دانشکده علوم پایه
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی-گرایش بیوسیستماتیک جانوری

عنوان:

بررسی فیلوژنی جنس *Odontobuthus* (Vachon, 1950) با استفاده از رویکردهای مولکولی و ریخت‌شناسی (Scorpiones: Buthidae).

اساتید راهنما:
دکتر امید میرشمسی کاخکی
دکتر شاهرخ نویدپور

استاد مشاور:
دکتر منصور علی آبادیان

نگارنده:
سارا ازغدی

شهریور ۹۱

ای نام تو بهترین سرآغاز　　چشمی به نیاز ما بیانداز

با دلی امیدوار، سجاده نیازم را به سوی تو پهن می کنم و تو را از اعماق وجودم می خوانم تا صدایم را بشنوی و دست نیازم را بگیری و مرا یاری کنی، **ای خدای بی همتا...**

تقدیم به ساحت مقدس ثامن الحجج؛

او که در جوار حضرتش قلبم آرام می گیرد، روحم لطیف می گردد و اندیشه‌ام زلال. او که هر چه داریم از نعمت برکت همجواری با اوست.

تقدیم به ساحت مقدس امام عصر؛

که برای آمدنش، لحظه ها نیز لحظه شماری می کنند و برای دیدنش، دیده ها بی تابی.

تقدیم به پدر و مادر عزیزم؛

که وجودشان برایم همه عشق است و وجودم برایشان همه رنج.

توانشان رفت تا به توانایی رسیدم و رویشان سپیدی گرفت تا روسپید بمانم.

آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان، سرمایه جاودانه زندگانی من است.

در برابر وجود گرامی تان زانوی ادب بر زمین می نهم و با دلی مالامال از عشق و محبت بر دستانتان بوسه می زنم.

تقدیم به پدر و مادر همسر عزیزم؛

عزیزانی که دعای خیرشان همواره بدرقه راهم بوده و با دلگرمی های بی دریغشان مرا در پیمودن این راه یاری نمودند. سرو وجودتان همیشه سبز و استوار باد.

تقدیم به همسر عزیز و مهربانم؛

او که در کنارش معنی صبر را آموختم و دانستم که گام برداشتن با توکل به خدای مهربان، دشوارترین کارها را آسان می نماید.

تقدیم به خواهران عزیزم؛

آنان که حیاتم با بودنشان، از لحظات شیرین و خاطرات روشن سرشار است.

بارالها!

آنچه مصلحت من می بینی، به قدرت خود برآور

و از آموختن علمی که به کار نیاید، محرومم ساز

اکنون که به لطف پروردگار مهربان تدوین این مجموعه به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم که از تمام بزرگوارانی که طی این دوره مرا مورد لطف و راهنمایی خود قرار داده اند، سپاسگزاری و قدردانی نمایم.

صمیمانه ترین تشکرها و قدردانی ها را تقدیم می دارم به محضر استادان ارجمند و بزرگوارم جناب آقای دکتر میر شمسی کاخکی و جناب آقای دکتر نوید پور که از خرمن علمشان، خوشه ها چیدم و از کردار نیکشان، نکته ها آموختم. تدوین این مجموعه مرهون راهنمایی ها، نکته سنجی ها و زحمات فراوان ایشان می باشد.

با سپاس فراوان از استاد ارجمندم، جناب آقای دکتر علی آبادیان که گام های کوچکم در راستای قدم های بزرگ ایشان است و چراغ روشنشان، روشنی بخش تاریکی نادانسته هایم.

سپاس از استادان فرزانه، جناب آقای دکتر حسینی و سرکار خانم دکتر قاسم زاده که قبول زحمت نموده و داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند.

از مساعدت ها و همکاری تمامی مسئولین و کارکنان محترم دانشکده علوم به ویژه آقای نخعی کمال تشکر را دارم.

با سپاس از کمک های بی شائبه دوستان مهربان و دلسوزم سرکار خانم ها بهنوش مودی، سمیه پورابراهیمی، رویا کاشفی، ملیحه موسوی نژاد، مهرناز توسلی، مریم اله دادی، نوشین نورانی، ملاحت دیانت و نیلوفر اعلایی و جناب آقای احمد محمودی، که شرمنده مهربانی ها و سپاسگزار همکاری های بی دریغشان هستم.

سارا ازغدی

فهرست

عنوان مطالب **شماره صفحه**

فصل اول: کلیات

۱-۱ مقدمه ۲
۱-۲ اهمیت عقرب‌ها ۴
۱-۳ معرفی جایگاه سیستماتیک عقرب‌ها ۵
۱-۳-۱ مروری بر مطالعات انجام گرفته و رده بندی عقرب‌ها در جهان ۶
۱-۳-۲ مروری بر مطالعات انجام شده و رده بندی عقرب‌ها در ایران ۹
۱– ۴ ساختار کلی بدن عقرب‌ها ۱۳
۱-۴-۱ پروزوما ۱۶
۱-۴-۲ مزوزوما ۱۹
۱-۴-۳ متازوما ۲۲
۱-۵ اکولوژی عقرب‌ها ۲۳
۱-۵-۱ پراکندگی جغرافیایی عقرب‌ها ۲۳
۱-۵-۲ زیستگاه‌های عقرب‌ها ۲۵
۱-۵-۳ لانه سازی و حفر لانه در عقرب‌ها ۲۷
۱-۶ آرایه شناسی خانواده Buthidae ۲۹
۱-۶-۱ ویژگی‌های ریخت شناختی خانواده Buthidae ۳۰
۱-۶-۱-۱ کلیسر ۳۰
۱-۶-۱-۲ الگوی تریکوبتری ۳۰
۱-۶-۱-۳ ناحیه Coxosternal ۳۰
۱-۶-۱-۴ خارهای پای حرکتی ۳۰
۱-۶-۱-۵ غده سمی و تلسون ۳۱
۱-۶-۱-۶ سیستم تولید مثلی جنس نر ۳۱
۱-۶-۱-۷ سیستم تولید مثلی جنس ماده ۳۱
۱-۶-۱-۸ تکوین ۳۱
۱-۷ تاریخچه و تاکسونومی جنس *Odontobuthus* Vachon, 1950 ..... ۳۲
۱-۷-۱ ویژگی‌های ریخت شناختی ۳۲
۱-۷-۲ تاریخچه جنس *Odontobuthus* Vachon, 1950 ..... ۳۳
۱-۷-۳ کلید شناسایی گونه‌های جنس *Odontobuthus* بر اساس Lowe, 2010 ..... ۳۶

۱- ۸ کاربرد مطالعات مولکولی در بیوسیستماتیک عقرب‌ها ۳۷
۱-۸-۱ ژنوم میتوکندری ۳۷
۱-۸-۲ ژن *COXI* ۳۸
۱-۸-۳ ژن *16S rRNA* ۳۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مقدمه ۴۰
۲-۲ مطالعات ریخت شناختی و ریخت سنجی ۴۵
۲-۲-۱ بررسی‌های آماری تک متغیره و چند متغیره ۴۵
۲-۳ مطالعات مولکولی ۴۹
۲-۳-۱ استخراج DNA ۵۰
۲-۳-۲ سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراجی ۵۱
۲-۳-۳ PCR یا واکنش زنجیره‌ای پلی مراز ۵۲
۲-۳-۳-۱ برنامه انجام PCR ۵۳
۲-۴ تحلیل داده‌های مولکولی ۵۴
۲-۴-۱ تعیین مدل مناسب تکامل نوکلئوتیدی ۵۴
۲-۴-۲ تحلیل میانبرترین درخت (Maximum Parsimony) ۵۴
۲-۴-۳ تحلیل محتمل‌ترین درخت (Maximum likelihood) ۵۵
۲-۴-۴ تحلیل بیزین (Bayesian) ۵۶
۲-۴-۵ روش شبکه هاپلوتایپی ۵۶

فصل سوم: نتایج

۳-۱ مقدمه ۵۸
۳-۲ نتایج ریخت شناسی ۶۱
۳-۲- ۱ریخت شناسی گونه *O. doriae* (Thorell, 1876) ۶۱
۳-۲-۲ ریخت شناسی گونه *O. bidentatus* Lourenço and Pézier, 2002 ۷۱
۳-۲-۳ ریخت شناسی گونه *O.* sp$_1$. ۷۷
۳-۲-۴ ریخت شناسی گونه *O.* sp$_2$. ۸۳
۳-۲-۵ ریخت شناسی گونه *O.* sp$_3$. ۸۹
۳-۳ بررسی صفات شاخص ۹۵
۳-۴ نتایج تحلیل ریخت سنجی جنس *Odontobuthus* ۱۰۰
۳-۴-۱ تحلیل‌های تک متغیره ۱۰۰

۳-۴-۲ نتایج تحلیل‌های چند متغیره ۱۰۵
۳-۴-۲-۱ تحلیل مولفه‌های اصلی (Principal components analysis) ۱۰۵
۳-۴-۲-۲ تحلیل ممیزی مرحله به مرحله (Stepwise canonical discriminant analysis) ۱۰۹
۳-۴-۲-۳ تحلیل خوشه بندی (Cluster analysis) ۱۱۲
۳-۵ نتایج مولکولی ۱۱۳
۳-۵-۱ بررسی فیلوژنتیک جنس *Odontobuthus* بر اساس داده‌های توالی ژن *COXI* ۱۱۳
۳-۵-۱-۱ مشخصات توالی‌ها و میزان واگرایی ۱۱۳
۳-۵-۱-۲ تحلیل میانبرترین درخت (Maximum Parsimony) ۱۱۵
۳-۵-۱-۳ تحلیل محتمل‌ترین درخت (Maximum likelihood) ۱۱۷
۳-۵-۱-۴ تحلیل بیزین (Bayesian) ۱۱۹
۳-۵-۱-۵ شبکه هاپلوتایپی (haplotype network) ۱۲۰
۳-۵-۲ نتایج بررسی فیلوژنتیک جنس *Odontobuthus* بر اساس داده‌های توالی ژن *16S* ۱۲۲
۳-۵-۲-۱ مشخصات توالی‌ها و میزان واگرایی ۱۲۲
۳-۵-۲-۲ تحلیل میانبرترین درخت (Maximum Parsimony) ۱۲۴
۳-۵-۲-۳ تحلیل محتمل‌ترین درخت (Maximum likelihood) ۱۲۶
۳-۵-۲-۴ تحلیل بیزین (Bayesian) ۱۲۸
۳-۵-۲-۵ شبکه هاپلوتایپی (haplotype network) ۱۲۹

فصل چهارم: بحث

۴-۱ مقدمه ۱۳۰
۴-۲ بررسی‌های ریخت شناختی و ریخت سنجی جنس *Odontobuthus* ۱۳۱
۴-۳ فیلوژنی جنس *Odontobuthus* بر اساس توالی‌های *COX1* و *16S* ۱۳۳
۴-۴ نتیجه گیری ۱۳۹
۴-۵ پیشنهادات ۱۳۹

فصل پنجم: منابع

منابع ۱۴۰

فهرست جداول

جدول ۱-۱. تعداد تاکسون‌های بالای جنس که در طی رده بندی‌های ۲۵ سال گذشته عقرب‌های امروزی پیشنهاد شده است (Prendini, 2005) ۹

جدول ۱-۲. توزیع جغرافیایی عقرب‌های ایران (Mirshamsi *et al.*, 2011)..... ۱۲

جدول ۲-۱. محل جمع آوری نمونه‌ها، طول و عرض جغرافیایی مناطق نمونه برداری و تعداد نمونه‌ها..... ۴۴

جدول ۲-۲. فهرست نمونه های بافتی مورد مطالعه در بررسی‌های مولکولی..... ۴۹

جدول ۲-۳. پرایمرهای مورد استفاده در بررسی‌های مولکولی..... ۵۲

جدول ۲-۴. رژیم حرارتی واکنش PCR برای ژن *COXI*..... ۵۳

جدول ۲-۵. رژیم حرارتی واکنش PCR برای ژن *16S*..... ۵۳

جدول ۳-۱. نمونه‌های *Odontobuthus* و برون گروه مورد استفاده در مطالعه. اعداد معرف موقعیت جغرافیایی نمونه‌ها در شکل ۳-۱ هستند..... ۵۹

جدول ۳-۲. آماره‌های توصیفی (میانگین ± خطای معیار) و نتیجه تحلیل واریانس یک طرفه برای سه گونه *O. bidentatus*, *O. doriae* و *O.* sp_1. تعداد نمونه‌های هر گروه در داخل پرانتز ارایه شده‌اند..... ۱۰۲

جدول ۳-۳. آماره‌های توصیفی (میانگین ± خطای معیار) و نتیجه تحلیل واریانس یک طرفه برای ۱۸ نسبت مورفومتریک در سه گونه *O. bidentatus*, *O. doriae* و *O.* sp_1. تعداد نمونه‌های هر گروه در داخل پرانتز ارایه شده‌اند..... ۱۰۴

جدول ۳-۴. مقادیر چهار مولفه اول، مقادیر ویژه و درصد واریانس بیان شده به وسیله هر مولفه در تحلیل مولفه‌های اصلی (PCA) بین پنج گروه موردبررسی..... ۱۰۷

جدول ۳-۵. خلاصه تحلیل ممیزی گام به گام در مقایسه بین سه گونه *O. bidentatus*, *O. doriae* و *O.* sp_1. ..... ۱۱۰

جدول ۳-۶. میانگین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای در ژن میتوکندری *COXI* برای پنج گونه مورد بررسی..... ۱۱۴

جدول۳-۷. تعداد توالی‌های نوکلئوتیدی، تعداد نوکلئوتیدها، تعدادهاپلوتایپ‌ها، میانگین تفاوت نوکلئوتیدی، تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتایپی و تعداد سایت‌های جدا کننده (پلی مورفیک) درون گونه‌ای در پنج گونه مورد بررسی جنس *Odontobuthus*..... ۱۱۵

جدول ۳-۸. فرکانس بازی در توالی‌های ژن میتوکندری *COX1* مربوط به ۱۹توالی مورد مطالعه..... ۱۱۷

جدول ۳-۹. میانگین فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای در ژن میتوکندری *16S* برای پنج گونه مورد بررسی..... ۱۲۳

جدول ۳-۱۰. تعداد توالی‌های نوکلئوتیدی، تعداد نوکلئوتیدها، تعداد هاپلوتایپ‌ها، میانگین تفاوت نوکلئوتیدی، تنوع نوکلئوتیدی، تنوع هاپلوتایپی و تعداد سایت‌های جدا کننده (پلی مورفیک) درون گونه ای در پنج گونه موردبررسی..... ۱۲۴

جدول ۳-۱۱. فراوانی بازی در توالی های *16S* مربوط به ۱۴ توالی مورد مطالعه..... ۱۲۶

فهرست اشکال

شکل ۱-۱. سطح پشتی بدن عقرب *O. doriae* و اجزاء بدن آن (تصویر از نگارنده)..... ۱۵

شکل ۱-۲. سطح شکمی عقرب *O. doriae* و اجزاء بدن آن (تصویر از نگارنده)..... ۱۵

شکل ۱-۳. نمایی از کلیسرها در عقرب *O. doriae* (تصویر از نگارنده) ۱۷

شکل ۱-۴. نمایی از شانه‌ها در عقرب *O. doriae* (تصویر از نگارنده)..... ۲۱

شکل ۱-۵. کمان مخرجی در عقرب (Hjelle, 1990)..... ۲۳

شکل ۱-۶. محدوده پراکندگی جغرافیایی عقرب‌ها در جهان (Lourenço, 2001) ۲۴

شکل ۱-۷. توزیع جغرافیایی گونه‌های جنس *Odontobuthus* در فلات ایران (Lowe, 2010)..... ۳۵

شکل ۲-۱. خراسان رضوی، گناباد، روستای مرغش، محل زندگی عقرب *O. sp.* (تصویر از نگارنده)..... ۴۱

شکل ۲-۲. حفاری لانه عقرب *O. sp.*، خراسان رضوی، گناباد، روستای مرغش (تصویر از نگارنده)..... ۴۲

شکل ۲-۳. حفاری لانه عقرب *O. sp.*، خراسان رضوی، گناباد، روستای مرغش (تصویر از نگارنده)..... ۴۲

شکل ۲-۴. موقعیت جغرافیایی محل‌های جمع آوری *Odontobuthus*. (●) نقاط نمونه برداری در ایران؛ (■) موقعیت جغرافیایی نمونه برون گروه مورد استفاده در تحلیل فیلوژنتیک داده‌های مولکولی را نشان می‌دهد؛ اعداد معرف کد نقشه در جدول ۲-۱ می‌باشند..... ۴۳

شکل ۲-۵. صفات ریخت سنجی مورد استفاده در تحلیل آماری گونه‌های جنس *Odontobuthus* (اقتباس از Lamoral, 1979)..... ۴۸

شکل ۲-۶. نمودار جذب DNA در دستگاه نانودراپ..... ۵۱

شکل ۳-۱. نقشه پراکندگی گونه‌های مورد مطالعه (تصویر از نگارنده)..... ۶۰

شکل ۳-۲. نمای پشتی (a) و شکمی (b) *O. doriae* (۱۵ کیلومتری جنوب شرق تهران)، مقیاس: ۱۰ میلی متر..... ۶۵

شکل ۳-۳. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه ماده *O. doriae* (۱۵ کیلومتری جنوب شرق تهران)، مقیاس: ۱۰ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس)..... ۶۶

شکل ۳-۴. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه نر *O. doriae* (۱۵ کیلومتری جنوب شرق تهران)، مقیاس: ۱۰ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس)..... ۶۶

شکل ۳-۵. ریخت شناسی خارجی *O. doriae*. ۱) کاریناسیون پروزوما؛ ۲) نمایی از شانه‌ها و استرنوم؛ ۳) نمای شکمی بند سوم و چهارم متازوما؛ ۴) نمای جانبی بند دوم و سوم متازوما؛ ۵) نمای شکمی بند دوم و سوم متازوما؛ ۶) نمای جانبی تلسون و بند پنجم متازوما؛ ۷) نمای شکمی تلسون و بند پنجم متازوما. مقیاس: ۱ و۲: ۲/۲ میلی متر، ۳، ۴ و ۵: ۲/۶ میلی متر، ۶ و ۷: ۲/۷۸ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس)..... ۶۷

شکل ۳-۵ (ادامه). ریخت شناسی خارجی *O. doriae*. ۸) نمای پشتی گیره پدی‌پالپ؛ ۹) نمای خارجی گیره پدی‌پالپ؛ ۱۰) نمای شکمی گیره پدی‌پالپ؛ ۱۱) نمای پشتی فمور؛ ۱۲) نمای پشتی پاتلا. مقیاس: ۸، ۹ و ۱۰: ۲/۸۶ میلی متر، ۱۱ و ۱۲: ۱/۸۴ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس)..... ۶۸

شکل ۳-۶. a) نمای شکمی ؛ b) نمای خارجی گیره پدی پالپ..... ۶۹

شکل ۳-۷. a) نمای پشتی پاتلا؛ b) نمای خارجی پاتلا؛ c) نمای پشتی فمور ۶۹
شکل۳-۸. الگوی آرایش و تعدادتریکوبتری‌های سطوح مختلف هریک از بندهای پدی پالپ. اعداد بالای شکل نشان دهنده تعداد تریکوبتری‌ها در هر سطح بند می‌باشند؛ نام گذاری تریکوبتری‌ها بر اساس Vachon (1974) ارایه شده‌اند ۷۰
شکل ۳-۹. نمای پشتی (a) و شکمی (b) گونه *O. bidentatus* (خوزستان، امیدیه)، مقیاس: ۱۰ میلی متر ۷۴
شکل ۳-۱۰. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه ماده *O. bidentatus* (خوزستان، امیدیه)، مقیاس: ۱۰ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۷۵
شکل ۳-۱۱. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه نر *O. bidentatus* (خوزستان، امیدیه)، مقیاس: ۲۰ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس ۷۵
شکل ۳-۱۲. ریخت شناسی خارجی *O. bidentatus*. ۱) کاریناسیون پروزوما؛ ۲) نمایی از شانه‌ها؛ ۳) نمای شکمی بند سوم و چهارم متازوما؛ ۴) نمای جانبی بند دوم و سوم متازوما؛ ۵) نمای شکمی بند دوم و سوم متازوما؛ ۶) نمای جانبی تلسون و بند پنجم متازوما؛ ۷) نمای شکمی تلسون و بند پنجم متازوما. مقیاس: ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵: ۳/۳۳ میلی متر، ۶ و ۷: ۳/۶۱ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۷۶
شکل ۳-۱۳. نمای پشتی (a) و شکمی (b) نمونه *O.* sp_1. (گناباد، کاخک)، مقیاس: ۸ میلی متر ۸۰
شکل ۳-۱۴. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه ماده *O.* sp_1. (گناباد، کاخک)، مقیاس: ۹ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۸۱
شکل ۳-۱۵. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه نر *O.* sp_1. (گناباد، کاخک)، مقیاس: ۸ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۸۱
شکل ۳-۱۶. ریخت شناسی خارجی *O.* sp_1. ۱) کاریناسیون پروزوما؛ ۲) نمایی از شانه‌ها؛ ۳) نمای شکمی بند سوم و چهارم متازوما؛ ۴) نمای جانبی بند دوم و سوم متازوما؛ ۵) نمای شکمی بند دوم و سوم متازوما؛ ۶) نمای جانبی تلسون و بند پنجم متازوما؛ ۷) نمای شکمی تلسون و بند پنجم متازوما. مقیاس: ۱ و ۲: ۲ میلی متر، ۳، ۴ و ۵: ۲/۱۲ میلی متر، ۶ و ۷: ۲/۴۳ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۸۲
شکل ۳-۱۷. نمای پشتی (a) و شکمی (b) نمونه *O.* sp_2. (کرمان، جاده باغین- بردسیر)، مقیاس: ۷ میلی متر ۸۶
شکل ۳-۱۸. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه ماده *O.* sp_2. (کرمان، جاده باغین- بردسیر)، مقیاس: ۷ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۸۷
شکل ۳-۱۹. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه نر *O.* sp_2. (کرمان، جاده سیرجان- کرمان)، مقیاس: ۷ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۸۷
شکل ۳-۲۰. ریخت شناسی خارجی *O.* sp_2. ۱) کاریناسیون پروزوما؛ ۲) نمایی از شانه‌ها؛ ۳) نمای شکمی بند سوم و چهارم متازوما؛ ۴) نمای جانبی بند دوم و سوم متازوما؛ ۵) نمای شکمی بند دوم و سوم متازوما؛ ۶) نمای جانبی تلسون و بند پنجم متازوما؛ ۷) نمای شکمی تلسون و بند پنجم متازوما. مقیاس: ۱ و ۲: ۱/۸۷ میلی متر، ۳، ۴ و ۵: ۲/۳۳ میلی متر، ۶ و ۷: ۲/۸۵ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۸۸
شکل ۳-۲۱. نمای پشتی (a) و شکمی (b) نمونه *O.* sp_3. (هرمزگان، جنوب شرق بندو)، مقیاس: ۸ میلی متر ۹۲

شکل ۳-۲۲. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه ماده .*O*. sp_3 (هرمزگان، جنوب شرق بندو)، مقیاس: ۸ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۹۳
شکل ۳-۲۳. تصویر سطح پشتی (a) و شکمی (b) نمونه نر .*O*. sp_3 (هرمزگان، روستای بهده)، مقیاس: ۸ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۹۳
شکل ۳-۲۴. ریخت شناسی خارجی .*O*. sp_3 ۱) کاریناسیون پروزوما؛ ۲) نمایی از شانه‌ها؛ ۳) نمای شکمی بند سوم و چهارم متازوما؛ ۴) نمای جانبی بند دوم و سوم متازوما؛ ۵) نمای شکمی بند دوم سوم متازوما؛ ۶) نمای جانبی تلسون و بند پنجم متازوما؛ ۷) نمای شکمی تلسون و بند پنجم متازوما. مقیاس: ۱ و۲: ۲ میلی متر، ۳، ۴ و ۵: ۲/۸ میلی متر، ۶ و ۷: ۲/۵ میلی متر (عکس برداری به روش اپی فلورسنس) ۹۴
شکل ۳-۲۵ . نمای جانبی تلسون و بند پنجم متازوما در گونه‌های مورد بررسی ۹۶
شکل ۳-۲۶ . نمای شکمی تلسون و بند پنجم متازوما در گونه‌های مورد بررسی ۹۷
شکل ۳-۲۷. نمای جانبی بند دوم و سوم متازوما در گونه‌های مورد بررسی ۹۸
شکل ۳-۲۸. نمای شکمی بند سوم و چهارم متازوما در گونه‌های مورد بررسی ۹۹
شکل ۳-۲۹. نمودارهای میله‌ای خطای معیار (Error bar) مربوط به چهار صفت مورفومتریک که بیشترین نقش را در جدایی گونه‌های *O. bidentatus, O. doriae* و .*O*. sp_1 دارند ۱۰۳
شکل ۳-۳۰. نمودارهای میله‌ای خطای معیار مربوط به دو نسبت مورفومتریک که بیشترین نقش را در جدایی سه گونه .*O. bidentatus, doriae* و .*O*. sp_1 بر اساس نسبت‌های مورفومتریک دارند ۱۰۵
۳-۳۱. نمودار پراکنش حاصل از مولفه‌های ۱ و ۲ برای ۲۶ صفت مورفومتریک معنی دار در بررسی پنج گونه *O. doriae*, *O. bidentatus*, *O*. sp_1., *O*. sp_2., *O*. sp_3. و .*O*. sp_3 ..... ۱۰۸
شکل ۳-۳۲. نمودار پراکنش حاصل از تحلیل مولفه‌های اصلی (مولفه‌های ۱ و ۲) برای هشت نسبت مورفومتریک معنی دار در بررسی سه گونه *O. bidentatus, O. doriae* و .*O*. sp_1 ..... ۱۰۸
شکل ۳-۳۳. نمودار پراکنش حاصل از تحلیل مولفه‌های اصلی (مولفه‌های ۱ و ۳) برای هشت نسبت مورفومتریک معنی دار در بررسی سه گونه *O. bidentatus, O. doriae* و .*O*. sp_1 ..... ۱۰۹
شکل۳-۳۴. نمودار پراکنش مقادیر کانونی در تحلیل ممیزی سه گونه مورد بررسی برای ۲۶ صفت مورفومتریک معنی دار ... ۱۱۱
شکل ۳-۳۵. نمودار پراکنش مقادیر کانونی در تحلیل ممیزی سه گونه مورد بررسی برای هشت نسبت مورفومتریک معنی دار ۱۱۱
شکل ۳-۳۶. فنوگرام بدست آمده از فاصله مربع اقلیدسی به روش UPGMA، بیانگر روابط ریخت شناسی بین سه گونه *O. bidentatus, O. doriae* و .*O*. sp_1 ..... ۱۱۲
شکل ۳-۳۷. فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای (Kimura-2-Parameter) بر اساس ژن میتوکندری*COXI* برای گونه‌های جنس *Odontobuthus*. ستون‌های سیاه رنگ نشان دهنده فاصله بین گونه‌ای و ستون‌های سفید رنگ نشان دهنده فاصله درون گونه‌ای می‌باشند ۱۱۴
شکل ۳-۳۸. درخت اجماع MP (50% Majority-rule Consensus) بر اساس ژن میتوکندری *COX1* نشان دهنده روابط فیلوژنتیک بین گونه‌های جنس *Odontobuthus* ۱۱۶

شکل ۳-۳۹. درخت اجماع ML (50% Majority-rule Consensus) بر اساس ژن میتوکندری *COX1* و بر اساس مدل GTR+G نشان دهنده روابط فیلوژنتیک بین گونه‌های جنس *Odontobuthus* همراه با آزمون تاییدی بوت استرپ ۵۰۰ مرتبه تکرار است..... ۱۱۸
شکل ۳-۴۰. درخت حاصل از تحلیل بیزین بر اساس ژن میتوکندریایی *COXI*، روابط فیلوژنتیک بین گونه‌های جنس *Odontobuthus* را نشان می‌دهد..... ۱۱۹
شکل ۳-۴۱. شبکه هاپلوتایپی گونه‌های جنس *Odontobuthus* بر اساس ژن میتوکندری *COXI*. شماره داخل هر هاپلوتایپ، شماره موزه‌ای نمونه‌ها می‌باشند. دایره‌های کوچک بین هاپلوتایپ‌ها نشان‌دهنده موتاسیون می‌باشند..... ۱۲۱
شکل ۳-۴۲. فاصله ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای (Kimura-2-Parameter) بر اساس ژن میتوکندری *16S* برای گونه‌های جنس *Odontobuthus*. ستون‌های سیاه رنگ نشان دهنده فاصله بین گونه‌ای و ستون‌های سفید رنگ نشان دهنده فاصله درون گونه‌ای می‌باشند..... ۱۲۳
شکل ۳-۴۳. درخت اجماع MP (50% Majority-rule Consensus) بر اساس ژن میتوکندری *16S* نشان دهنده روابط فیلوژنتیک بین گونه‌های جنس *Odontobuthus*..... ۱۲۵
شکل ۳-۴۴. درخت اجماع ML (50% Majority-rule Consensus) بر اساس ژن میتوکندری *16S* و بر اساس مدل GTR+G نشان دهنده روابط فیلوژنتیک بین پنج گونه از جنس *Odontobuthus* همراه با آزمون تاییدی بوت استرپ ۵۰۰ مرتبه تکرار است..... ۱۲۷
شکل ۳-۴۵. درخت حاصل از تحلیل بیزین بر اساس ژن میتوکندریایی *16S* روابط فیلوژنتیک بین پنج گونه از جنس *Odontobuthus* را نشان می‌دهد..... ۱۲۸
شکل ۳-۴۶. شبکه هاپلوتایپی گونه‌های جنس *Odontobuthus* بر اساس ژن میتوکندری *16S*. شماره داخل هر هاپلوتایپ، شماره موزه‌ای نمونه‌ها می‌باشند..... ۱۲۹
شکل ۴-۱. روابط بین گونه‌های جنس *Odontobuthus* بر اساس تحلیل بیزین حاصل از ترکیب دو ژن *COXI* و *16S* به همراه مقادیر بوت استرپ تحلیل‌های بیزین، میانبرترین درخت و محتمل‌ترین درخت که به ترتیب در هر گره نشان داده شده است..... ۱۳۴
شکل ۴-۲. وضعیت تکتونیک و چگونگی کوهزایی در اطراف فلات ایران. فرآیندهای تکتونیک که در طرح فوق نشان داده شده‌اند امروزه همچنان ادامه دارند (اقتباس از Macey *et al*., 1998 با اندکی تغییرات)..... ۱۳۷

چکیده

جنس *Odontobuthus* از جمله عقرب‌های حفاری است که گونه‌های آن در محدوده پنج کشور ایران، هند، پاکستان، عراق و عمان دارای پراکندگی می‌باشند. حضور این جنس در ایران به وسیله حداقل دو گونه *O. doriae* و *O. bidentatus* شناخته می‌شود. بر اساس حضور جمعیت‌های نامشخص از این جنس (*O.* sp.) در نواحی شرقی ایران (استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی و سیستان و بلوچستان) احتمال تایید حضور رکوردی جدید برای فون عقرب‌های ایران یا شناسایی گونه‌ای جدید برای این جنس در نواحی شرقی ایران وجود دارد. در این مطالعه، بررسی نمونه‌های سه گونه *O.* sp. جمع آوری شده از استان خراسان رضوی و جنوبی و نمونه‌های مربوط به گونه‌های *O. doriae* و *O. bidentatus* بر اساس مطالعات ریخت شناسی، ریخت سنجی (روش‌های آماری تک و چند متغیره) و بررسی‌های مولکولی با استفاده از توالی‌های دو ژن Cytochrome C oxidase, subunit I (*COX1*) و 16S ribosomal RNA (*16S rRNA*) انجام شد. نتایج حاصل از بررسی‌های ریخت شناسی و تحلیل‌های آماری روی ۲۷ متغیر ریخت سنجی، جدایی کامل نمونه‌های مربوط به گونه *O.* sp. را از دو گونه تایید شده *O. doriae* و *O. bidentatus* نشان می‌دهند. همچنین داده‌های مولکولی حاصل از تحلیل‌های میانبرترین درخت (Maximum Parsimony)، محتمل‌ترین درخت (Maximum likelihood)، درخت بیزین (Bayesian) و شبکه هاپلوتایپی برای ژن‌های میتوکندریایی *COXI* با ۶۷۱ جفت نوکلئوتید و ژن *16S* با ۳۶۰ جفت نوکلئوتید نیز جدایی کامل نمونه‌های گونه *O.* sp. از دو گونه *O. doriae* و *O. bidentatus* را تاکید می‌کنند.

کلمات کلیدی: عقرب، *Odontobuthus*، فون، بیوسیستماتیک، DNA میتوکندریایی.

فصل اول

کلیات

۱–۱ مقدمه

علی رغم وجود افکار بسیار منفی نسبت به عقرب‌ها در بین اغلب مردم، نمی‌توان انکار کرد که این بندپایان، مخلوقاتی بسیار جذاب و با ویژگی‌هایی غیرمعمول و منحصر به فرد هستند. این جانوران بر اساس برخی صفات مانند طول عمر زیاد، سن بلوغ، تکامل جنینی زنده‌زا، مراقبت‌های والدینی و سرعت آهسته سوخت و ساز بدن از سایر بندپایان متمایز بوده و شباهت زیادی به مهره‌داران طویل العمر نشان می‌دهند (Mirshamsi *et al*., 2010). به همین دلیل محققین مختلف به اهمیت مطالعه این راسته به عنوان موجوداتی مدل تاکید کرده‌اند. بر طبق آخرین رده‌بندی ارایه شده، این راسته دارای دو زیر راسته، شش فوق خانواده، ۱۳ خانواده، ۱۷۰ جنس و بیش از ۱۵۰۰ گونه می‌باشد (Soleglad *et al*., 2005). این جانوران را در تمام نواحی کره زمین به جز قطب جنوب می‌توان یافت، اما بیشترین میزان تنوع گونه‌ای و پراکندگی این راسته مربوط به بیابان‌ها و زیستگاه‌های نیمه‌بیابانی است، به همین دلیل فون عقرب‌های این نواحی موضوع بسیاری از مطالعات مربوط به این راسته در اکثر کشورها و از جمله ایران است. بر اساس آخرین مطالعات انجام شده فون عقرب‌های ایران در برگیرنده ۱۸ جنس و ۵۱ گونه می‌باشد (Mirshamsi *et al*., 2011). مقایسه این تعداد با فون عقرب‌های سایر نواحی جغرافیایی همجوار، نشان دهنده تنوع گونه‌ای بالای این راسته در ایران نسبت به این نواحی است. علی رغم این تنوع گونه‌ای بالا، فون و جغرافیای جانوری عقرب‌ها در ایران به طور کامل مطالعه نشده است. فقدان مطالعات سیستماتیک

روی زیای عقرب‌ها در بیشتر مناطق شرقی، مرکزی و جنوبی ایران، باعث نامشخص ماندن وضعیت آرایه شناختی بسیاری از جنس‌های توزیع یافته در این نواحی نظیر *Odontobuthus* شده است. در نتیجه بررسی و بازنگری‌های آرایه شناختی دقیق روی این جنس‌ها در این مناطق موردنیاز می‌باشد.

در این مطالعه گونه‌های جنس *Odontobuthus* با رویکرد بیوسیستماتیک مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند. این جنس دارای چهار گونه *O. bidentatus, O. doriae, O. odonturus* و *O. brevidigitus* است که گونه‌های این جنس دارای الگوی توزیع جغرافیایی ناهم‌جا (آلوپاتریک) یا هم‌جوار (پاراپاتریک) در محدوده پنج کشور ایران، هند، پاکستان، عراق و عمان هستند (Lowe, 2010; Lourenço and Pézier, 2002). این جنس در ایران به وسیله حداقل دو گونه *O. doriae* (از ارتفاعات بالای بخش‌های شمال غربی و مرکزی ایران) و *O. bidentatus* (از نواحی غربی و جنوب غربی ایران) شناخته می‌شود. همچنین حضور این جنس در نواحی شرقی و جنوبی (Lowe, 2010) ایران بر اساس گزارش‌های پراکنده اثبات شده است، اما در مورد وضعیت گونه‌ای آن‌ها تاکنون اظهار نظر قطعی نشده است. این جمعیت‌های نامشخص (*O.* sp.) در استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی و سیستان و بلوچستان پراکنده شده‌اند و با توجه به اینکه پراکندگی جغرافیایی جمعیت‌های مذکور بین گزارش‌های تایید شده *O. odonturus* (هند و پاکستان) و *O. doriae* (مرکز ایران) واقع شده است، احتمال تایید حضور گونه *O. odonturus* یا شناسایی گونه‌ای جدید برای این جنس در نواحی شرقی ایران وجود دارد.

بر همین اساس هدف اصلی این مطالعه بررسی نمونه‌های سه گونه *O.* sp. جمع آوری شده از استان‌های خراسان رضوی و خراسان جنوبی و نمونه‌های مربوط به گونه‌های *O. doriae* و *O. bidentatus* بر اساس بررسی‌های ریخت شناسی، ریخت سنجی (روش‌های آماری تک و چند متغیره) و بررسی‌های مولکولی با استفاده از توالی‌های دو ژن Cytochrome C oxidase, subunit I (*COX1*) و 16S ribosomal RNA (*16S rRNA*) می‌باشد.

۱-۲ اهمیت عقرب‌ها

عقرب‌ها راسته‌ای از عنکبوتیان می‌باشند که به دلیل اهمیت پزشکی، قدمت و ارزش آشکار برای تحلیل‌های فیلوژنی در میان کلیسرداران و توزیع وسیع جغرافیایی مورد توجه آرایه شناسان قرار گرفته‌اند. انعطاف بالا در فیزیولوژی، محدوده‌های رفتاری و پاسخ به عوامل زیست محیطی نسبت به تغییر پذیری اندک ریخت شناسی، از جمله سازش‌های قابل توجهی هستند که به بهترین شکل، تضمین کننده موفقیت این راسته طی ۴۰۰ میلیون سال گذشته می‌باشند. به همین دلیل، این سنگواره‌های زنده پیچیده، یکی از مفیدترین سیستم‌های مدل در شاخه‌های مختلف علوم زیستی، از فیزیولوژی تا اکولوژی تکاملی هستند (Polis, 1990).

عقرب‌ها با شکل نامانوس و هیبتی ترسناک و مخصوصاً نیش سمی و دردآور، همواره باعث ترس و انزجار انسان بوده‌اند. سم عقرب‌ها دارای نوروتوکسین‌های پروتئینی با وزن مولکولی کم است که کانال‌های سدیم و پتاسم را بلوکه می‌کنند و مانع از انتشار ایمپالس‌های عصبی از طریق سیناپس‌ها می‌شوند. در ایران، بر طبق آمار منتشر شده توسط مرکز مدیریت بیماری‌ها، فراوانی سالانه گزش عقرب میانگینی معادل ۳۸۴۱۵ گزش (بین سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۵) بوده است که میانگین مرگ و میری معادل ۲۰/۸ نفر را شامل می‌شود که بخش عمده‌ای از این آمار مربوط به استان‌های جنوبی به خصوص خوزستان می‌باشد (Dehghani, 2009). در سطح جهان نیز کشور مکزیک واقع در جنوب آمریکای شمالی، بیشترین موارد عقرب‌گزیدگی و مرگ و میر در دنیا را به خود اختصاص داده است. در این کشور ۱۲۴ گونه عقرب گزارش شده است که هشت گونه آن از نظر پزشکی با اهمیت تلقی می‌گردد. گونه‌های جنس *Centruroides* بیشترین عامل مرگ و میر در این کشور هستند (دهقانی، ۱۳۸۴).

علی رغم این آمار مرگ و میر، سم عقرب‌ها برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها مانند صرع، تشنج حاد و مزمن، کزاز و مهار رشد تومورهای اولیه در بدن استفاده می‌شود. Zargan *et al.*, (2011) اثرات آپوپتوتیک (Apoptotic) و ضد تکثیر سلولی (Antiproliferative) سم عقرب *O. doriae* در سلول‌های سرطانی مغز (Neuroblastoma) انسان را مطرح می‌کنند. در این بررسی، پس از در معرض قرار گرفتن

سلول‌ها در غلظت‌های مختلفی از سم (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ µg/ml)، درصد زنده بودن سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ٪۹۰/۷۵، ٪۷۵/۵۳، ٪۵۵/۵۲، ٪۳۷/۸۵ و ٪۱۴/۳۰ کاهش یافت. همچنین سلول‌ها تغییرات ریخت شناسی مانند تورم، شکل نامنظم، تجمع، پارگی غشاء و انتشار محتویات سیتوزولی پس از تیمار با زهر را نشان دادند. این ماهیت‌ها، سم عقرب‌ها را به عنوان یک عامل درمانی ارزشمند در تحقیقات سرطان نشان می‌دهند.

عقرب‌ها را در تمام نواحی کره زمین به جز قطب جنوب می‌توان یافت، اما بیشترین میزان تنوع گونه‌ای و پراکندگی این راسته در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری مشاهده می‌شود. این موجودات از ارتفاع ۴۰۰۰ متری هیمالیا و ۵۵۰۰ متری سلسله کوه‌های آند تا عمق ۸۱۲ متری غارها صید شده‌اند. اگرچه برخی گونه‌های عقرب در مورد نیازهای زیستگاهی خود کاملاً خاص رفتار می‌کنند، اما برخی دیگر درجه بالایی از سازش را در مورد زیستگاه نشان می‌دهند. به عنوان مثال گونه *Vaejovis janssi* که تنها عقرب موجود در جزیره Socorro (در Baja California مکزیک) می‌باشد، در جنگل‌ها، علفزارها، زمین‌های سنگی و زمین‌های ماسه‌ای یافت می‌شود (Williams, 1980). برخی از گونه‌ها نیز به خوبی در محیط‌های انسانی مستقر می‌شوند. به عنوان مثال گونه *Leiurus quinquestriatus* در برخی محیط‌ها با تراکم یک نمونه در هر متر مربع مشاهده می‌گردد. انتشار گونه‌های بقایایی یا اندمیک عقرب‌ها در نواحی خاص می‌تواند استفاده از آن‌ها را به عنوان مدلی برای حفاظت از بندپایان مطرح نماید (Lourenço, 1991; Prendini, 2005)

۱-۳ معرفی جایگاه سیستماتیک عقرب‌ها

از نظر رده‌بندی جانوری، راسته عقرب‌ها به همراه راسته‌های عنکبوت‌ها (Araneae)، رتیل‌ها (Sulifugae)، پا درازان (Opiliones)، کنه‌ها (Acarina)، عنکبوت‌های دریایی (Pycnogonida) و عقرب مانندها (Pseudoscorpionida)، به شاخه بندپایان (Arthropoda) و رده عنکبوتیان (Arachnida) تعلق دارند (Kaston, 1978; Hawkeswood, 2003)، که برخی از این راسته‌ها دارای نمایندگانی در فلات ایران و نواحی ساحلی این فلات هستند.