCTCTTTTGGAGGGTCGGAAAAACAAGAAGGA
H9M	60	TTGGGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAATCAAGAGGGA
H4	61	ATGGCGCCTCGGGTTCCTCCCGGGCCCTGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAACAAGAGGGA
H8	14	AATTGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H9	17	TTGCGGCCTCGGGTCCCTCCCGTGGCCTCGTCTGTCTGAGGGTCGGAAAAATCAAGAGGGA
H2	121	CTGGGTGACGTGCTGAGCCCCGGTACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H10	121	CTGGGTGACGTGCTGTCGCCCGGTACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H11M	121	CTGGGTGACGTGCTGTCGCCCGGTACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H5	121	CTGGGTGACGTGCTGTCGCCCGGTACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H10M	121	CTGGGTGACGTGCTGTCGCCCGGTACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H44	121	CTGGGTGACGTGCTGTCGCCCGGTACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H22	120	CTGGGTGACGTGCTGTCGCCCGGTACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H9M	120	CTGGGTGACGTGCTGTCGCCCGGTTCACCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H4	121	CTGGGGGACGTTCTTGGCCCGGTGACCCACGTGGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H8	69	T---GTTACGGCTGTG-CCCGGTACCCACG-GGACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H9	73	TC-----CCTTCGTGCTTCCCGTTACCCCCAAACGCTTCGGGAGTTCTGTGTGCTTCC
H2	181	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGATCGGAGAGATGCCTGCGAAGC-CCGA
H10	181	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGATCGGAGAGATGCCTGCGAAGC-CCGA
H11M	181	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGATCGGAGAGATGCCTGCGAAGC-CCGA
H5	181	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGTTCGGAGAGATGCCTGCGAAGC-CCGA
H10M	181	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGTTCGGAGAGATGCCTGCGAAGC-CCGA
H44	181	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGTTCGGAGAGATGCCTGCGAAGC-CCGA
H22	180	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGTTCAGAGAGATGCCTGCGAAGC-CCGA
H9M	178	GTCGTCTCAAGCAAG---CTCGTTCGTGCGGATGTCAGAGA---CCCTGCAAGC-CCG
H4	180	GTCGTCTCAAG-CCAGCTCTGTCC-TGCGGAAGTTC-GAAGATGCCTCGAAGGC-CCGA
H8	124	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGATCGGAGAGATGCCTGCAAGC-CCGA
H9	128	GTCGTCTCAAGACAAGCTCTGTCCGTGCGGAAGATCGGAGAGATGCCTGCAAGC-CCGA
H2	240	GAG-CCGCAGGCGTCAACGGCGGTCTGCATGGACTTTTTTTTTTCG
H10	240	GAG-CCGCAGGCGTCAACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTC-G
H11M	240	GAG-CCGCAGGCGTCAACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTCG
H5	240	GAGCCCGCAGGCGTCAACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTCG
H10M	240	GAG-CCGCAGGCGTCAACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTCG
H44	241	GAA-CCGCAGGCTTCAACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTC-G
H22	239	GAGACCGCAGGCGTCAACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTCG
H9M	230	----CCGCAGGCTCC-ACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTCG--
H4	236	A---ACGCAGGCTC-CACGCGGTCTGCATGGACTTTTTTTTTTCG
H8	183	GAG-CCGCAGGCGTCAACGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTCG
H9	187	GAG-CCGCAGGCGC-CCGGCGGTCTGCACGGACTTTTTTTTTTCG

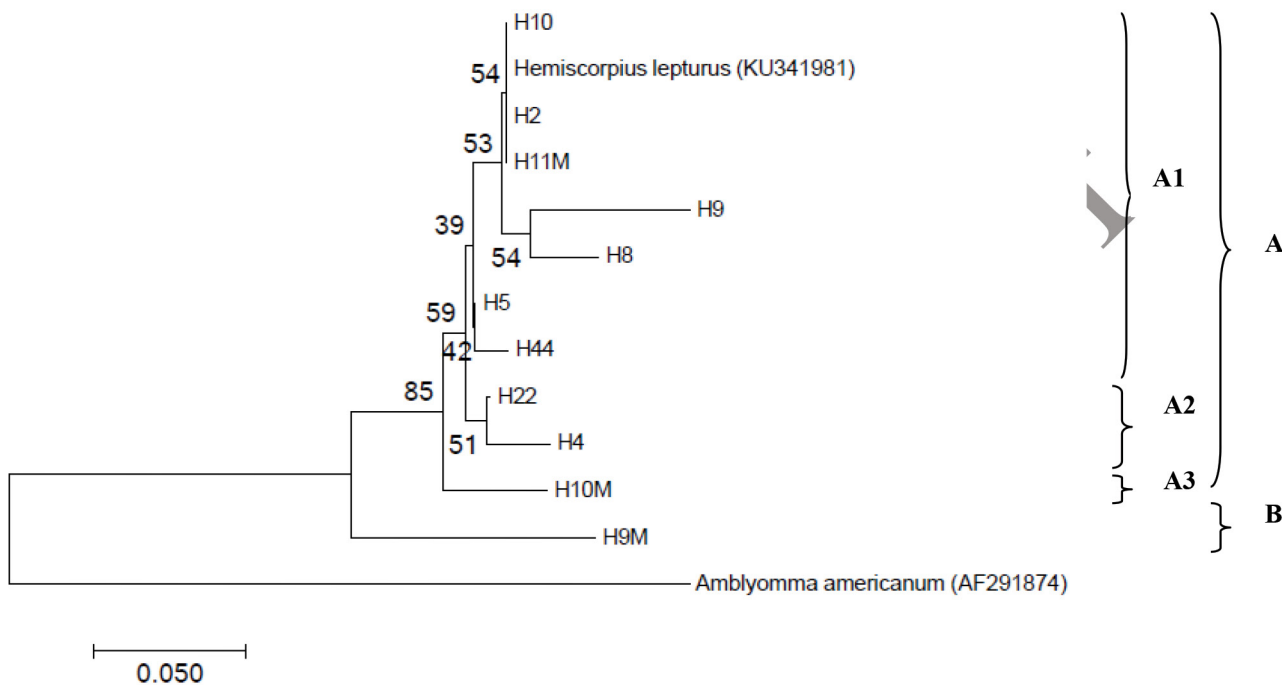
شکل ۳- مقایسه توالی نوکلئوتیدی قطعات ژن ITS۲ هدف مربوط به نمونه های عقرب *Hemiscorpius lepturus*. نوکلئوتیدهای کاملاً یکسان با رنگ تیره، و نوکلئوتیدهای مشابه و محافظت شده با رنگ خاکستری نشان داده شده اند.

توالی عقرب *Hemiscorpius lepturus* ثبت شده (مربوط به ایزده) در پایگاه بانک ژن NCBI (*Hemiscorpius lepturus*; KU341981) قرار گرفتند. در شاخه B سه نمونه H4 (مسجد سلیمان)، H22 (باغملک) و H9 (ایذه) با میزان همبستگی به ترتیب ۱۷، ۳۵ و ۴۹ درصد جدا از بقیه نمونه‌های مشاهده شدند. نمونه عقرب H8 تنها نمونه جدا شده از ایزده است که بصورت کاملاً جدا افتاده در خوشه B قابل تمیز بود. نمونه کنه *Amblyomma americanum* (AF291874) بعنوان نمونه خارج گروه نیز در شکل مشاهده می‌گردد (شکل ۵).

#### تعیین فاصله‌ی ژنتیکی عقرب‌های *Hemiscorpius* استان خوزستان

فاصله ژنتیکی ۱۱ نمونه‌ی عقرب *Hemiscorpius lepturus* مورد مطالعه استان خوزستان در مقایسه با هم و در مقایسه با تنها نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus* ثبت شده در بانک داده‌های ژن NCBI، با استفاده از برنامه *genetic distance* نرم‌افزار *MEGA7* محاسبه شد (جدول ۳). درصد تفاوت بین ده نمونه عقرب مورد مطالعه H22، H9، H4، H8، H10، H10M، H2، H44 و H5 بین صفر تا ۸/۵ درصد محاسبه گردید. با توجه به نتایج جدول ۳، مقایسه نمونه عقرب H9M با دیگر نمونه‌های مورد مطالعه تفاوت نسبتاً بیشتری (۱۹/۱-۱۱/۷٪) را نشان داد. شایان ذکر است که نمونه H9M گرچه با نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus*

بعنوان نمونه خارج گروه در شکل مشاهده می‌گردند. درخت فیلوژنیک با حضور ۱۱ نمونه عقرب جنس *Hemiscorpius* استان خوزستان که بر اساس همترازی توالی‌های نوکلئوتیدی قطعات ژن ITS2 صورت گرفته بود (شکل ۳)، بهمراه توالی‌های مربوط به عقرب‌های مشابه که در خانواده *Hemiscorpiidae* در پایگاه داده‌ی ژن NCBI موجود بود، ترسیم گردید. ترسیم درخت فیلوژنیک توسط برنامه *MEGA7* و با استفاده از روش *Neighbor-Joining* (اتصال به همسایه) و تست بوت استرپ ۱۰۵۰ تکرار در حالی که شکاف موجود در داده‌ها حذف شده بود، انجام گردید. (شکل ۵). با توجه به شکل ۵، دو خوشه‌ی A و B در ترسیم درخت فیلوژنی قابل شناسایی بود. خوشه A با میزان همبستگی ۵۵ درصدی به دو زیر شاخه A1 و A2 قابل تقسیم می‌باشد در زیر خوشه A1 نمونه‌های عقرب جدا شده از چغازنبیل (H11M) و (H10M)، ایزده (H10)، بهبهان (H5)، لالی (H2) و باغملک (H44) با درجه همبستگی ۳۳ درصد در این زیر خوشه قرار گرفتند. نمونه H9 جدا شده از باغملک با همبستگی ۲۶ درصدی از بقیه نمونه‌ها در این زیر خوشه بصورت جدا قرار گرفت. در این زیر خوشه همچنین عقرب‌هایی از خانواده همی اسکورپیونیده بنام‌های *Pandinus*، *Centruroides sculpturatus* (*imperator*) (AY210830)، *(XR\_002757583)* (JX909606)، *patersoni* *Vaejovis* به همراه تنها



شکل ۴- درخت فیلوژنیک توالی‌های مربوط به ۱۱ نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus* براساس توالی قطعه‌ی ژن ITS2 هدف. درخت با روش *Neighbor-Joining* و با درصد تکرار پذیری ۱۰۵۰ انجام شد. اعداد در بالای خط‌ها نشان‌دهنده ارتباط فی مابین گروه‌ها است.

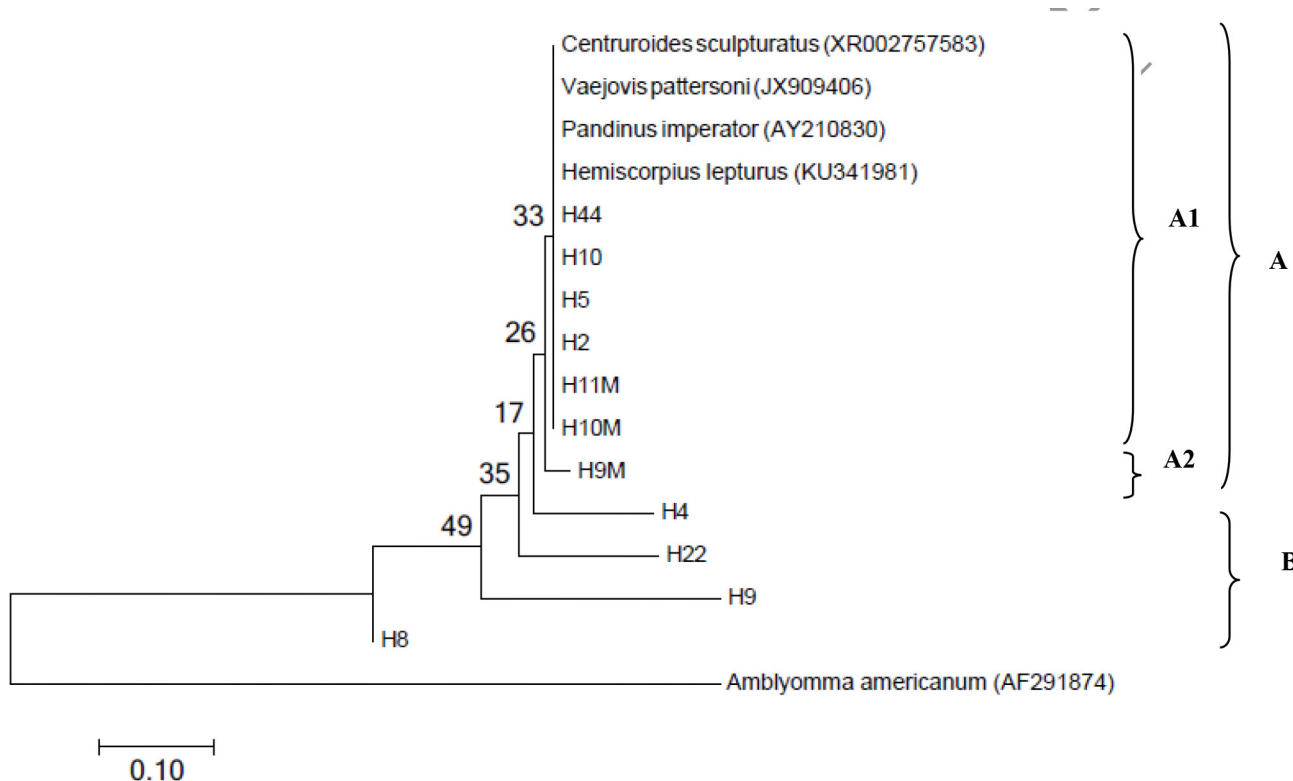
گونه‌های عقرب جنس *Hemiscorpius* در ایران تاکنون انجام نگرفته است، این باعث نامشخص ماندن وضعیت تاکسونومیک و توزیع جغرافیایی آن شده است. به همین علت در مورد روابط درون گونه‌ای و بین گونه‌ای این عقرب بویژه در استان خوزستان نیاز به بررسی و بازنگری تاکسونومیک دقیق گونه‌های این جنس می‌باشد (۱۳).

در مطالعه‌ی حاضر، فیلوژنی براساس افزوده‌سازی قطعه‌ی ژن ITS۲ مربوط به ۱۱ نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus* که از ۶ منطقه مختلف استان خوزستان در جنوب غرب کشور صید شده‌اند، انجام شد. در این مطالعه دو خوشه‌ی A و B در درخت فیلوژنی قابل شناسایی بود (شکل ۵). همه‌ی نمونه‌های عقرب مورد مطالعه به همراه نمونه‌های عقربی از خانواده *Hemiscorpionidae* همگی در خوشه‌ی A قرار گرفتند. هر چند که تعدادی از نمونه‌های عقرب مورد مطالعه (H۸، H۹، H۲۲) با فاصله نسبتاً مشخصی از بقیه نمونه‌ها قرار دارند، ولی همگی در کنار تنها نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus* ثبت شده در پایگاه بانک ژن (NCBI (*Hemiscorpius lepturus*; KU۳۴۱۹۸۱) قرار گرفتند. این بدین معنی است که نمونه‌های عقرب جا گرفته در خوشه‌ی A که

ثبت شده در بانک ژن ۱۲/۸ درصد اختلاف داشت، ولی این اختلاف در ده نمونه دیگر بین صفر تا ۶/۴ درصد متغیر بود.

### بحث

عقرب‌گزیدگی یکی از مشکلات جدی برای بهداشت عمومی بویژه در استان خوزستان است (۲۰). عقرب‌های جنس *Hemiscorpius* به عنوان یک عامل مهم در زمینه عقرب‌زدگی و مرگ و میر ناشی از آن بویژه در کودکان مطرح است. امروزه، شناسایی عمومی گونه‌ها از صفات ظاهری به سمت جنبه‌های ژنتیک و تکامل آنها سوق پیدا کرده است. روش‌های مولکولی به عنوان ابزاری دقیق جهت شناسایی تنوع ژنتیکی و همچنین شناسایی و معرفی گونه‌های جدید کاربرد دارد. به علت بالا بودن میزان تنوع گونه‌ای در عقرب‌های ایران، این منطقه از جهان بعنوان یکی از غنی‌ترین فون‌های عقرب برای مطالعه این بندپا محسوب می‌شود. عقرب‌های خانواده‌ی *Hemiscorpiidae* با داشتن بیش از ۴ گونه جز کشته‌ترین عقرب‌ها در استان خوزستان محسوب می‌شوند (۴). از آنجائی‌که مطالعه فیلوژنیک جامعی بر اساس مارکرهای ملکولی برای



شکل ۵- درخت فیلوژنیک عقرب‌های *Hemiscorpius lepturus* استان خوزستان براساس توالی قطعات ژن ITS۲ هدف در مقایسه‌ی با توالی‌های مشابه از دیگر عقرب‌ها. فیلوژنی براساس نتایج هم‌تازی توالی‌هایی که قبلاً در شکل (۳) آورده شده است، رسم گردید. اعداد در بالای خط‌ها نشان‌دهنده‌ی ارتباط فی‌مابین گروه‌ها است.



جدول ۳- جدول تفاوت ژنتیکی نمونه‌های عقرب Hemiscorpius lepturus استان خوزستان با استفاده از مارکر ITS2 در مقایسه‌ی با توالی ثبت شده در بانک ژن (KJ41981). (H. lepturus).

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱.H۹													
۲.H۲۲	۰/۰.۸۵												
۳.H۴	۰/۰.۸۵	۰/۰.۲۱											
۴.H۸	۰/۰.۷۴	۰/۰.۵۳	۰/۰.۷۴										
۵.H۹M	۰/۱.۹۱	۰/۱.۲۸	۰/۱.۴۹	۰/۱.۶۰									
۶.H۱۰M	۰/۱.۱۷	۰/۰.۵۳	۰/۰.۷۴	۰/۰.۸۵	۰/۱.۴۹								
۷.H۱۱M	۰/۰.۶۴	۰/۰.۲۱	۰/۰.۴۳	۰/۰.۳۲	۰/۱.۲۸	۰/۰.۵۳							
۸.H۲	۰/۰.۶۴	۰/۰.۲۱	۰/۰.۴۳	۰/۰.۳۲	۰/۱.۲۸	۰/۰.۵۳	۰/۰.۰۰						
۹.H۵	۰/۰.۷۴	۰/۰.۱۱	۰/۰.۳۲	۰/۰.۴۳	۰/۱.۱۷	۰/۰.۴۳	۰/۰.۱۱	۰/۰.۱۱					
۱۰.H۱۰	۰/۰.۶۴	۰/۰.۲۱	۰/۰.۴۳	۰/۰.۳۲	۰/۱.۲۸	۰/۰.۵۳	۰/۰.۰۰	۰/۰.۰۰	۰/۰.۱۱				
۱۱.H۴۴	۰/۰.۸۵	۰/۰.۲۱	۰/۰.۴۳	۰/۰.۵۳	۰/۱.۲۸	۰/۰.۵۳	۰/۰.۲۱	۰/۰.۲۱	۰/۰.۱۱	۰/۰.۲۱			
۱۲.Hemiscorpius_lepturus_ (KJ41981)	۰/۰.۶۴	۰/۰.۲۱	۰/۰.۴۳	۰/۰.۳۲	۰/۱.۲۸	۰/۰.۵۳	۰/۰.۰۰	۰/۰.۰۰	۰/۰.۱۱	۰/۰.۰۰	۰/۰.۲۱		
۱۳.Amblyomma_americanum_ (AF41874)	۰/۴.۲۶	۰/۳.۷۲	۰/۳.۸۳	۰/۴.۰۴	۰/۴.۱۵	۰/۳.۹۴	۰/۳.۹۴	۰/۳.۹۴	۰/۳.۸۳	۰/۳.۹۴	۰/۳.۹۴	۰/۳.۹۴	۰/۳.۹۴

رابطه نسبتاً نزدیکی با تنها گونه‌ی *Hemiscorpius lepturus* ثبت شده در پایگاه بانک ژن دارند، بیشترین تفاوت و جدا افتادگی را با دیگر نمونه‌های عقرب‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند. این پدیده احتمالاً یک تفاوت بین‌گونه‌ای آشکار را بین ۱۱ نمونه عقرب *Hemiscorpius* مورد مطالعه نشان می‌دهد. هرچند که در داده‌های ریخت‌شناسی دو ریختی جنسی نر و ماده کاملاً مشهود بود، و اختلاف از این نظر کاملاً معنی‌دار است، ولی تفاوت آشکاری بین توالی‌های مربوط به نمونه‌های نر و ماده دیده نشد. عقرب‌های دیگری از خانواده *Hemiscorpionidae* نیز در خوشه‌ی A قرار گرفتند.

مقایسه‌ی توالی ژن ITS2 در نمونه‌های عقرب *Hemiscorpius lepturus* استان خوزستان که در جدول ۴-۵ آورده شده است، نشان می‌دهد که فاصله‌ی ژنتیکی بین این نمونه‌ها بین ۲۳/۵-۴/۳ درصد است. در مطالعات مختلفی فاصله‌ی ژنتیکی حدود ۱۰ درصد بین گونه‌ها را بعنوان معیاری برای تأیید گونه جدید استفاده کرده‌اند، از جمله مطالعه اخیر در مکزیک در رابطه با گونه جدید عقرب متعلق به جنس *Centruroides* Marx از خانواده *Buthidae* که از رشته کوه کوالکومن مکزیک شناسایی شده است و با استفاده از mRNA ژن میتوکندری 16S مورد تجزیه و تحلیل مولکولی قرار گرفته است (۲، ۱۴). بنابراین، باتوجه به تفاوت صفر تا ۸/۵ درصدی نوکلئوتیدی که نسبت به توالی قطعه‌ی ژن ITS2 بین همه نمونه‌های مورد مطالعه بغیر از نمونه H<sup>۹</sup>M مشاهده شد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این نمونه‌ها به همراه تنها نمونه عقرب *Hemiscorpius lepturus* ثبت شده در بانک ژن (KU۳۴۱۹۸۱) همگی در یک گونه قرار دارند. این در حالیست که تنها نمونه عقرب H<sup>۹</sup>M تفاوت نسبتاً بالایی (۱۱/۷-۱۹/۱٪) را با بقیه نمونه‌ها نشان داد، که این امر دال بر این است که این نمونه عقرب احتمالاً متعلق به زیر گونه‌ای متفاوت از عقرب *Hemiscorpius lepturus* می‌باشد. هرچند که این میزان تنوع ژنتیکی گونه‌ای با توجه به وجود چرخه‌ی جنسی در تولید مثل عقرب، قابل انتظار نبود. ولی احتمال دارد که این حد از تغییرپذیری و تنوع ژنتیکی همان‌طور که در مورد جنس *Biomphalaria* حلزون پیشنهاد شده است (۷، ۱۲). به دلیل عوامل موثر دیگری نظیر نوترکیبی، جهش و یا جریان ژنی قابل توجه باشد. بر اساس یافته‌های He و همکاران (۲۰۰۶) مقدار Nm بر اساس رابطه  $Nm \approx Fst / (1 - Fst)$  هنگامی که از مقدار ۰/۵ بیشتر باشد و یا میزان Fst کمتر از ۰/۳۳ باشد، جریان ژن را می‌توان بعنوان عامل اصلی بین جمعیت‌ها لحاظ نمود (۶). در این مطالعه Fst کمتر از ۰/۳۳ است که بیانگر وجود جریان ژنی بین دو گروه جمعیت می‌باشد (جدول ۳). از طرف دیگر ۱۱ نمونه بررسی شده طبق بررسی با نرم‌افزار DnaSP تعداد ۱۱ هاپلوتیپ متفاوت را نشان می‌دهند. همچنین نتیجه تست تاجیما، در سطح معنی دار کمتر از ۰/۰۵ نیز منفی می‌باشد (Tajima's D: -۱,۷۹۸۱۳). لذا با مشاهده این نتایج، استفاده از دیگر نشانگرهای ملکولی به منظور تأیید زیرگونه‌های دیگر جنس *Hemiscorpius* در استان خوزستان ضروری به نظر می‌رسد.

#### منابع مورد استفاده

- 1-Ali, Z., Boursot, Pierre., Said, Khaled., Lagnel, Jacques., Chatti, Noureddine and Navajas, Maria. 2000. Comparison of Ribosomal ITS Regions Among *Androctonus* spp. Scorpions (Scorpionida: *Buthidae*) from Tunisia. *Journal of medical entomology* 37: 787-790.
- 2- Billington, N. and Hebert, D. N. 1991 Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48 (Supplement 1): 80-94.
- 3- Buchheim, MA., Keller, A., Koetschan, C., Förster, F. and Merget, B. 2011. Internal Transcribed Spacer 2 (nu ITS2 rRNA) Sequence-Structure Phylogenetics: Towards an Automated Reconstruction of the Green Algal Tree of Life. *PLOS ONE*, 6(2): e16931.
- 4- Dehghani, R., MotevaliHaghi, F., Mogaddam, M., Sedaghat, MM. and Hajat, H. 2016. Review study of scorpion Classification in Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 4:440-444.
- 5- Fet, V. 2000. Subfamily *Hemiscorpiinae* Pocock, 1893. In: Catalogue of the Scorpions of the World (1758-1998). Fet, V., Sissom, D. W., LOWE, G., Braunwalder, M. E. (eds.). The New York Entomological Society, New York, USA. p. 428-431.
- 6- He, H., Yuan, X., Wei, C. and Yuan, F. 2006. Genetic variation of the Mitochondrial ND4 region among geographical populations of *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) in China. *Journal of Kansas Entomology Society* 79: 211-222.
- 7- Jarne, P. and Delay, B. 1991. Population genetics of freshwater snails. *Trends Ecol Evol* 6: 383-386.
- 8 - Jolodar, A. 2019. Molecular Characterization and Phylogeny Analysis Based on Sequences of Cytochrome Oxidase gene From

استان خوزستان ضروری به نظر می‌رسد.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه تاکنون ارزیابی فیلوژنیک مولکولی جامعی بر اساس نشانگرهای ریبوزومی در ناحیه (ITS2) بر روی گونه عقرب‌های جنس

- Hemiscorpius lepturus of Iran. *Iran J Vet Med*, 131: 59-67.
- 9- Lamoral, BH. 1979. The scorpions of Namibia. *Annals of the Natal Museum*, 23: 497-784.
- 10- Mond, L. and Lourenco, W.L. 2005. Hemiscorpiidae (Scorpiones) from Iran, with descriptions of two new species and notes on biogeography and phylogenetic relationships. *Revue Suisse De Zoologie*. DOI: 10.5962/bhl.part.80331.
- 11- Navajas, M., Lagnel, J., Gutierrez, J. and Boursot, P. 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite Tetranychus urticae contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity*, 80(6): 742-752.
- 12- Paraense, WL., Deslandes, N. 1957. Biomphalaria boissyi, synonyme probable de Taphius nigricans. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, 32(5/6): 482-90.
- 13-Polis. 1990. The Biology of Scorpion. 1st edition, Stanford University Press, Stanford, California, PP: 587.
- 14- Quijano-Ravell, AF., de Armas, LF., Francke, OF. And Ponce-Saavedra, J. 2019. A new species of the genus Centruroides Marx (Scorpiones, Buthidae) from western Michoacán State, México using molecular and morphological evidence. *ZooKeys* 859: 31-48. <https://doi.org/10.3897/zookeys.859.33069>
- 15- Radmanesh, M. 1998. Cutaneous manifestations of the Hemiscorpius lepturus sting: a clinical study. *International journal of dermatology*, 37 (7): 500-507.
- 16- Reiss, Errol., Tanaka, K., Broker, G., Chazalet, V., Coleman, David., Debeaupuis, Jean-Paul. and Hanazawa, R. 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 3: 249-257.
- 17- Shahbazzadeh, D., Amirkhani, A., Djadid, ND., Bigdeli, S., Akbari, A., Ahari, H, and et al. 2009. Epidemiological and clinical survey of scorpionism in Khuzeestan province, Iran (2003). *Toxicon*, 53(4): 454-459.
- 18- Soleglad, ME., Fet, V. and Kovarik, F. 2005. The systematic position of the scorpion genera Heteroscorpion Birula, 1903 and Urodacus Peters, 1861 (Scorpiones: Scorpionoidea). *Euscorpius*, 20: 1-38.
- 19- 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.
- 20- Vazirianzadeh, B., Farhadpour, F., Hosseinzadeh, M., Zarean, M. and Moravvej, S. An epidemiological and clinical study on scorpionism in hospitalized children in Khuzeestan, Iran. *J Arthropod Borne Dis* 2012,6 :62 9.
- 21- Zhang, X.-S., Liu, Gao-Ming., Zhang, De-Xing. and Shi, Cheng-Min. 2019. Genetic analysis and ecological niche modeling delimit species boundary of the Przewalski's scorpion (Scorpiones: Buthidae) in arid Asian inland. *BioRxiv*: 652024.

