



Original Research Paper

Species diversity of *Androctonus crassicauda* and *Hemiscorpius lepturus* using different metabolic genes expressed in RNA-seq data

Elham Pondehnezhadan ¹, Atefeh Chamani ^{1*}, Fatemeh Salabi ², Reihaneh Soleimani ³

¹Department of Environment, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

²Department of Venomous Animals and Antidote Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Southwest Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ahvaz, Iran.

³Department of Plant Protection, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Key Words

Scorpion
Khuzestan provenience
Genetic diversity
Androctonus crassicauda
Hemiscorpius lepturus
Metabolic network
Gene ontology

Abstract

Introduction: The order of scorpions belongs to the category of arachnids and the branch of arthropods, and according to the extensive studies that are being carried out today in the field of phylogenetic and morphological around the world, the classification of scorpions is also being updated. The aim of this studies reconstructs the metabolic network of *Androctonus crassicauda* and *Hemiscorpius lepturus* using RNA-seq studies for suggestion of key metabolic genes differentially expressed between two scorpion species as a molecular marker to evaluate the genetic diversity of different scorpion species.

Materials & methods: For this purpose, Scorpions were caught using ultraviolet light in different areas of Khuzestan province (10 samples of each species). Scorpions were poisoned by electric shock method, and after 72 hours of poisoning, the venom gland was isolated and powdered using a porcelain mortar and liquid nitrogen. RNA extraction from the venom gland was performed using the commercial RNeasy Animal Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the company's instructions. Transcriptome sequencing and differential gene expression analysis of two scorpion species were performed by RSEM software.

Results: The results of analyzes showed that a total of 688060 genes were identified in two species, of which 42676 genes had significant differences in expression ($p < 0.05$). The gene ontology of the differentially expressed genes was performed using Kegg and GO databases and the results showed that the genes involved in the metabolic pathway are the most abundant. Reconstruction of scorpion metabolic network and its analysis using string database and cystoscope software led to the identification of 5 metabolic hub genes. Finally, using the amino acid sequences of Hub genes (triose phosphate isomerase, citrate synthase, glucose 6-phosphate isomerase, catalase and enolase), a phylogenetic tree was constructed using 7 scorpion species.

Conclusion: This study evaluated the use of these 5 metabolic genes to study phylogenetic relationships in scorpions.

* Corresponding Author's email: atefehchamani@yahoo.com

Received: 22 June 2022; Reviewed: 23 July 2022; Revised: 23 September 2022; Accepted: 23 October 2022

(DOI): 10.22034/AEJ.2022.363899.2894

مقاله پژوهشی

بررسی تنوع گونه‌های دو عقرب *Hemiscorpius lepturus* و *Androctonus crassicauda* با استفاده از ژن‌های متابولیسمی متفاوت بیان شده در داده‌های RNA-seq

الهام پونده‌نژادان^۱، عاطفه چمنی^{۱*}، فاطمه ثعلبی^۲، ریحانه سلیمانی^۳

^۱ گروه محیط زیست، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

^۲ بخش جانوران سمی و تولید پادزهر، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه جنوب غرب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

^۳ گروه گیاه‌پزشکی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

چکیده

کلمات کلیدی

مقدمه: راسته عقرب‌ها جزء رده عنکبوتیان و شاخه بندپایان دسته‌بندی می‌شوند. با توجه به این که مطالعات گسترده‌ای در سراسر جهان در حوزه فیلوژنتیکی و مورفولوژیکی در حال انجام است، دسته‌بندی عقرب‌ها نیز در حال به روز رسانی می‌باشد. این مطالعه در سال ۱۴۰۰ انجام گردید. هدف از پژوهش حاضر، بازسازی شبکه متابولیسمی عقرب‌های *Androctonus crassicauda* و *Hemiscorpius lepturus* با استفاده از مطالعات RNA-seq و معرفی ژن‌های متابولیسمی کلیدی متفاوت بیان شده بین دو گونه عقرب به‌عنوان نشانگر ملکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه‌های مختلف عقرب بود.

عقرب
استان خوزستان
تنوع ژنتیکی
Androctonus crassicauda
Hemiscorpius lepturus
شبکه متابولیسمی
هستی‌شناسی ژن‌ها

مواد و روش‌ها: صید عقرب‌ها با استفاده از نور فرابنفش و در نواحی مختلف استان خوزستان انجام شد (۱۰ نمونه از هر گونه). سم‌گیری از عقرب‌ها به‌روش شوک الکتریکی انجام شد و پس از گذشت ۷۲ ساعت از سم‌گیری، غده زهر جداسازی و با استفاده از هاون چینی و ازت مایع پودر گردید. استخراج RNA از غده زهر با استفاده از کیت تجاری RNeasy Animal Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) طبق دستورالعمل شرکت انجام گردید. به این منظور توالی‌یابی ترانسکریپتوم دو گونه عقرب انجام شد و تفاوت بیان ژن‌ها توسط نرم‌افزار RSEM آنالیز گردید.

نتایج: نتایج آنالیزها نشان داد که در مجموع ۶۸۸۰۶۰ یونی ژن در بین دو گونه شناسایی شدند که از این تعداد ۴۲۶۷۶ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌داری بودند ($p < 0.05$) هستی‌شناسی ژن‌های متفاوت بیان شده با استفاده از پایگاه‌های KEGG و GO انجام شد و نتایج نشان داد که ژن‌های دخیل در مسیر متابولیسمی بیش‌ترین فراوانی را دارا می‌باشند. بازسازی شبکه متابولیسمی عقرب و تجزیه و تحلیل آن با استفاده از پایگاه داده استرینگ و نرم‌افزار سایتواسکیپ منجر به شناسایی ۵ ژن هاب متابولیسمی گردید. در نهایت با استفاده از توالی اسیدآمینه‌ای ژن هاب، (تریوز فسفات ایزومراز، سترات سنتاز، گلوگز ۶- فسفات ایزومراز، کاتالاز و انولاز) درخت فیلوژنتیکی بین ۷ گونه عقرب ترسیم شد.

بحث و نتیجه‌گیری: این تحقیق استفاده از این ۵ ژن متابولیسمی را برای بررسی روابط فیلوژنتیکی در عقرب‌ها کارآمد ارزیابی کرد.

مقدمه

عقرب‌ها لازم به نظر می‌رسد. اخیراً Jafari و همکاران، آنالیز فیلوژنی و مورفولوژی *Androctonus crassicauda* استان خوزستان را با استفاده از $16S rRNA$ (۱۷) و Chahari و همکاران، بررسی فیلوژنی مولکولی عقرب همی اسکورپیوس لپتوروس استان خوزستان را براساس توالی DNA ریپوزومی در ناحیه ۲ (ITS2 (Internal Transcribed Spacers) (۷) مورد بررسی قرار دادند. اما تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی تنوع گونه‌ای دو عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* با استفاده از ژن‌های متابولیسمی متفاوت بیان شده در داده‌های RNA-seq انجام نشده است. با توجه به این‌که براساس شواهد مولکولی و مورفولوژیکی تکامل عقرب‌ها به بیش از ۴۰۰ میلیون سال قبل بر می‌گرداند، بنابراین بررسی ساختارهای ژنی دخیل در فعالیت غده زهر این موجودات می‌تواند روشی نوین برای شناسایی عقرب‌ها باشد (۳۲). امروزه رویکردهای مختلف توالی‌یابی نسل جدید به یک استراتژی بسیار قدرتمند برای درک پیچیدگی موجودات تبدیل شده است. ترانسکریپتوم موجودات می‌تواند ژن‌های جدید و ایزوفرم‌های آن‌ها را آشکار و پروفایل کاملی از ترانسکریپت‌ها، ساختار ژن‌ها و سطوح بیان ژن‌ها را در اختیار محقق قرار دهد (۱۲). تکنیک‌های مولکولی از قبیل توالی‌یابی نسل جدید ترانسکریپتوم، آنالیز ترانسکریپتومی و شناسایی و تکثیر ژن‌های دخیل در متابولیسم می‌تواند در رسیدن به نتایج نهایی دقیق‌تر گام موثری باشد. از این‌رو هدف از این مطالعه بررسی روابط فیلوژنی عقرب‌های آندروکتونوس و همی اسکورپیوس استان خوزستان براساس توالی‌ژن‌های مهم دخیل در مسیرهای متابولیسمی با استفاده از داده‌های حاصل از RNA Seq در نظر گرفته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری عقرب، استخراج RNA و توالی‌یابی ترانسکریپتوم: صید عقرب‌ها از نواحی مختلف استان خوزستان (باغملک، رامهرمز و ایذه) و با استفاده از نور فرابنفش انجام شد. عقرب‌های دو گونه *Androctonus crassicauda* و *Hemiscorpius lepturus* (۱۰ نمونه عقرب از هر گونه) پس از صید جهت شناسایی توسط جعبه‌های مخصوص نگه‌داری عقرب به آزمایشگاه بندبایان موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی جنوب‌غرب کشور در اهواز انتقال داده شدند. سم‌گیری از عقرب‌ها به‌روش شوک الکتریکی انجام شد و پس از گذشت ۷۲ ساعت از سم‌گیری، غده زهر جداسازی و با استفاده از هاون چینی و ازت مایع پودر گردید. استخراج RNA از غده زهر با استفاده از کیت تجاری RNeasy Animal Mini Kit (Qiagen) استفاده از کیت تجاری (Valencia, CA, USA) طبق دستورالعمل شرکت انجام گردید. پس از تایید کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ

راسته عقرب‌ها به رده عنکبوتیان و شاخه بندپایان تعلق دارد و با توجه به مطالعات گسترده‌ای که امروزه در حوزه فیلوژنتیکی و مورفولوژیکی در سراسر جهان در حال انجام است دسته‌بندی عقرب‌ها نیز در حال به روز رسانی می‌باشد، با این وجود تاکنون دسته‌بندی عقرب‌ها شامل ۲۲۳۱ گونه است که متعلق به ۲۰۸ جنس و ۲۰ خانواده می‌باشد (۷). عقرب‌ها به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین خانواده‌های زنده دنیا شناخته شده‌اند و انعطاف‌پذیری زیستی، سازگاری مکانی، تغییرات خصوصیات اکولوژیکی (۳۷)، عوامل زیستی و آب و هوایی (۱۵) و یا ارتباط متقابل هر یک از این فرآیندها موجب گوناگونی در ریخت‌شناسی عقرب‌ها گردیده است. آنالیزهای فیلوژنتیک نشان داد که تقریباً ۳۵۰ میلیون سال پیش (۳۵، ۱۸) و بعد از جداسدن فیزیکی بخش‌هایی از صفحات آفریقا و جنوب آمریکا، چندین جنس با ویژگی‌های متفاوت به‌وجود آمدند که شامل *Mesobuthus sp.*, *Buthus sp.*, *Androctonus sp.*, *Leiurus sp.*, *Hottentotta sp.*, *Parabuthus sp.* در آفریقا و آسیا و *Tityus sp.* و *Centruroides sp.* به‌ترتیب در شمال و جنوب آمریکا هستند (۱۰). مطابق تحقیقات جدید عقرب‌های ایران متعلق به سه خانواده *Buthidae*, *Scorpionidae* و *Hemiscorpidae* می‌باشند که شامل ۱۹ جنس و ۶۴ گونه هستند (۸). دو گونه مهم عقرب در استان خوزستان شامل *Androctonus* و *Hemiscorpius* هستند که به‌ترتیب متعلق به خانواده‌های *Buthidae* و *Hemiscorpidae* هستند. طبق آخرین مطالعات انجام شده در ایران، سه گونه از جنس *Androctonus* به نام‌های *Androctonus crassicauda*، *Androctonus robustus* و *Androctonus baluchicus* موجود است (۲۱) و از این سه جنس *Androctonus crassicauda* بیش‌ترین فراوانی را دارا می‌باشد. در ایران چهار گونه از جنس *Hemiscorpius* نیز گزارش شده است که شامل *Hemiscorpius lepturus*، *Hemiscorpius maindroni*، *Hemiscorpius acanthocercus* و *Hemiscorpius enischnochela* هستند (۲۶). به‌عنوان عقربی که زهر آن خاصیت هموتوکسیک و سیتوتوکسیک دارد، خطرناک‌ترین عقرب ایران و خوزستان به‌حساب می‌آید (۱). از آن‌جایی که صفات مورفولوژیک مربوط به وضعیت خویشاوندی و تاکسونومیک جامع و دقیق نیستند، بنابراین برخی از آن‌ها از نظر اعتبار مشکوک بوده و بازبینی کامل این گونه‌ها از طریق روش‌های مولکولی و فیلوژنتیکی توسط نویسندگان مختلف پیشنهاد شده است (۱۰). از آن‌جاکه تحقیقات پیشین ریخت‌سنجی عقرب‌ها در ایران به صورت سنتی بوده و در نتیجه احتمال وجود خطاهای آماری وجود دارد، بنابراین استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای بررسی فیلوژنی

متفاوت بیان شده عقرب‌ها با استفاده از مجموع داده‌های *Drosophila melanogaster* در پایگاه استرینگ به آدرس <https://string-db.org> رسم و مورد آنالیز قرار گرفت. این شبکه توسط افزونه cytoNCA موجود در Cytoscape و براساس شاخص‌های مرکزیت، درجه (Degree) و گلوگاه (Betweenness)، تجزیه و تحلیل شد. گره‌های واجد درجه بالا در شبکه به‌عنوان ژن‌های هاب (hub) در نظر گرفته شدند. کلاسترها توسط الگوریتم MCODE (MCODE) تعیین و بررسی گردیدند (۴).

رسم درخت فیلوژنی با استفاده از ژن‌های هاب متابولیسمی:

تمام توالی‌های هاب مربوط به ژن‌های هاب شناسایی شده، با استفاده از بلاست از رونوشت‌های *A. crassicauda* و *H. lepturus* استخراج شدند. به دلیل عدم یافتن توالی‌های هم‌تراز این پروتئین‌ها در سایر عقرب‌های ثبت شده در NCBI، در این مطالعه برای به‌دست آوردن این توالی‌ها، آنالیز ترانسکریپتومی ۵ گونه عقرب دیگر انجام شد. برای این منظور ابتدا داده‌های خام توالی‌یابی RNA-seq مربوط به ۵ گونه عقرب‌های *Androctonus australis* (SRX۱۵۸۸۹)، *Hottentotta trilineatus* (SRX۱۵۸۸۹)، *Mesobuthus martensii* (SRX۱۳۲۴۶۵۳)، *Superstitionia donensis* (SRX۱۵۹۴۴) و *Euscorpis italicus* (SRX۱۵۹۴۲) از بخش SRA مربوط به NCBI دانلود شدند. کیفیت داده‌های خام با استفاده از نرم‌افزار Fastqc بررسی گردید و پس از ویرایش داده‌ها با نرم‌افزار Trimmomatic v ۰.۳۶، پیکربندی ترانسکریپتوم این ۵ گونه عقرب با روش De-Novo و مطابق روش ذکر شده برای پیکربندی دو گونه عقرب مورد مطالعه، انجام شد. توالی‌های پروتئینی با استفاده از TransDecoder-Trinotate pipeline بازیابی شدند، پس از آن توالی پروتئینی ژن‌های هاب متابولیسمی (Kdn, Tpi, Pgi, Cat و Eno) با استفاده از بلاست پروتئینی از کل داده‌های به‌دست‌آمده استخراج شدند. هم‌ترازی‌های چندگانه توالی‌های پروتئینی یافته شده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار هم‌ترازی Clustal W انجام شد (۳۹). نتایج هم‌ترازی برای رسم یک درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA X (۲۲) استفاده شدند و درخت‌های فیلوژنتیک با روش Neighbor-Joining (NJ) رسم شدند.

نتایج

در این مطالعه هدف شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده درگیر در مسیرهای متابولیسمی در دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* و استفاده از این ژن‌ها جهت مطالعات فیلوژنتیکی می‌باشد. به این منظور، از تکنیک توالی‌یابی رونوشت‌های سلولی RNA-Seq استفاده شد. نتایج تعیین کیفیت داده‌ها در نرم‌افزار Fastqc نشان

و ژل الکتروفورز افقی، نمونه‌هایی با کیفیت مناسب جهت توالی‌یابی paired-end به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. معیار عدم خردشدگی نمونه‌های RNA توسط شرکت تعیین شدند. نمونه‌هایی با کیفیت و کمیت مناسب و معیار عدم خردشدگی بالای ۶ جهت توالی‌یابی انتخاب شدند. فرایند توالی‌یابی به‌وسیله دستگاه Illumina ۲۰۰۰ HiSeq شرکت ماکروژن و مطابق دستورالعمل مربوط به شرکت انجام شد. طول توالی‌ها ۱۵۰ بیت و به‌صورت دو جهت خوانش بودند.

آنالیز داده‌ها و پیکربندی ترانسکریپتوم: بررسی کیفیت

داده‌های توالی‌یابی شده قبل و بعد از ویرایش با استفاده از نرم‌افزار Fastqc تحت سیستم عامل لینوکس و حذف خوانش‌های با کیفیت پایین با استفاده از نرم‌افزار Trimmomatic v ۰.۳۶ انجام شد (۵). خوانش‌های پیرایش شده پس از تایید کیفیت مجدد با نرم‌افزار Fastqc برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. پیکربندی ترانسکریپتوم غده زهر دو عقرب *Androctonus crassicauda* و *Hemiscorpis lepturus* با روش De-Novo و با استفاده از نرم‌افزار Trinity (۷۲.۰.۳) انجام شد. توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های سازنده زهر نیز با استفاده از TransDecoder-Trinotate pipeline استخراج شدند (۱۴).

آنالیز تفاوت بیان ژن: برای رسیدن به ژن‌هایی که بیان آن‌ها

در گونه‌های مختلف متفاوت است از نرم‌افزارها و بسته‌های آماری مختلفی می‌توان استفاده کرد. در این مطالعه فراوانی رونوشت یونی ژن‌ها برحسب (FPKM) (fragments per kilobase of transcript per million base pairs sequenced) توسط نرم‌افزار RSEM (۳) و با پارامترهای بهینه شده محاسبه شد. به‌منظور مصورسازی و نشان دادن نتایج حاصل از ژن‌هایی با بیان متفاوت از بسته‌های آماری تحت R استفاده شد.

هستی‌شناسی ژن‌های متفاوت بیان شده: پس از استخراج

ژن‌های متفاوت بیان شده از مجموع داده‌های دو عقرب، از پایگاه اطلاعاتی DAVID به آدرس <https://david.ncifcrf.gov/> جهت تجزیه و تحلیل فرایندهای بیولوژیکی و مسیرهای زیستی این ژن‌ها استفاده شد (۹). این پایگاه داده با اتصال به پایگاه‌های GO و KEGG به بررسی فرایندهای بیولوژیکی خاص که ژن‌ها در این فرایند دخالت دارند و همچنین رتبه‌بندی این فرایندها، بررسی عملکردی و مسیرهای متابولیسمی ژن‌ها می‌پردازد.

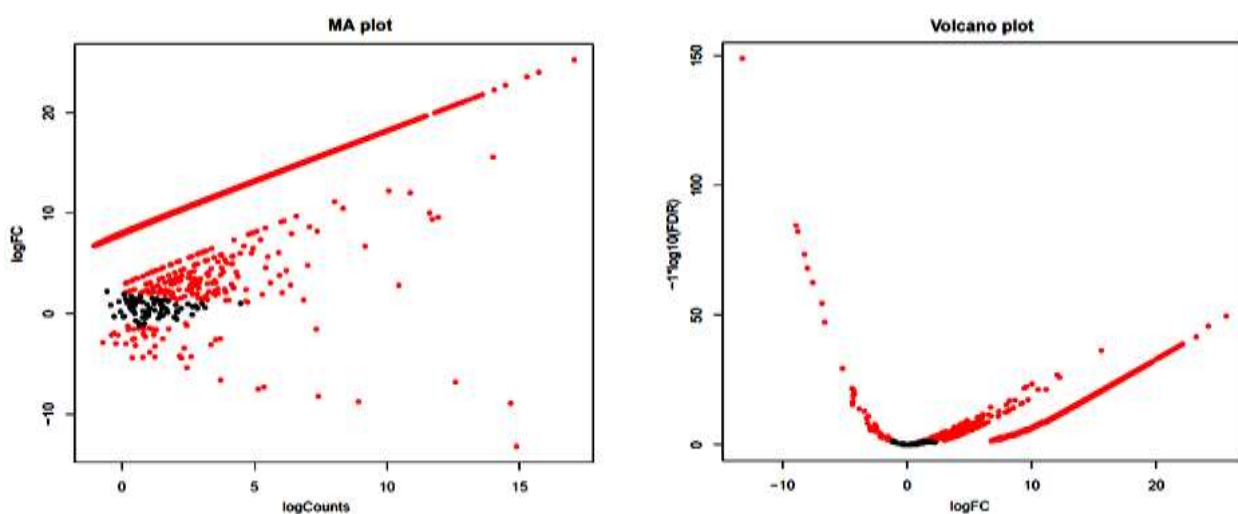
آنالیز شبکه ژنی متابولیسم ژن‌های متفاوت بیان شده در

دو گونه عقرب: به‌منظور بررسی برهمکنش و ارتباط بین ژن‌های درگیر در مسیر متابولیسمی از نرم‌افزار STRING ۱۰ جهت تجزیه و تحلیل شبکه و مجسم‌سازی اطلاعات از نرم‌افزار سایتواسکیپ ورژن ۱.۷.۳ استفاده شد. در نهایت شبکه متابولیسمی مرتبط با داده‌های

شناسایی ژن‌های متفاوت بیان شده در ترانسکریپتوم دو

گونه عقرب: نتایج آنالیز بیان در سطح ایزوفرم نشان داد که از مجموع ژن‌های بیان شده در بین دو گونه ۴۲۶۷۶ ژن دارای تفاوت بیان معنی‌داری بودند. سطح معنی‌داری در تعیین بیان متفاوت در بین دو گونه ۵ درصد در نظر گرفته شد. از این تعداد در *A. crassicauda* نسبت به *H. lepturus*، ۴۷ ژن کاهش بیان (Down-regulated) و ۴۲۶۲۶ ژن افزایش بیان (Up-regulated) نشان دادند. نمودار آتش فشانی در شکل ۱ قابل مشاهده است. این نمودار میزان معنی‌داری در سطح کل ژن‌ها را نشان می‌دهد.

داد که تمام داده‌های این مطالعه در وضعیت قبول قرار داشتند و میانگین کیفیت داده‌ها ۳۶ بود که بیانگر کیفیت خوب داده‌ها است. با این وجود برای حذف توالی آداپتورها و حذف یا ویرایش خوانش‌های بی کیفیت از نرم‌افزار Trimmomatic استفاده شد. در نهایت توالی‌های ویرایش شده با استفاده از نرم‌افزار Trinity پیکربندی شدند. نتایج پیکربندی ترانسکریپتوم نشان داد که در مجموع ۱۲۳۸۸۸۶ کانتیگ ساخته شد که از این تعداد ۶۸۸۰۶۰ یونی ژن به دست آمد که میانگین میزان GC آن‌ها ۳۵/۶۱ درصد بود.



شکل ۱: نمودارهای MA و Volcano بیان ژن‌ها در دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus*

دو نمودار بالا نشانگر میزان بیان ژن‌ها می‌باشد و تفاوت بیان را نشان می‌دهد. که نقاط قرمز نشان‌دهنده ژن‌هایی با تفاوت آماری معنی‌دار و نقاط سیاه رنگ نشانگر ژن‌های بدون تفاوت آماری معنی‌دار می‌باشد.

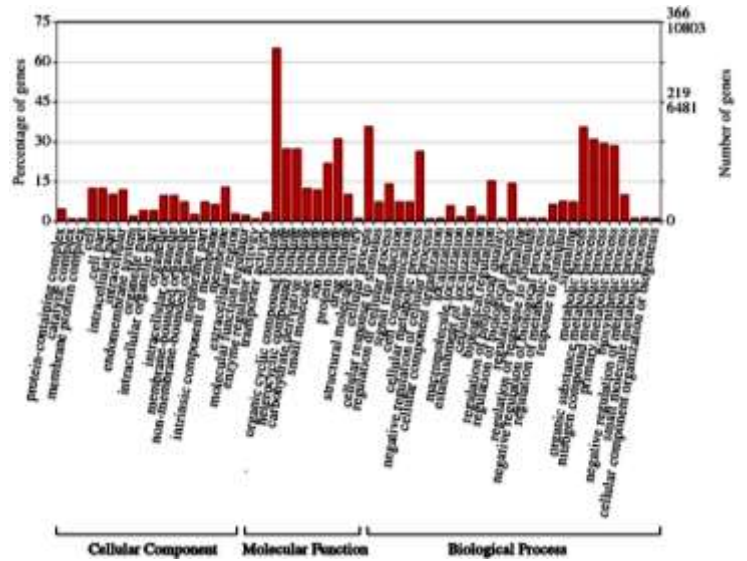
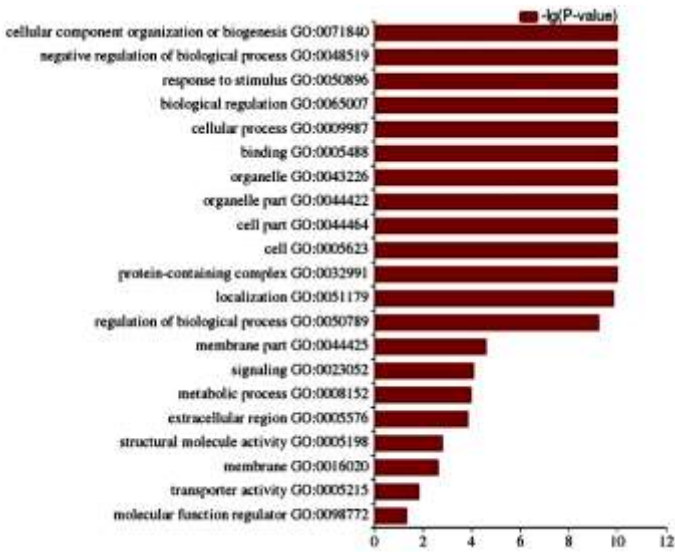
پروتئین‌های درگیر در مسیرهای متابولیسمی با استفاده از نرم‌افزار استرینگ و مجموع داده *D. melanogaster* رسم شد. نتایج تجزیه و تحلیل شبکه ژنی متابولیسمی مربوط به دو گونه عقرب در جدول ۱ گزارش شده است. برای تجزیه و تحلیل شبکه متابولیسمی و مجسم سازی اطلاعات از نرم‌افزار سایتواسکیپ و افزونه‌های MCODE و cytoNCA استفاده شد. نتایج آنالیز با افزونه cytoNCA نشان داد که از مجموع ۷۲۰ ژن، ۳۵ ژن دارای بیشترین درجه اثر متقابل با دیگر ژن‌ها هستند. نتایج آنالیز ۱۰ تا ژن رتبه بالا در جدول ۲ آمده است. نتایج مندرج در جدول ۲ نشان داد که براساس مرکزیت بینابینی (Betweenness) بیشترین ارزش متعلق به ژن Kdn با ارزش ۵۸۰۹/۱۱ است. براساس درجه (Degree)، ژن‌های Tpi (Triosephosphate isomerase)، Kdn (Citrate synthase)، Pgi (Glucose-6-phosphate isomerase-like)، Cat (Catalase) و Eno (Enolase) به ترتیب بیشترین ارزش را دارا می‌باشند (۷۰، ۶۷، ۵۹، ۵۳ و ۴۸) و این ۵ تاژن به عنوان ژن‌های هاب در شبکه در نظر گرفته شدند.

هستی‌شناسی ژن‌های متفاوت بیان شده: شناسایی ژن‌های

متفاوت بیان شده بین دو گونه عقرب و مشخص کردن نقش آن‌ها در شبکه‌های بیولوژیکی از اهداف مهم این مطالعه بود. به این منظور ژن‌های متفاوت بیان شده از مجموع داده‌ها استخراج شدند و توالی‌ای نوکلئوتیدی آن برای بررسی فرایندهای بیولوژیکی و مسیرهای متابولیسمی با فرمت فستا در پایگاه‌های GO و KEGG بارگذاری شدند. نتایج در سطح معنی‌داری ۵ درصد گزارش شده است (شکل ۲). ژن‌های استخراج شده به سه دسته ژن‌های دخیل در مسیرهای بیولوژیکی، مولکولی و ساختاری دسته‌بندی شدند. از بین ژن‌هایی که در فرایندهای بیولوژیکی نقش دارند، درصد قابل توجهی از آن‌ها در مسیرهای متابولیسمی شناسایی شدند. به همین جهت شبکه متابولیسمی و ژن‌های دخیل در آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل شبکه متابولیسمی: نتایج نشان داد که از

مجموع ۴۲۶۷۶ ژن با تفاوت بیان معنی‌دار، ۷۲۰ ژن در مسیرهای متابولیسمی عقرب نقش دارند. در ادامه شبکه برهمکنش میان این



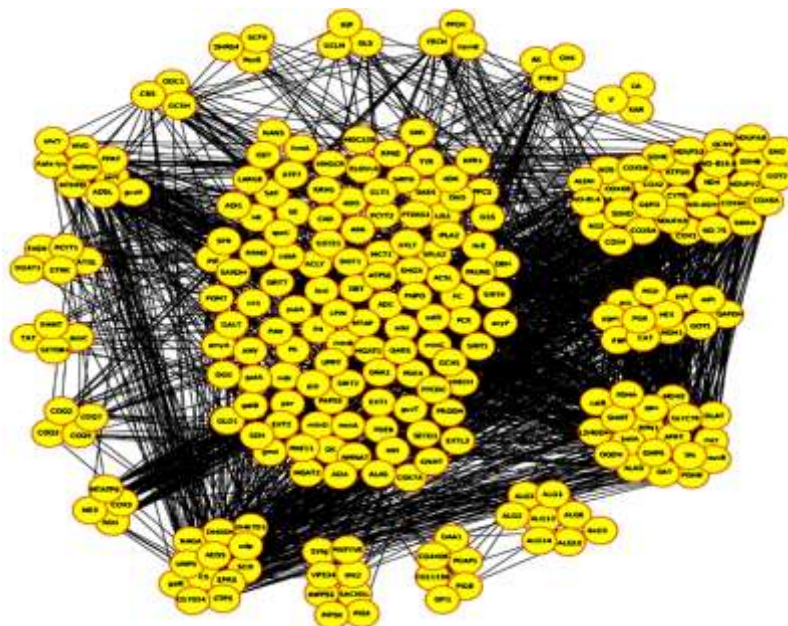
شکل ۲: هستی شناسی ژن های متفاوت بیان شده عقرب های *Hemiscorpius lepturus* و *Androctonus crassicauda*

جدول ۲: مشخصات پروتئین های رتبه بالا در شبکه متابولیسمی عقرب های *Hemiscorpius lepturus* و *Androctonus crassicauda*

نزدیکی	بین	درجه	ژن	
Closeness	Betweenness	Degree	Gene	
۰/۵۱	۳۲۴۵/۲۳	۷۰	Tpi	۱
۰/۵۲	۵۸۰۹/۱۱	۶۷	Kdn	۲
۰/۵۱	۳۵۴/۰۳	۵۹	Pgi	۳
۰/۵۰	۳۲۱۶/۵۰	۵۳	Cat	۴
۰/۴۷	۷۷۳/۳۳	۴۸	Eno	۵
۰/۴۶	۱۶۷۴/۹۸	۴۷	Got2	۶
۰/۴۷	۱۰۹۷/۵۳	۴۵	Mdh1	۷
۰/۴۹	۱۳۲۰/۴۸	۴۴	Gapdh2	۸
۰/۴۴	۶۲۸/۱۶	۴۳	SdhA	۹
۰/۴۶	۶۵۵/۰۳	۴۳	Mdh2	۱۰

جدول ۱: تجزیه و تحلیل شبکه ژنی پروتئین های درگیر در متابولیسم عقرب های *Hemiscorpius lepturus* و *Androctonus crassicauda* با استفاده از نرم افزار استرینگ

۲۷۶	تعداد گره ها (Number of nodes)
۲۰۳۵	تعداد لبه ها (Number of edges)
۱۴/۷	میانگین درجه گره (Average node degree)
۰/۴۴۱	میانگین ضریب خوشه بندی محلی (Avg. local clustering coefficient)
۶۳۳	تعداد لبه های مورد انتظار (Expected number of edges)
$<1.0 \times 10^{-16}$	معیار غنی سازی PPI (PPI enrichment p-value)



شکل ۳: کلاسترهای پروتئینی در شبکه ژنی مسیر متابولیسمی عقرب های *Hemiscorpius lepturus* و *Androctonus crassicauda*

جدول ۳: لیست ژن‌های موجود در کلاسترهای پروتئینی شبکه متابولیسمی عقرب‌های *Hemiscorpius lepturus* و *Androctonus crassicauda*

ژن‌ها	تعداد ژن	شماره کلاستر
COX5B, ALDH, NDUF9, GOT2, ENO, NDUF3, NDUF8, COX6A, ND-75, ND-ASHI, COX6C, ND-B16.6, ND-B14.5A, ND4, ND5, COX6B, G6PD, ND2, QCR9, SDHA, NDUFV2, SDHB, SDHD, CYTB, COX5A, SDHC, COX2, COX4, COX1, ATP5D	۳۰	۱
PGK, MDH1, FBP, acs, pgm, GOT1, adh, CAT, PGD, pyk, HEX, GAPDH	۱۲	۲
DLAT, pgi, ALAD, gpx, TPI, APRT, sucB, GMPS, PDHB, OGDH, mcr, MDH2, SHMT, catB, GLYCTK, PDHA, RPN1, betA, OAT, L2HGDH	۲۰	۳
galK, DHKTD1, CS, DHODH, ADSS, udp, CG7024, EPRS, NAGA, UMPS, SCD, CTPS	۱۲	۸

Hemiscorpius Lepturus گونه (Kdn) (MZ۱۴۵۰۳۵)، سیترات سنتتاز (Kdn) گونه *Androctonus crassicauda* (MZ۱۵۱۸۹۸)، گلوکز ۶ فسفات ایزومراز گونه *Hemiscorpius* (MZ۱۴۵۰۳۹)، گلوکز ۶ فسفات ایزومراز گونه *Lepturus* (MZ۱۵۱۹۰۱)، کاتالاز گونه *Androctonus crassicauda* (MZ۱۵۱۸۹۲)، کاتالاز گونه *Hemiscorpius lepturus* (MZ۱۵۱۹۰۲)، انولاز گونه *Androctonus crassicauda* (MW۳۶۶۳۷۷) و انولاز گونه *Hemiscorpius Lepturus* (MW۳۶۶۳۷۸) می‌باشد. پس از آن، توالی‌های پروتئینی به دست آمده از دو گونه عقرب با استفاده از نرم‌افزار تحت وب ClustalW از نظر همسانی مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه توالی اسید آمینه‌های TPI دو عقرب در شکل ۴ نشان داده شده است. بررسی همسانی توالی‌های پروتئین TPI مربوط به دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* نشان داد که این توالی‌ها صد درصد هم‌پوشانی و ۸۵/۸۹ درصد شباهت با یکدیگر دارند.

نتایج تجزیه و تحلیل کلاستر پروتئینی با استفاده از افزونه MCODE در شکل ۳ گزارش شده است. براساس نتایج به دست آمده ۱۸ کلاستر پروتئینی تشکیل شدند که بیشترین تعداد ژن‌ها به ترتیب در کلاسترهای ۳، ۱، ۲ و ۸ که شامل ۳۰، ۲۰، ۱۲ و ۱۲ ژن بودند، دیده شدند. ژن‌های تشکیل‌دهنده این کلاسترها در جدول ۳ آمده است. به عنوان مثال؛ ژن ENO در کلاستر ۱، ژن GAPDH در کلاستر ۲ و ژن‌های MDH2، pgi و TPI در کلاستر سوم قرار دارند. هم‌ترازی ژن‌های هاب متابولیسمی: به منظور هم‌ترازی ژن‌های هاب متابولیسمی مربوط به دو گونه عقرب مورد مطالعه، توالی‌های پروتئینی این ژن‌ها از کل توالی‌های مربوط به دو گونه عقرب استخراج شده و پس از تایید، در NCBI بارگذاری شدند. شماره دسترسی تریوز فسفات ایزومراز (TPI) گونه *Androctonus crassicauda* (MZ۰۴۸۴۷۵)، تریوز فسفات ایزومراز گونه *Hemiscorpius Lepturus* (MZ۱۵۱۹۰۷)، سیترات سنتتاز (Kdn) گونه *Androctonus crassicauda*

triosephosphate isomerase <i>Androctonus Crassicauda</i>	MSQRKFFVGGNWKMGSKAGIEEIVSFMKGPLDPNTEVVLGCPISYLDFAFSKMPANIG	60
triosephosphate isomerase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	MAQRKFFVGGNWKMGSKAGITEIGQFMTKGPLDPNTEIVLGCPIYLEFAQKAMPNVNS	60
	* ***** ** ** ***** ** ** ** *	
triosephosphate isomerase <i>Androctonus Crassicauda</i>	LAAQNCYKVEKGAFTGEISPCMIKDVGNMVLGHSERRNIFGENDLIAEKVAHALSSG	120
triosephosphate isomerase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	MAAENCYKVEKGAFTGEISPAMIKDVGSVWVILGHSERRNVFGETDELIADKVAHALASG	120
	** ***** ** ** ***** ** ** ** *	
triosephosphate isomerase <i>Androctonus Crassicauda</i>	LKVIACIGELLEERESGKTTEVWNRQTKAIANKISDWSNVVLAYPEVWAIIGTKATPEQ	180
triosephosphate isomerase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	LKVIACIGELLEERESGKTAEVFRQTKAIADKVTDWKVVLAYPEVWAIIGTKATASPEQ	180
	***** ** ** ***** ** ** ** *	
triosephosphate isomerase <i>Androctonus Crassicauda</i>	AQEVHAQLRGWLKSNISEDVANKTRIIYGGSVTASNCKELAKNPVDVDFLVGGASLKPEF	240
triosephosphate isomerase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	AQEVHAQLRDWLKSNISEDVANKTRIIYGGSVTAANCKELAKNPVDVDFLVGGASLKPEF	240
	***** ** ** ***** ** ** ** *	
triosephosphate isomerase <i>Androctonus Crassicauda</i>	VQIVNARQ*	248
triosephosphate isomerase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	VQIVNAKQ*	248
	***** **	

شکل ۴: هم‌ترازی توالی‌های پروتئینی تریوز فسفات ایزومراز دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus*. توالی‌های اسید آمینه‌های محافظت شده با ستاره نشان داده شده است.

مقایسه اسید آمینه‌های توالی‌های مربوط به Kdn در دو گونه عقرب در شکل ۵ نشان داده شده است. هم‌ترازی این توالی‌ها با یکدیگر نشان داد که این توالی‌ها همسانی بالایی با هم دارند. تجزیه و تحلیل هم‌ترازی توالی‌های پروتئین Kdn دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* نشان داد که این دو توالی ۸۵/۱۹ درصد از هویت خود را با یکدیگر به اشتراک می‌گذارند.

مقایسه اسید آمینه‌های توالی‌های مربوط به Kdn در دو گونه عقرب در شکل ۵ نشان داده شده است. هم‌ترازی این توالی‌ها با یکدیگر نشان داد که این توالی‌ها همسانی بالایی با هم دارند. تجزیه و تحلیل هم‌ترازی توالی‌های پروتئین Kdn دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* نشان داد که این دو توالی ۸۵/۱۹ درصد از هویت خود را با یکدیگر به اشتراک می‌گذارند.

citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	MALFRILGTRFIVQTVI-VPVTLNLRNISDTTDLKGVANKIIEHQKRVKFFREEYGDK	59
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	MALFRVLGSRIFAQSQVTTAPIYVLSRSVSDTTDLKGLADKIIDHQRVKKFRREVYGSK	60
citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	VIGEITVSQVYGGHGRGKGLVETSHLDPEEGIRFRNYSIPEIRNLLPKAPGGEEPLPEG	119
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	VIGEITVEQVYGGHGRGKLSLVETSHLDPEEGIKFRNHSIPELRKLLPKAPGGEEPLPEG	120
citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	LYWLLLTGDIPTPEQVKHVSQEWAKNAALPSHVASTLNNFPSNLHPMSQFSAAITACNTE	179
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	LFWLLITGDIPTQEQVKYISKIWAENADLP SHVVTTLNNFPSHLHPMSQFSAAITASNTE	180
citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	SKFTKAYSEGKKTYYWEYVFDATNLI AKLTPIAATIYRNLRYDGGSSIG AIDVNKDWSA	239
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	SKFAKAYAEGAKKTTYWEYIYDSSMNLIAKLTPIAATIYRNLRYDGGSSIG AIDVNKDWSA	240
citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	NFTAMLGYDNPTFTELMRLYLTIHSDHEGGNVAHTHLVGSALSDPYLSFAAGINGLAG	299
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	NFTSMLGYDSSTFTELMRLYLTIHSDHEGGNVAHTHLVGSALSDPYLSFAAGMDGLAG	300
citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	PLHGLANQEVLVWLT KQLKELGTDASEDKLKEFVWKTLKSGQVVPYGYHVALRKTDPRYT	359
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	PLHGLANQEVLVWLT KQLKELGDNVTEEQLKEFVWKTLKSGQVVPYGYHVALRKTDPRYI	360
citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	AQREFALKHLPDDPLFKLVASIVKVPPILELGVKKNPWPVNDASHGVL LQHFQGMKEMQ	419
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	AQREFAQKHLPNDDLKLVLSQYKVPPILELGVKKNPWPVNDASHGVL LQHFQGMTMQ	420
citrate synthase 1	Androctonus Crassicauda	YYTVLFGVSRALGVLASLVWDRAMGLPIERPKSMDTSGMLKLVGAV*	465
citrate synthase 1	Hemiscorpius Lepturus	YYTVLFGVSRALGVLSSLVWDRAMGLPIERPKSMDTDGLMKLVGAI*	466

شکل ۵: همترازی توالی های پروتئینی سیترات سنتتاز دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus*. توالی های اسید آمینه های محافظت شده با ستاره نشان داده شده است.

به دست آمده از پروتئین کاتالاز موید وجود همولوژی بالایی بین این توالی ها است. همسانی توالی های پروتئین کاتالاز دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشانگر شباهت ۷۷/۲۲ درصدی بین این توالی ها می باشد. در شکل ۷ مقایسه توالی اسید آمینه های دو پروتئین مربوط به دو گونه عقرب نشان داده شده است.

همترازی توالی های ب اندست آمده از پروتئین گلوکز ۶- فسفات ایزومراز یا فسفوگلوکز ایزومراز یا Pgi انجام گردید و نتایج نشانگر همسانی بالای توالی این پروتئین ها در دو گونه عقرب مورد مطالعه بود. تجزیه و تحلیل هم ترازی توالی های پروتئین Pgi دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* وجود ۸۵/۸۷ درصد شباهت را بین دو توالی نشان داد. در شکل ۶ مقایسه توالی اسید آمینه های دو پروتئین مربوط به دو گونه عقرب نشان داده شده است. نتایج مقایسه توالی های

glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	MVF EQSGSLSDNPNYKQLQEQYKKSNE SKLMPALFKNDPGRFDKYHICLKT PVDGKILFD	60
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	HSFQQEGLTDDAAYKALCDYKKNNE TKLYNPTMFANDAERFKYYSIQLKTPENGVLFD	60
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	YSKNIIDEEVLKLLLELAKERKVEQARDAMFSGEKINFTEDRAVLHIALRNRKNSPINVN	120
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	YSKNLINEEVQQLLELAKNRKVEQARDAMFSGEKINFTENRAVLHIALRNRSNPTIMVD	120
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	GKDVMPGVNAVLKHPREFTDVAVRSGNKGYYTGKSTIDIINIGIGGSDLGPVHVTEALRHY	180
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	GSVMPGVNAVLKHPREFSSEVRSGEWKGFTGKSTIDTVNIGIGGSDLGPVHVTEALRHY	180
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	RGNGPNAHFVSNIDGTHLAEILKLNPTSLFIIASKFTTQTETIHAESAENFLSHAK	240
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	RGNGPNAHFVSNIDGTHMAETLKKLNPTSLFIIASKFTTQTETIHAESAENFLSHAK	240
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	DPSAVAKHFVALSTNGPKVKEFGIDEKHPHFEDWVGGRYSLMSAIGLSIALFVGMDFE	300
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	DPSAIKHFVALSTNGPKVKEFGIDEKHPHFEDWVGGRYSLMSAIGLSIALFVGMDFE	300
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	ELLSGAHYIDEHFKTTPLEKNIPVIMALLGIWYHNIIFGAESHALLPYDQVLRHFAAYFQQ	360
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	ALLAGAHFIDQFKTAPLEKNIPVIMALLGVYHNIYGAESHALLPYDQVLRHFAAYFQQ	360
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	GDNESNGKYVTRSGHQVNYNTGPIVWGEPTNGQAHFYQLIHQGTRLIPCDFIAPVKSNN	420
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	GDNESNGKYVTRNGEIVKYTTGPIVWGEPTNGQAHFYQLIHQGTRLIPCDFIAPVKSNN	420
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	PLRNHLHPELLLSNFLAQTEALMKGKTKDEAEKELKQSGASEDNIKKLLPHKVFVGNRPT	480
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	PLRNHLHPELLLSNFLAQTEALMKGKTKEEAEALRAGNDEEKLLKLLPHKVFVGNRPT	480
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	NSLLVDKHTPFNLGALIMYEHKIFITQGIINDINSYDQHGVELGKQLAKVHPELQSDAP	540
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	NSLLVDKHTPFNLGALIMYEHKIFITQGIINDINSYDQHGVELGKQLAKVHPELQSDAP	540
glucose-6-phosphate isomerase	Androctonus Crassicauda	VSSHDSSTNGLNFIKANK*	559
glucose-6-phosphate isomerase	Hemiscorpius Lepturus	VTSHDCSTNGLNFIKEQ*	559

شکل ۶: همترازی توالی های پروتئینی گلوکز ۶- فسفات ایزومراز دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus*. توالی های اسید آمینه های محافظت شده با ستاره نشان داده شده است.

catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	MADSRDPASDQMKQKQEQRAPQKPDVLTGNGNPIDGKLNIMTAGPRGPLLQDVVFTDE	60
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	-----MVAGSRGPMVLQDVVFL EE	19
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	MAHFDREIRIPERVVHAKGAGAFGYFEVTHDITRYSKAKVFEHIGKRTPIAVRFSTVAGES	120
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	MAHFDREIRIPERVVHAKGAGAFGYFQVTHDITRYCKAALFSEIGKVTPLAVRF SQVTGES	79
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	GSADTVRDRPRGFAVKFYTEDGNWDLVGNNTPIFFIRDAMPLFSPFIHSQKRNPQTHLKDPP	180
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	GSADTVRDRPRGFAIKFYTEEENWDLVANNTPIFFLRDPMLFSPFIHTQKRNPVTHLKDAD	139
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	MWDFWLSLCPESLHQVTFLLFSDRGI PDGHRHMNGYGSHTFKLVNANGEAVYCKFFHYKTDQ	240
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	MFWDFISL RPE TTHQVSFLFSDRGI PDGYRHMHGHHGGHTYKIVNAKNEPFYCKFFHYKTDQ	199
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	GIKNLPVEEAGRLAQEDPDYGLRDLFNAIASGNYP SWTFYI QVMTFKEAETFPFPNPFDLT	300
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	GIRNLPVERAAELASTDPDYALRDLNNAIAEKRYPSWTFYVQVMTYQAEFRWNPFDVT	259
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	KVWPHKDYPLIPVQKLVLRNPNANYFAEVEQMAFDPSPNMPPIEPSPDKMLQGRLLFAYPD	360
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	KIWPHPPEPLIPVQKLVLRNPNANYFAEVEQMAFDPSPNMPPIEPSPDKMLQGRLLFAYPD	319
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	THRHRLLGPNYLQIPVNC PYR ARVANYQRDGPCHMDNQGGAPNYPNFSFAPEQQGSALE	420
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	THRHRLLGTNFLQIPVNC PYR ARVANYQRDGPCHMDNQGGAPNYPNFSFAPEQQGSALE	379
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	HHSQCSADVKRFNSANEDNVTQVTRTFYTKVLNEEERKRLCENTANHLKDAQLFIQRKAVK	480
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	SPICITGGEVKRYNTSDDDNF SQVGVF YR KVL TSDERTRLINNIVNHLKNAQKSIQERAIK	439
catalase <i>Androctonus Crassicauda</i>	NFTDVHPDYGARVQALLDQYNSQPKNAIHTYVQAGSHIAAKGKANL	527
catalase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	NFSKADPEYGRIKGELLQLSAGHGQL	466

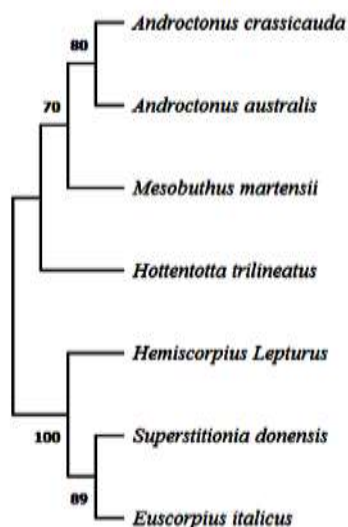
شکل ۷: همترازی توالی‌های پروتئینی کاتالاز دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus*. توالی‌های اسیدآمین‌های محافظت شده با ستاره نشان داده شده است.

بررسی همسانی توالی‌های پروتئین ENO نشان داد که توالی‌های این پروتئین در دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* صد درصد هم‌پوشانی و ۸۹/۳۸ درصد شباهت با یکدیگر دارند. مقایسه

Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	MPISKIYARQIFDSRGNPTVEVDLTTEKGLFRAAVPSGASTGIHEALEMRDGDGKAYMGK	60
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	MPITKIFARQIFDSRGNPTVEVDLTTEKGMFRAAVPSGASTGIYEALERLDGDKSAYMGK	60
Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	GVKNVAVNNVNIAPALIAKQFDPVNQTEIDEFMIALDGTENKSKLGANAILGVS LAVCK	120
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	GVKKAVDHVNTIGPAIVSKQNDPVNQTEIDELMINLDGTENKAKFGANAVLGVS LAVCK	120
Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	AGAAHKGVPLFKHIADLAGNTNIVL PVP AF NV INGGSHAGNK LAMQE FMILPTGASNFTE	180
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	AGAAHKGVPLYKHIAADLAGNTNII LPVP AF NV INGGSHAGNK LAMQE FMILPTGASSFTE	180
Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	AMKMGSEVYHHLKGVIKKKFGLDATS VGD EGGFAPNIQDNKEGLELIKEAIELAGYTGKI	240
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	AMKMGTEYHHLKAVIKKKFGLDATS VGD EGGFAPNILDNKA GLELIKEAIELAGYTGKI	240
Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	EIGMDVAASEFHKNGKYDLDFKNPNSDPSTYITPDQLADIYLDIFIKNYPVVSIEDPFDQD	300
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	EIGMDVAASEFHKNGKYDLDFKNPNSDPSTYISPELANIYLDIFIKNYPLVTIEDPFDQD	300
Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	DWDATKLCNSVQIQVGGDLTVTNP KRIQMAVDKKA CNLLLKV NQIGSVTESIKAHNL	360
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	HWDATKFCSSVQIQVGGDLTVTNP KRIQT AIDKKA CNLLLKV NQIGSVTESIKAHNL	360
Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	AKANGWGTMVSHRSGETEDSTIADLVFGLGTCQIKTGAPCRSERLCKYNQILRIIEELGA	420
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	AKANGWGTMVSHRSGETEDSTIADLVVGLGTGQIKTGAPCRSERLCKYNQILRIIEELGS	420
Enolase <i>Androctonus Crassicauda</i>	GAKYAGKNFRHPQ*	433
Enolase <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	NARYAGKNFRCPK*	433

شکل ۸: مقایسه توالی‌های پروتئینی انولاز دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus*. توالی‌های اسیدآمین‌های محافظت شده با ستاره نشان داده شده است.

عقرب *A. crassicauda* بیشترین شباهت را با توالی های *Androctonus australis* و سپس با *Mesobuthus martensii* دارد در حالی که، توالی این پروتئین ها در *H. lepturus* بیشترین شباهت را با توالی عقرب های *Euscorpium italicus* و *Superstitionia donensis* نشان داد (شکل ۹). ترسیم درخت فیلوژنیک توسط برنامه MEGAX و با استفاده از روش Neighbor- Joining و تست بوت اسر تپ ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید (شکل ۹). با توجه به شکل ۹، توالی های موجود علی رغم تشابه اولیه آن ها در سطح اسید آمینه، به دو خوشه اصلی تقسیم شدند. خوشه اول شامل گونه های عقرب خانواده بوتیده (Buthidae) می باشد. در خوشه دوم سه گونه عقرب از خانواده های همی اسکورپیده (Hemiscorpiidae)، اسکورپیده (Euscorpidae) و سوپر استیشنیده (Superstitioniidae) قرار دارند، نتایج نشانگر تشابه زیاد این سه خانواده و جدایی آن ها از خانواده بوتیده است. فاصله ژنتیکی ۷ نمونه عقرب مورد مطالعه نیز در شکل ۹ قابل مشاهده است. بر اساس نتایج، عقرب *A. crassicauda* بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی را به ترتیب با عقرب های *Euscorpium italicus* و *Androctonus australis* دارد در حالی که عقرب *H. lepturus* بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی را به ترتیب با عقرب های *Mesobuthus martensii* و *Superstitionia donensis* نشان داد.



	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>Androctonus crassicauda</i>							
2 <i>Hemiscorpius Lepturus</i>	0.114						
3 <i>Androctonus australis</i>	0.000	0.114					
4 <i>Hottentotta trilineatus</i>	0.011	0.111	0.011				
5 <i>Mesobuthus martensii</i>	0.012	0.117	0.012	0.018			
6 <i>Superstitionia donensis</i>	0.089	0.059	0.089	0.091	0.092		
7 <i>Euscorpium italicus</i>	0.115	0.076	0.115	0.119	0.123	0.033	

شکل ۹: درخت فیلوژنیک توالی های مربوط به ۷ گونه عقرب بر اساس توالی های پروتئینی مربوط به ژن های متابولیسمی Kdn، Tpi.

Eno و Cat، Pgi. ۷ گونه عقرب شامل گونه های *Androctonus crassicauda*، *Hemiscorpius lepturus*، *Androctonus australis*،

Hottentotta trilineatus، *Mesobuthus martensii*، *Superstitionia donensis* و *Euscorpium italicus* می باشند.

در استان خوزستان می باشند. شناسایی و دسته بندی عقرب های استان خوزستان به دلیل فراوانی میزان تنوع گونه های عقرب در این استان از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در مطالعات امروزی روش های مولکولی جهت شناسایی تنوع ژنتیکی و شناسایی گونه های جدید جایگزین

بحث

عقرب های *Androctonus crassicauda* و *Hemiscorpius lepturus*

دو گونه عقرب مهم در زمینه عقرب زدگی و مرگ و میر ناشی از آن

به یکدیگر تبدیل می‌شوند (۶). در واقع بروز اختلال در ژن‌ها در روند تکامل، سبب تولید پروتئین‌هایی با ایزوفرم‌های متفاوت در شبکه‌های متابولیسمی موجودات می‌شود (۲۹). با توجه به این‌که ژن‌های کد کننده این متابولیت‌ها هستند، این مسیرها می‌توانند به عنوان یک منبع اطلاعاتی جدید برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک موجودات باشند (۳۸). علی‌رغم شناخت کم شبکه متابولیسمی در عقرب، تاکنون مطالعه‌ای برای بررسی ژن‌های دخیل در متابولیسم عقرب انجام نشده است. در این مطالعه به منظور درک بهتر شبکه تنظیمی درگیر در متابولیسم این دو گونه عقرب، ابتدا ژن‌های هاب با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های RNA-Seq شناسایی شدند. در این تحقیق سعی کردیم تا تنوع ژنتیکی براساس ژن‌های هاب متابولیسمی متفاوت بیان شده در داده‌های ترانسکریپتوم دو عقرب انجام گردد. براساس نتایج حاصله ۵ ژن (تربوز فسفات ایزومراز، سیترات سنتاز، گلوکز ۶- فسفات ایزومراز، کاتالاز و انولاز) به‌عنوان ژن‌های هاب معرفی شدند. نتایج این مطالعه نشان دادند که این ژن‌های متابولیسمی می‌توانند به‌عنوان مارکرهای مولکولی دقیق برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف عقرب و دسته‌بندی خانواده‌های عقرب استفاده شوند. تاکنون چندین مطالعه استفاده از این ژن‌ها برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها را پیشنهاد کرده‌اند. به‌طور کلی، TPI یک آنزیم گلیکولیتیک است که توسط تمام سلول‌ها بیان می‌شود (۲۰). در مطالعه‌ای از توالی اسیدآمینو این آنزیم گلیکولیتیک برای تعیین روابط تکاملی بین موجودات استفاده شده است، در این مطالعه گزارش شده که آنزیم‌های گلیکولیتیک کرومترهای تکاملی مناسبی هستند، چراکه در همه جا وجود دارند. علاوه بر این، سرعت تکامل آن‌ها به اندازه‌ای آهسته است که امکان استفاده از آن‌ها را برای ردیابی الگوهای کلی تکامل فراهم می‌کند، اما هم‌چنان به اندازه‌ای سریع است که از آن‌ها برای طبقه‌بندی دقیق ارگانسیم‌های نزدیک به هم نیز استفاده می‌شود (۲۵). هم‌چنین، Keeling و Doolittle استفاده از ژن‌های TPI برای تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک یوکاریوت‌ها به‌دلیل مشتق شدن ژن‌های TPI یوکاریوت‌های جدید از یک ژنوم آلفا پروتئوباکتریوم (alpha-proteobacterium) پس از واگرایی Archaea و Eukarya را پیشنهاد کرده‌اند. سیترات سنتاز نیز یک آنزیم است که تقریباً در تمامی سلول‌های زنده جانداران وجود دارد و شامل مناطق حفاظت شده و متغیر است و یک تنظیم کننده کلیدی تولید ATP درون سلولی در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی در نظر گرفته می‌شود. براساس این ویژگی‌ها، سودمندی به‌کارگیری توالی‌های ژن سیترات سنتاز برای تخمین فیلوژنی در بین برخی از گروه‌های باکتریایی مورد تایید قرار گرفته و نتایج آن با نتایج حاصل از بررسی فیلوژنی با توالی‌های ژن ۱۶S rRNA مقایسه شده است. براساس نتایج این

روش سنتی و مورفولوژیکی شده است (۳۳، ۳۴). اخیراً مطالعاتی در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی در این دو گونه عقرب با استفاده از توالی‌های ۱۶S rRNA (۱۷) و توالی DNA ریبوزومی (۷) انجام شده است. تاکنون، تجزیه و تحلیل ژن‌های ۱۶S rRNA قوی‌ترین روش برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین میکروارگانسیم‌ها بود. اما این ژن به عنوان یک ابزار طبقه‌بندی، به‌دلیل وجود محدودیت‌هایی مانند سیر تکاملی آهسته، تلاقی ژنتیکی و به‌دلیل این‌که یک مولکول بسیار حفاظت شده است، ممکن است برای تمایز گونه‌های نزدیک به هم مفید نباشد (۱۶). علاوه بر این، دسته‌بندی گونه‌های مختلف عقرب با روش متداول مولکولی و با به‌کارگیری تکنیک PCR محدود به گونه‌هایی می‌گردد که توالی آن‌ها از قبل مشخص باشد تا با طراحی پرایمر مناسب اقدام به توالی‌یابی ژن مورد نظر گردد اما به‌دلیل کمبود اطلاعات ژنتیکی از گونه‌های عقرب استان خوزستان، برای بهبود دانش روابط فیلوژنتیکی این موجودات نیاز به یک تکنیک قوی‌تری است. اخیراً توالی‌یابی رونوشت به‌طور گسترده برای کشف توالی‌های ژنی جدید در غدد سمی چندین گونه عقرب و بهبود توانایی توصیف ویژگی‌های بیولوژیکی اجزای زهر عقرب استفاده شده است (۳۲، ۱۹). تکنیک RNA-Seq به‌آسانی قادر به تشخیص رونوشت‌ها و ایزوفرم‌ها است. در این روش برای شناسایی ژن‌ها نیاز به اطلاعات قبلی برای طراحی کاوشگرها یا پرایمرها نبوده و می‌تواند سطح بیان ژن رونوشت‌ها را با دقت بسیار خوبی تخمین زد. در مقابل داده‌های microarray، اطلاعات RNA-Seq اجازه می‌دهد که همه ترانسکریپت‌ها بدون داشتن اطلاعات قبلی از توالی ژن‌ها بیان شوند (۳۸). امروزه، برای فهم بهتر شبکه‌های ژنی در موجودات زنده از داده‌های ترانسکریپتومی استفاده می‌شود (۳۶، ۲۸) و رونوشت‌برداری به‌طور خاص، به شکل گسترده‌ای برای بیان تنوع رونوشت‌های غدد زهری گونه‌های متعددی از عقرب‌ها به‌کار برده شده است (۲۷) که از آن جمله می‌توان به خانواده‌های Buthidae, Scorpionidae, Euscorpidae, Caraboctonidae, Liochelidae و Iuridae اشاره کرد، اما تاکنون مطالعات ترانسکریپتومی در مورد گونه عقرب‌های استان خوزستان به‌ویژه مطالعه مقایسه‌ای جهت بررسی ترانسکریپتوم دو گونه عقرب *A. crassicauda* و *H. lepturus* با استفاده از مطالعات توالی‌یابی نسل جدید (RNA-seq) و هم‌چنین استفاده از این تکنولوژی جدید جهت بررسی تنوع گونه‌ای در عقرب‌های استان خوزستان انجام نشده است. در این مطالعه توالی‌یابی ترانسکریپتوم دو گونه مورد مطالعه انجام گردید و بیان ژن‌ها بین دو گونه مقایسه شد. نتایج حاصل از آنالیزها نشان داد که از بین ژن‌های متفاوت بیان شده، ژن‌های دخیل در مسیر متابولیسمی بیش‌ترین درصد را به خود اختصاص دادند. شبکه‌های متابولیسمی شامل شبکه‌ای از متابولیت‌ها و واکنش‌ها و مسیرهایی است که این متابولیت‌ها در آن

می‌گردد که در مطالعات فیلوژنتیکی دیگر نیز از ژن‌های معرفی شده در این مطالعه استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دوره دکتری حرفه‌ای غیرپزشکی مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد خورسگان استخراج شده است. در این مطالعه، داده‌های ترانسکریپتومی عقب از دو پروژه مصوب موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز گرفته شده است که بدین‌وسیله از معاونت محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی اهواز تقدیر و تشکر می‌گردد. ضمناً از همه اساتید و عزیزانی که نویسندگان را در نوشتن این مقاله یاری کرده‌اند صمیمانه تشکر می‌شود.

منابع

1. Akbari, A., Tabatabai S.M., Hedayat, A., Moder Rosta, H., Alizadeh, M.H. and Zare Muslim, K., 1997. Study of geographical distribution of scorpions in southern Iran. *Journal of Research and Construction*. 34: 115-112.
2. Alfonso Prieto, M., Vidossich, P. and Rovira, C., 2012. The reaction mechanisms of heme catalases: an atomistic view by ab initio molecular dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 525(2): 121-130.
3. Ashokan, K.V., Mundaganur, D.S. and Mundaganur, Y.D., 2010. Catalase: Phylogenetic characterization to explore protein cluster. *International Journal of Bioinformatics Research and Application*. 1: 1-8.
4. Bader, G.D. and Hogue, C.W., 2003. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC bioinformatics*. 4(1): 1-27.
5. Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30(15): 2114-2120.
6. Bruggeman, F.J. and Westerhoff, H.V., 2007. The nature of systems biology. *Trends in Microbiology*. 15(1): 45-50.
7. Chahari, K., Jelodar, A. and Jafari, H., 2020. Molecular phylogeny of Scorpion *Hemiscorpius lepturus* based on Sequences Ribosomal DNA in the Internal Transcribed Spacers (ITS2) in Khuzestan province. *Veterinary Research and Biological Products*. 33(4): 112-122.
8. Dehghan, R. and Kassiri, H., 2018. A Checklist of Scorpions in Iran (2017) *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free Full Text Articles from Asian Journal of Pharmacology*. 12(3): 25-29.
9. Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C. and Lempicki, R.A., 2003. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome biology*. 4(9): 1-11.
10. Fet, V., Gantenbei, B., Gromov, A.V., Lowe, G. and Lourenco, W.R., 2003. The first molecular phylogeny of Buthidae (Scorpiones). *Euscorpis*. 4: 1-10.
11. Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R. and Zeng, Q., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnology*.

تحقیق، نتایج شبیه به آن چیزی بود که با استفاده از ۱۶ S rRNA به‌دست آمده بود (۱۶). پیش از این در مطالعه‌ای، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی جامعی از ایزومرازهای گلوکز-۶-فسفات یوکاریوتی و همولوگ‌های پروکاریوتی آن‌ها ارائه شده است (۱۳). گلوکز-۶-فسفات ایزومراز که یک عملکرد اساسی در گلیکولیز کاتابولیک و گلوکونئوز آنابولیک دارد و ایزومریزاسیون برگشت‌پذیر گلوکز-۶-فسفات و فروکتوز-۶-فسفات را کاتالیز می‌کند، به‌طور کلی در تمام یوکاریوت‌ها، باکتری‌ها و برخی آرکیاها یافت می‌شود و به‌دلیل همین گستردگی یک مارکر مولکولی مفید به حساب می‌آید (۱۳). کاتالاز یک آنزیم عمومی است که تقریباً در تمام موجودات زنده که در معرض اکسیژن هستند یافت می‌شود و در آن‌جا تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن را کاتالیز می‌کند، هم‌چنین این آنزیم یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها در محافظت از سلول در مقابل آلودگی اکسیدی به‌وسیله هیدروژن پراکسید است (۲). در مطالعه‌ای از آنزیم کاتالاز گونه‌های مختلف برای بررسی ارتباط فیلوژنتیکی بین ارگانسیم‌های مختلف استفاده شد (۳). براساس گزارش این محققین، تجزیه و تحلیل توالی‌ها نشان داد که کاتالاز یک آنزیم اختصاصی در گونه‌های مختلف است و ساخت درخت فیلوژنتیک با استفاده از آن، رابطه فیلوژنتیکی واضحی را بین گروه‌های طبقه‌های مختلف نشان داد. شواهدی نشان می‌دهند که ابرخانواده این آنزیم‌ها در بین پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها پخش شده و از تولد تا مرگ از روند تکامل خانواده چند ژنی پیروی می‌کنند (۴۱). در مطالعات پیشین، درخت فیلوژنتیک برای پیش‌بینی حفاظت شدگی توالی‌های انولاز و بررسی رابطه تکامل انولاز در گونه‌های مختلف ساخته شده و دسته‌بندی مهره‌داران با استفاده از توالی انولاز انجام شده است. نتایج حاکی از سودمندی استفاده از توالی انولاز برای این منظور می‌باشد (۲۴، ۳۰، ۳۱) ژن انولاز کدکننده نوعی ایزوآنزیم است که در مسیر گلیکولیتیک بسیاری از ارگانسیم‌ها نقش دارد و علاوه بر آن نقش مهمی در رشد و نمو گونه‌های مختلف دارد. در مجموع، ما در این مقاله نشان دادیم که می‌توان با استفاده از مطالعات ترانسکریپتومی به بررسی روابط فیلوژنتیکی بین موجودات مختلف به‌ویژه عقب‌ها پرداخت. علاوه بر این، گزارش کردیم که از بین ژن‌های متفاوت بیان شده در بین دو گونه عقب *H. lepturus* و *A. crassicauda*، ژن‌های دخیل در مسیر متابولیسمی بیش‌ترین درصد را به‌خود اختصاص می‌دهند و از بین آن‌ها ژن‌های، تریوزفسفات ایزومراز، سترات سنتاز، گلوکز-۶-فسفات ایزومراز، کاتالاز و انولاز به‌عنوان ژن‌های متابولیسمی کلیدی معرفی شدند که می‌توانند نشانگرهای کارآمدی برای تشخیص فیلوژنتیکی عقب‌ها باشند. در مطالعه‌ای که توسط گروه ما انجام گردید از ژن انولاز برای بررسی فیلوژنی مولکولی استفاده شد. پیشنهاد

- species and notes on biogeography and phylogenetic relationships. *Revue suisse de Zoologie*. 112(4): 869.
27. **Morgenstern, D., Rohde, B.H., King, G.F., Tal, T. and Sher, D., 2011.** The tale of a resting gland: transcriptome of a replete venom gland from the scorpion *Hottentotta judaicus*. *Toxicon*. 57: 695-703.
 28. **Mozduri, Z. and Qaderzadeh, M., 2017.** Study gene regulatory network in lactogenesis in dairy cow mammary tissue using RNA-seq data. *Animal Sciences (Research and Construction)*. 30(115): 193-205.
 29. **Patwardhan, A., Ray, S. and Roy, A., 2014.** Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*.
 30. **Piast, M., Kustrzeba Wójcicka, I., Matusiewicz, M. and Banaś, T., 2005.** Molecular evolution of enolase. *Acta Biochimica Polonica*. 52(2): 507-513.
 31. **Pon dehnezhadan, E., Chamani, A., Salabi, F. and Soleimani, R., 2022.** Identification, characterization and molecular phylogeny of scorpion enolase (*Androctonus crassicauda* and *Hemiscorpius lepturus*). *Toxin review*.
 32. **Rendo, N., Anaya, M., Delaye, L., Possani, L.D. and Herrera Estrella, A., 2012.** Global Transcriptome Analysis of the Scorpion *Centruroides noxius*: New Toxin Families and Evolutionary Insights from an Ancestral Scorpion Species. *PLoS ONE*. 7(8): e43331. doi:10.1371/journal.pone.0043331.
 33. **Rohipoor, M. and Nazari, M., 2019.** Genetic and Phylogenetic Analysis of Adani Goat Population Based on Cytochrome B Gene. *Research On Animal Production*. 10(26): 84-89.
 34. **Rohipoor, M. and Nazari, M., 2021.** Population structure, Genetic diversity and phylogenetic analysis of control region of mtDNA in Adani goat breed. *Journal of Modern Genetics*. 15(4): 297-304.
 35. **Santibáñez López, C., Ojanguren Affilastro, A. and Prashant, P., 2020.** Another one bites the dust: taxonomic sampling of a key genus in phylogenomic datasets reveals more non-monophyletic groups in traditional scorpion classification. *Invertebrate Systematics*. 34: 133-143.
 36. **Shahabi, A., Por Mojtaba, T. and Kazemipour, A., 2019.** Reconstruction, analysis and comparison of Gene Networks Topology Based on Rna-Seq Data Involved in Reproductive and Fertility Complex Traits. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 11(2): 57-78.
 37. **Soleglad, M.E., Fet, V. and Kovarik, F., 2005.** The systematic position of the scorpion genera *Heteroscorpion* Birula, 1903 and *Urodacus* Peters, 1861 (Scorpiones: Scorpionoidea). *Euscorpium*. 20: 1-38.
 38. **Temate Tiagueu, Y., Al Seesi, S., Mathew, M., Mandric, I., Rodriguez, A., Bean, K., Cheng, Q., Glebova, O., andoiu, I.B., Lopanik, N. and Zelikovsky, A., 2016.** Inferring metabolic pathway activity levels from RNA-Seq data. *BMC Genomics*. 17(5): 542.
 39. **Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*. 22: 4673-4680.
 40. **Wiegmann, B.M., Mitter, C., Regier, J.C., Friedlander, T.P., Wagner, D.M. and Nielsen, E.S., 2000.** Nuclear genes resolve mesozoic-aged divergences in the insect order Lepidoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 15: 242-259.
 41. **Zámocký, M., 2004.** Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal & plant peroxidases. *European Journal of biochemistry*. 271(16): 3297-3309.
 12. **Grashof, D.G.B., Kerckamp, H., Archer, S.A., Harris, J., Richardson, M.K., Vonk, F.J. and Meijden, A., 2019.** Transcriptome annotation and characterization of novel toxins in six Scorpion species. *BMC Genomics*. 20: 645- 655.
 13. **Grauvogel, C., Brinkmann, H. and Petersen, J., 2007.** Evolution of the glucose-6-phosphate isomerase: the plasticity of primary metabolism in photosynthetic eukaryotes. *Molecular biology and evolution*. 24(8): 1611-1621.
 14. **Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N. and Regev, A., 2013.** De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*. 8: 1494-1512. DOI 10.1038/nprot.2013.084.
 15. **Harms, D., Robrts, J.D. and Harvey, M., 2019.** Climate variability impacts on diversification processes in a biodiversity hotspot: a phylogeography of ancient pseudoscorpions in south-western Australia. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 186: 934-952.
 16. **Hernández Lucas, I., Rogel-Hernández, M. A., Segovia, L., Rojas-Jiménez, K. and Martínez Romero, E., 2004.** Phylogenetic relationships of Rhizobia based on citrate synthase gene sequences. *Systematic and applied microbiology*. 27(6): 703-706.
 17. **Jafari, H., Salabi, F., Navidpour, S.H. and Forouzan, S.H., 2020.** The phylogenetic and morphological analyses of *Androctonus crassicauda* from Khuzestan province (Scorpiones: Buthidae). *Razi Vaccine and Serum Research Institute*. 10.22092/ari.2020.342071.1451.
 18. **Jeyaprakash, A. and Hoy, M.A., 2009.** First divergence time estimate of spiders, scorpions, mites and ticks (Sub phylum: Chelicerata) inferred from mitochondrial phylogeny. *Experimental and Applied Acarology*. 47: 1-18.
 19. **Kazemi Lomedasht, F., Khalaj, V., Bagheri, K.P., Behdani, M. and Shahbazzadeh, D., 2017.** The first report on transcriptome analysis of the venom gland of Iranian scorpion, *Hemiscorpius lepturus*. *Toxicon*. 125: 123-130.
 20. **Keeling, P.J. and Doolittle, W.F., 1997.** Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha proteobacterial origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(4): 1270-1275.
 21. **Kovarik, F. and Ahmed, Z., 2013.** A Review of *Androctonus Finitimus* Fet, V., Gantenbein, B., Gromov, A., Lowe, G. and Lourenço, W.R., 2003. The First Molecular Phylogeny of Buthidae (Scorpiones). *Euscorpium*. 4: 1-10.
 22. **Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K., 2018.** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 35: 1547-1549.
 23. **Li, B. and Dewey, C.N., 2011.** RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*. 12(1): 1-16.
 24. **Liu, K.C., Liu, C., Fan, M.X., Zhang, C.Y., Cai, F.C., Li, Q.Y. and Lin, F., 2019.** Phylogenetic analysis of enolase gene family in different species. *Applied Ecology and Environmental Research*. 17(5): 11537-11550.
 25. **Michels, P.A.M., Opperdoes, F.R., Hannaert, V., Wiemer, E.A.C., Allert, S. and Chevalier, N., 1992.** Phylogenetic analysis based on glycolytic enzymes. *Belgian journal of botany*. 164-173.
 26. **Monod, L. and Lourenco, W.R., 2005.** Hemiscorpiidae (Scorpiones) from Iran, with descriptions of two new