Archive of SID

تشخیص گونه‌های A و B کمپلکس آنوفل کولیسیفاسیس مهمترین ناقل مالاریا در منطقه بلوچستان به روش mtDNA PCR-RFLP؛ اولین گزارش از وجود گونه B در ایران

دکتر محمدعلی عشاقی[۱]، بهروز تقی‌لو[۲]، محمدتقی مرادی[۲]، دکتر حسن وطن‌دوست[۱]

Title: *Detecting the Anopheles culicifacies complex, species A and B in Baluchestan using mtDNA PCR-RFLP assay; the first report of species B from Iran.*

Authors: *Oshaghi MA, (PhD); Taghilo B,(MSc); Moradi MT,(MSc); Vatandoost H,(PhD).*

Introduction: *Mosquitoes of the Anopheles culicifacies complex are one of the main malaria vectors in Indian subcontinent and Middle East countries as well as in Iran. Based on cytological characteristcs there are five morphologically indistinguishable species in this complex that called A, B, C, D and E. These species have got different biological and behaviour characteristics, and show different vectorial capacity.*

Methods: *Due to problems inherent in the cytological studies a DNA based method mtDNA PCR-RFLP was conducted to study genetic variation and it's utility in identifying species composition of the complex in Baluchestan district of Iran. A 1512 bp mtDNA of cytochrome oxidase subunit I and II (COI-COII) or an 875 bp mtDNA of COI were amplified and treated by different restriction enzymes (PCR-RFLP).*

Results: *Results of this study showed that at least two species, A and B, of the complex are present in the region. This is the first report on the occurrence of species B in Iran. In addition to species A and B, there were some other haplotypes within the specimens which represent either the occurrence of other members of the complex (persumably species E) or intraspecies variation.*

Conclusion: *These results are very important in epidemiology of malaria in the region and will be remain to be confirmed by further cytological and molecular works.*

Keywords: *Anopheles culicifacies complex, species A, species B, PCR-RFLP, mtDNA, Cytochrome oxidase subunit I and II (COI-II), Baluchestan, Iran.*

۱- گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقاتی بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- گروه حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *پشه‌های آنوفل کولیسیفاسیس کمپلکس یکی از مهمترین ناقلین بیماری مالاریا در شبه قاره هند و کشورهای خاورمیانه از جمله ایران می‌باشند. به کمک مطالعات سیتوژنتیک و کروموزومی تا کنون پنج گونه سیبلینگ در این گروه به نام‌های A , B , C , D و E شناسائی شده است. این گونه‌ها از نظر خصوصیات ظاهری غیرقابل تشخیص می‌باشند، در حالیکه از نظر قدرت انتقال بیماری, عادات خونخواری و بیولوژیکی کاملا متفاوت می‌باشند.*

روش‌کار: *بعلت مشکلات روش‌های کروموزومی، در این تحقیق با استفاده از یک روش وابسته به DNA، به مطالعه تغییرات ژنتیکی ژنوم میتوکندری DNA نمونه‌ها به روش PCR-RFLP پرداخته و از آنها برای شناسائی و تعیین گونه‌های سیبلینگ کولیسیفاسیس منطقه بلوچستان ایران استفاده شد. منطقه سیتوکروم اکسیداز شماره ۱ (COI) بطول ۸۷۵ bp و یا سیتوکروم اکسیداز شماره ۱ و ۲ (COI-II) بطول ۱۵۱۲bp تکثیر یافته و با آنزیمهای قطع کننده، مورد تیمار قرار گرفتند.*

نتایج: *نتایج حاصله نشان دادند که حداقل دو گونهٔ A و B کمپلکس در منطقهٔ بلوچستان ایران وجود دارندکه این اولین گزارش از وجود گونه B در ایران می‌باشد. علاوه بر این چندین هاپلوتایپ دیگر هم در بین نمونه‌ها مشاهده شدند که حدس زده می‌شود سایر گونه‌های این کمپلکس نیز در ایران وجود داشته باشد (احتمالاً گونه E).*

نتیجه‌گیری: *این نتایج باید با مطالعات بیشتر سیتولوژیکی و ملکولی از جمله تعیین توالی ژن‌های مذکور تکمیل شود تا وضعیت این گونهٔ کمپلکس در ایران کاملاً مشخص گردد. نتایج حاصل از این مطالعه از نظر اپیدمیولوژی بیماری حائز اهمیت بوده و می‌تواند در برنامه‌ریزی کنترل بیماری منطقه بکار گرفته شود.*

گل‌واژگان: *مالاریا، آنوفلس کولیسیفاسیس کمپلکس، گونه A و B، DNA میتوکندری، سیتوکروم اکسیداز شماره ۱و۲، بلوچستان، ایران.*

مقدمه:

بیماری مالاریا یکی از مهمترین بیماری‌های عفونی در دنیا بوده که در دهه ۲۰۰۰-۱۹۹۰ سالیانه ۲/۷-۱/۵ میلیون نفر بر اثر آن جان خود را از دست داده‌اند (۱). در ایران نیز وفور این بیماری در طی سال‌های ۸۱-۱۳۸۰ برابر ۱۹۱۹۹ نفر بوده که اکثر این موارد مربوط به مناطق جنوب و جنوب شرقی کشور می‌باشد (۲). در حال حاضر در ایران استان‌های سیستان و بلوچستان, هرمزگان، و قسمت گرمسیری استان کرمان بیشترین موارد مالاریای کشور را به خود اختصاص داده‌اند و در حدود ۸۰٪ از کل موارد مالاریای کشور از این سه استان گزارش می‌شود. عوامل مختلفی از جمله مساعد بودن شرایط اقلیمی برای ناقلین مالاریا، نقل و انتقالات جمعیت، فقر فرهنگی، مقاومت به حشره‌کش‌ها، مقاومت داروئی در انگل‌های مالاریا، وجود گونه‌های سیبلینگ، و بسیاری عوامل دیگر موجب شده است که مالاریا در منطقه بلوچستان بعنوان مشکل اساسی مطرح و بیشترین موارد مالاریایی کشور از این استان گزارش شود (۳). بیماری مالاریا در استان سیستان و بلوچستان از نظر بهداشتی و اقتصادی دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد و از همین رو مطالعه ناقلین و اپیدمیولوژی بیماری جهت حل این مشکل امری ضروری به نظر می‌رسد. یکی از اصول اساسی و مهم مطالعات اپیدمیولوژیکی و نیز مبارزه با ناقلین بیماری، شناخت کافی از ترکیب گونه‌های آنوفل منطقه و نیز شناخت اکولوژی و بیولوژی آنها می‌باشد. با توجه به اینکه گونه‌های کمپلکس از لحاظ اکولوژی، خصوصیات رفتاری و عادات خونخواری الگوهای متفاوتی را دارا می‌باشند، لذا شناخت این گونه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این اطلاعات در برنامه‌های کنترل بیماری و طرح‌ریزی برنامه‌های مناسب‌تر از نقش مهمی برخوردار می‌باشند (۳).

مطالعات انجام شده در نیم قرن اخیر نشان داده که قریب به ۱۹ گونه آنوفل در ایران وجود دارد که از این تعداد ۸ گونه تاکنون بعنوان ناقل مالاریا شناخته شده‌اند. پشه‌های آنوفل کولیسیفاسیس[1] بعنوان یکی از ناقلین اصلی مالاریا در جنوب شرق آسیا و جنوب شرقی ایران شناخته شده‌اند (۴). این گونه

[1] - *Anopheles culicifacies*

www.SID.ir

Archive of SID

شامل چند گونه سیبلینگ[1] بوده که از نظر مرفولوژیک غیرقابل تشخیص می‌باشند. تا کنون ۵ گونه سیبلینگ از این گروه بنام‌های A , B , C , D و E بکمک مطالعات سیتوژنتیکی شناسائی ومعرفی شده است (۵). اعضای این کمپلکس از نظر بیولوژی و قدرت انتقال بیماری متفاوت از هم می‌باشند. گونهٔ A و E از ناقلین اصلی مالاریا محسوب می‌شوند در حالیکه بقیه اعضا از ناقلین ضعیف محسوب می‌شوند و یا هیچگونه نقشی در انتقال بیماری ندارند (۷و۶). بر اساس مطالعات سیتوژنتیک که قبلاً در منطقه سیستان و بلوچستان ایران انجام شده فقط گونهٔ A شناسائی شده است (۸).

تعداد متنوعی از تکنیک‌ها نظیر مطالعات تلاقی بین گونه[2]ها (۹)، تجزیه و تحلیل هیدروکربورهای پوست[3] (۱۰)، نشانگرهای ملکولی[4] (۱۱)، ایزوآنزیم[5]ها (۱۲) وکروموزوم‌های پلی تن[6] و میتوتیک[7] (۱۵-۱۳) تا کنون جهت شناسائی گونه‌های کمپلکس توسعه یافته است. از بین روش‌های فوق، مرسوم‌ترین روش جهت شناسائی اعضای کمپلکس آنوفل کولیسیفاسیس، استفاده از کروموزوم‌های پلی تن سلول‌های میزبان تخمدان[8] پشه‌های ماده می‌باشد (۱۵). این روش محدودیت‌های زیادی دارد و از جمله به مرحله خاصی از زندگی (پشه نیمه باردار زنده و تازه) و جنس ماده نیاز دارد و در عین حال روشی بسیار پیچیده و مشکل می‌باشد. اخیراً از روش‌های آسانتر و حساس‌تری بویژه PCR[9] برای تفکیک گونه‌های کمپلکس استفاده می‌گردد (۱۶). در این گونه‌روش‌ها هر دو جنس و همه مراحل رشد حشرات مورد استفاده قرار گیرد و نیزDNA می‌تواند از نمونه‌هایی که به روش‌های ساده و مختلف نگهداری شده‌اند، استخراج و احیاء گردند. اخیراً از روش PCR-RFLP برای تفکیک گونه‌های کمپلکس کولیسیفاسیس استفاده شده است (۱۸و۱۷). در این روش به کمک پرایمرهای اختصاصی بخشی از ژنوم میتوکندری[10] (mtDNA) یا ژنوم هسته از قبیل ژن‌های ریبوزومال[11] (rDNA) نمونه‌ها تکثیر و با توجه به تفاوتهای موجود در توالی اسیدهای نوکلئیک تنوع ژنتیکی ژنهای مورد نظر به کمک آنزیم‌های هضم کننده (restriction enzymes) مورد مطالعه قرار گرفتند.

در این مطالعه از روش PCR جهت تکثیر بخشی از ژن‌های سیتوکروم اکسیداز شماره ۱ و ۲ (COI-II)[12] ژنوم میتوکندری (mtDNA) استفاده شده و سپس به کمک آنزیم‌های هضم کننده به بررسی تفاوتهای ژنتیکی نمونه‌های آنوفل کولیسیفاسیس منطقه بلوچستان ایران پرداخته‌ایم.

روش کار:

در این بررسی پشه‌های مورد مطالعه در دو پیک فعالیت آنها (خرداد و مهر ماه) سال ۱۳۸۱ از منطقه بلوچستان ایران شامل شهرستانهای ایرانشهر، نیکشهر و چابهار جمع‌آوری گردید. از هر شهرستان ۳-۲ روستا انتخاب و پس از شناسائی اماکن مناسب انسانی و حیوانی، برای صید از روش توتال[13] و هند کچ[14] و همچنین از شیلترپیت[15] ایجاد شده در اطراف روستاها و همچنین صید هندکچ بصورت گزش شبانه اقدام شد. نمونه‌ها تا سطح گونه بروش میکروسکوپی و بکمک کلیدهای مورفولوژیک (۱۹) شناسائی و نمونه‌های کولیسیفاسیس جدا گردیدند.

در روستاهایی که به علت سم پاشی‌های انجام شده نمونه بالغ یافت نمی‌گردید و یا زمان صید بالغ مناسب نبود از زیستگاه‌های لاروی اقدام به صید لارو سن ۴ و شفیره نموده و پس از پرورش لارو و شفیره و تبدیل شدن آنها به پشه بالغ، نمونه‌های مربوط به کولیسیفایس جمع‌آوری و برای مطالعه بصورت انفرادی داخل یک تیوپ گذاشته و به آزمایشگاه ملکولی انتقال داده شدند. سپس DNA نمونه‌ها به روش‌های استاندارد (۲۱و۲۰) استخراج و با تکنیک PCR و پرایمرهای COI(F) با توالی 5'-TTGATTTTTIGGTCATCCAGAAGT-3' (۲۲) و CUL(R) با توالی 5'– TAGAGTTAAATTCATTGCACTAATC–3' (۱۷) به تکثیر (Amplification) بخشی از ژن سیتوکروم اکسیداز شماره I (COI) به طول حدود ۸۷۵ bp و با استفاده از پرایمرهای COI(F) و COII(R) (۲۳) با توالی 5'–CCACAAATTTCTCAACATTGACC–3' به تکثیر

[1] - Sibling
[2] - Cross studies
[3] - Cuticular hydrocarbone analysis
[4] - DNA probe
[5] - Isoenzymes
[6] - Polytene chromosomes
[7] - Mitotic chromosomes
[8] - Ovarian nurse cell
[9] - Polymerase chain reaction
[10] - Mitochondrial DNA
[11] - Ribosomal DNA
[12] - Cytochrome oxidase subunits I and II
[13] -Total catch
[14] - Hand catch
[15] - Pit shelter

www.SID.ir

Archive of SID

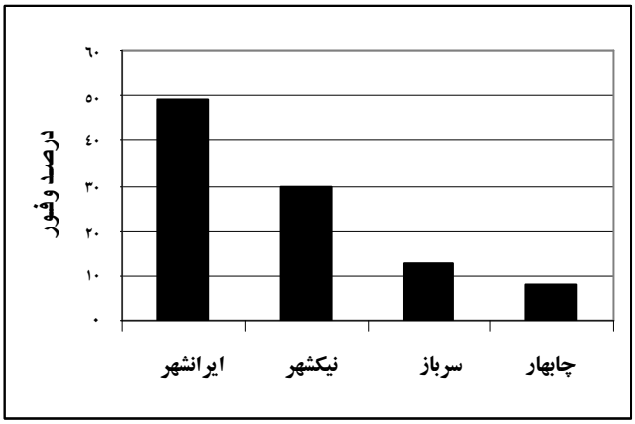
بخشی از ژنهای سیتوکروم اکسیداز شماره II و I (COI-II) به طول حدود ۱۵۱۲ bp پرداخته شد. در این آزمایشات حجم نهایی هر واکنش ۲۵میکرولیتر درنظر گرفته و غلظت مواد طبق پروتکل زیر تهیه گردید:

20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl2, 0.5 mM dNTPs, 1 unit Taq polymeras (Amersham), 1% of total DNA(i.e 1 µl), 1 µM of each primer.

در این آزمایش از برنامه حرارتی زیر برای تکثیر DNA استفاده شد: ۵ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد، سپس ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۹۵ درجه ۱ دقیقه، ۵۵ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه ۲ دقیقه و در مرحله آخر ۷ دقیقه در حرارت ۷۲ درجه. برای مشاهده نتایج، محصولات PCR در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شده و با مارکرهای ملکولی شماره ۶ و ۸ (Roche) مقایسه شدند. تنوع ژنتیکی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از انواع آنزیم‌های قطع کننده از قبیل *Taq*I, *Eco*RV, *Alu*I, *Hind*III, DraI انجام شد (۲۳). محصولات PCR تیمار شده با آنزیم‌های قطع کننده در ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شده و با مقایسه با مارکرهای شماره ۶ و ۸ (Roche) به مطالعه اختلافات ژنتیکی آنها پرداخته شد. جهت تعیین نقشهٔ ژنتیکی[1] از تکنیک Double Digestion (۲۴) و مخلوط *Eco*RV و *Hin*dIII استفاده شد. باندهای حاصل از هضم آنزیمی با باندهای گونه های کمپلکس کولیسیفاسیس و توالی های ژن COI این گونه کمپلکس که توسط عشاقی و همکاران (۱۷) در بانک ژن‌ها[2] با شماره‌های AF116829, AF116834 و AF11793-AF117802 منتشر شده‌اند مقایسه شدند. باندهای حاصله پس از رنگ آمیزی با اتیدیم بروماید بوسیلهٔ دستگاه Ultra Violet Transilluminator مورد مشاهده قرار گرفته و در صورت لزوم توسط دستگاه gel scanner از آنها عکس تهیه شد.

یافته‌ها:

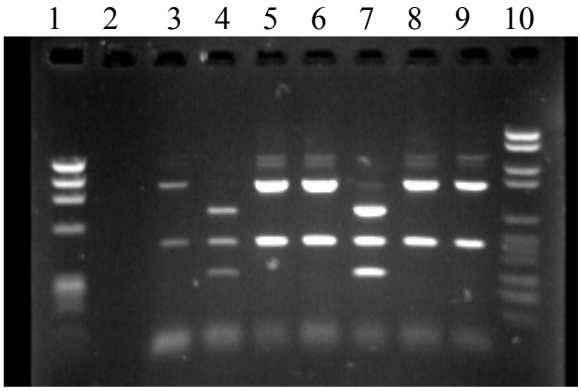
پس از جمع‌آوری پشه‌ها از روستاهای منطقه بلوچستان در دو مرحله در پیک فعالیت آنها (خرداد و مهرماه)، نمونه‌ها تا حد گونه شناسایی شدند. در حدود ۵۹۶ عدد از نمونه‌ها متعلق به گونه آنوفل کولیسیفاسیس بوده که DNA همه آنها استخراج شده و اکثریت آنها (۸۰٪) به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. وضعیت وفور پشه‌های انوفل کولیسیفاسیس در منطقه به تفکیک شهرستان در نمودار ۱ نمایش داده شده است.



نمودار ۱- وفور نسبی پشه‌های آنوفل کولیسیفاسیس در منطقه بلوچستان به تفکیک شهرستان

پشه‌های این گونه در شهرستان ایرانشهر بالاترین وفور و در شهرستان چابهار کمترین وفور را داشتند.

نتایج بررسی‌های ملکولی نشان می‌دهد که حداقل در منطقه مورد مطالعه دو گونه A و B کولیسیفاسیس وجود دارند. این نتیجه‌گیری بر اساس تفاوت طول باندهای حاصل از هضم قطعه سیتو کروم اکسیداز شماره ۱ (COI) و یا ۱ و ۲ (COI-COII) با آنزیمهای مختلف بویژه آنزیم *Eco*RV و مقایسه با نتایج مطالعات ملکولی قبلی حاصل شد.



شکل ۱- تصویر باندهای حاصل از هضم محصول PCR ژنهای سیتوکروم اکسیداز شماره ۱ و ۲ میتوکندری (mtDNA COI-COII) بطول ۱۵۱۲ bp توسط آنزیم *Eco*RV در آنوفل کولیسیفاسیس منطقه بلوچستان ایران: شماره های ۱و۱۰مارکر ملکولی, شماره۲ کنترل منفی, شماره های ۳و ۵و ۶و ۸و ۹ گونه A با باندهای به طول تقریبی ۱۰۲۸bp و ۴۸۴bp, و شماره‌های ۴و۷ گونه B با باندهای به طول تقریبی ۷۱۲bp, ۴۸۴bp و ۳۳۰bp.

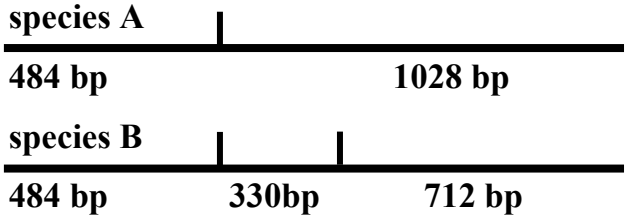
[1] - Physical map
[2] - GeneBank

www.SID.ir

Archive of SID

در بین آنزیم‌های مورد آزمایش آنزیم *Eco*RV تنوع ژنتیکی این دو گونه را بهتر و آسانتر نمایش می‌دهد. در نتیجه هضم قطعهٔ ۱۵۱۲ bp مربوط به ژنهای COI-COII با این آنزیم، در گونهٔ A دو باند به طول تقریبی ۱۰۲۸ bp و ۴۸۴ bp و در گونهٔ B سه باند به طول تقریبی ۷۱۲bp و ۴۸۴ bp و ۳۳۰ bp حاصل می‌شود (شکل ۱).

با کمک نتایج حاصل از PCR-RFLP و تکنیک Double digestion نقشهٔ ژنتیکی مربوط به آنزیم *Eco*RV قطعه COI-COII تهیه شد (شکل ۲). مشاهدات نتایج حاصل از PCR-RFLP نشان دادند که علاوه بر دو هاپلوتایپ مخصوص به گونهٔ A و B، فرمها یا هاپلوتایپ‌های دیگری در بین نمونه‌های گونه کولیسیفاسیس صید شده از منطقه بلوچستان ایران وجود دارد که می‌توانند دلیلی بر وجود سایر گونه‌های کمپلکس کولیسیفاسیس یا اختلافات داخل گونه‌ای و بطور کلی نشان دهنده تنوع ژنتیکی بسیار بالا داخل یا بین سیبلینگهای این گونه باشد. با توجه به مطالعات قبلی حدس زده می‌شود که یکی از این هاپلوتایپ‌ها متعلق به گونه E باشد. نتایج نشان دادند که گونهٔ A با ۸۰٪ وفور، گونه غالب منطقه می‌باشد و گونه B با ۸٪ و سایر هاپلوتایپ‌ها با ۱۲٪ وفور در منطقه وجود دارند. بیشترین تنوع ژنتیکی در منطقه قصرقند وجود داشت به نحوی که همه انواع هاپلوتایپ‌ها ذکر شده بطور همزمان[1] در آنجا مشاهده شد. تعداد این هاپلوتایپها مجموعا به ۸ عدد می‌رسید که هم اکنون برای حصول نتایج قطعی‌تر نمونه‌هایی از محصولات PCR ژنهای COI و COII این هاپلوتایپها در حال تعیین توالی می‌باشند.



شکل ۲- نقشه ژنتیکی (physical map) و محل برش آنزیم *Eco*RV در طول ژنهای سیتوکروم اکسیداز شماره ۱ و ۲ میتوکندری (mtDNA COI-COII) بطول ۱۵۱۲ bp در آنوفل کولیسیفاسیس منطقه بلوچستان ایران.

[1] - Sympatric

بحث:

نتایج این مطالعه ملکولی که برای اولین بار در منطقه بلوچستان ایران انجام گرفته نشان داد که حد اقل دو گونه A , B. در ایران وجود دارند که این اولین گزارش از وجود گونه B در ایران می‌باشد. نتایج مطالعات سیتولوژیکی انجام شده توسط سایر محققین در منطقه بلوچستان حاکی از وجود تنها گونه A می‌باشد و کشف گونه B در منطقه حاکی از حساسیت بالای روش بکارگرفته شده می‌باشد. از دلایل دیگر اختلاف در نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات قبلی میتوان به محدودیت‌های روشهای سیتوژنتیکی، تعداد نمونه‌ها، و نیز وسعت منطقه مورد مطالعه اشاره نمود.

در این بررسی، علاوه بر وجود حداقل دو گونه A و B، چندین هاپلوتایپ دیگر نیز مشاهده شد که بر این اساس حدس زده می‌شود که تعداد گونه‌های موجود در منطقه باید بیش از ۲ گونه A و B باشد و احتمالا گونه E نیز وجود دارد. با اینحال برای اثبات آن باید مطالعات بیشتری انجام پذیرد. این گونه که از نظر خصوصیات سیتولوژیکی مشباهت زیادی به گونه B دارد در سال ۱۹۹۹ شناخته شد (۵) و یکی از ناقلین اصلی مالاریا در هند و سریلانکا محسوب می‌شود.

گونه‌های A و E ناقلین درجه یک و مهم مالاریا در مناطق انتشارشان می‌باشند در حالیکه گونه B ناقل نیست. در مطالعاتی که بر روی گونه‌های سیبلینگ آنوفل کولیسیفاسیس در شبه قارهٔ هند و سایر کشورها انجام شده مشخص شده که گونه های E و A , B از نظر پراکندگی جغرافیایی، محل زیست، آنتروپوفیلی، عادات خونخواری و پتانسیل انتقال بیماری مالاریا و مقاومت به حشره‌کش‌ها با هم متفاوت هستند (۷-۵). با توجه به اینکه آنوفل کولیسیفاسیس ناقل اصلی مالاریا در جنوب شرقی ایران محسوب می‌شود و انتقال بیماری هم در منطقه بطور فعال و اندمیک صورت می‌پذیرد، اطلاعات بدست آمده در این تحقیق از نظر اپیدمیولوژی بیماری در منطقه اهمیت بسیار زیادی دارد و می‌تواند در برنامه‌های مبارزه، کنترل و ریشه‌کنی بیماری مالاریا و نیز ارزشیابی اثر حشره‌کش‌ها در منطقه مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به اینکه روش‌های وابسته به DNA آسانتر و حساستر از سایر روش‌ها از جمله روش سیتوژنتیک می‌باشند، لذا بکارگیری متدهای جدید ملکولی از جمله PCR جهت درک بهتر اپیدمیولوژی و کنترل ناقلین بیماری مالاریا ضروری به نظر می‌رسد. بکارگیری روش‌های وابسته به DNA هم اکنون در

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات سیستماتیک و طبقه‌بندی موجودات مختلف از جمله حشرات در سطوح مختلف طبقه‌بندی مرسوم شده است. روش mtDNA PCR-RFLP جهت تفکیک اعضاء گونه‌های کمپلکس

از جمله کمپلکس آنوفل کولیسیفاسیس متعلق به کشورهای هند، پاکستان، یمن، سریلانکا و نمونه‌های محدودی از ایران بکار گرفته شد و نشان داد که تنوع ژنتیکی بسیار بالایی بین اعضای این کمپلکس وجود دارد به نحوی که گونه A و B براحتی از همدیگر تفکیک می‌گردند (۱۷). همچنین سایر مطالعات ملکولی وابسته به DNA با استفاده از ژنهای ریبوزومی DNA و میتو کندری نشان داده است که تکنیک‌های وابسته به DNA بخوبی می‌توانند در جدا سازی گونه‌های این کمپلکس از یکدیگر بکار گرفته شوند (۲۵).

نتیجه‌گیری:

در منطقه بلوچستان ایران بخصوص شهرستان قصرقند علاوه بر گونه A گونه B کمپلکس کولیسیفاسیس نیز وجود دارد. علاوه بر این احتمال دارد که سایر گونه‌ها بویژه گونه E نیز وجود داشته باشند. چنانچه بخواهیم با احتیاط بیشتر نتیجه‌گیری کنیم می توان بیان نمود که تنوع ژنتیکی بسیار بالایی در سطوح مختلف داخل گونه‌ای، بین گونه‌ای (inter- and intra-specific) و نیز بین جمعیت‌ها وجود دارد. بهر حال این نتایج بایستی با سایر مطالعات ژنتیکی بخصوص با تعیین توالی (sequencing) ژنهای مورد مطالعه و نیز سایر بخش‌های ژنوم مثل ITS2 (rDNA) و نیز مطالعات سیتولوژیک بخصوص پلی‌تن کروموزوم تکمیل و مورد تأیید قرار گیرد. علاوه بر این با توجه به پراکندگی این گونه در مناطق جنوب شرقی ایران لازم است بررسیهای وسیع و همه جانبه در باره وجود گونه‌های سیبلینگ آنوفل کولیسیفاسیس در تمام نقاط انتشار آن در ایران انجام گیرد و با سایر مطالعات اپیدمیولوژیک مالاریا همراه گردد تا نتایج بهتر و کاربردی‌تری جهت کنترل مالاریا در کشور بدست آید.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از گروه حشره‌شناسی پزشکی دانشکدهٔ بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، مسئول ایستگاه تحقیقاتی ایرانشهر جناب آقای دکتر ناطق‌پور و مهندس اکبرزاده و نیز گروه حشره شناسی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بخاطر کمکهای علمی و اجرایی آنها تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1- Sadrizadeh B. Malaria in the world, in the Eastern Mediterranean region and in Iran. WHO/EMRO Report: 1-13 1999: Web Journal Available at: http://pearl.sams.ac.ir/AIM/9924/sadrizadeh9924.html.

۲- اداره کل مبارزه با بیماریها ی واگیر. گزارش انتشار مالاریا در ایران ۱۳۸۰، انتشارات وزارت بهداشت.

3- Zaim M. Malaria control in Iran, present and future. J Am Mosq Con Assoc 1987; 3:392-396.

۴- ظهیرنیا، ا. بررسی خصوصیات و ظرفیت انتقال مالاریا در منطقه قصرقند بلوچستان ایران، پایان نامه دکتری دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۱۳۷۷.

5- Kar I, Subbarao SK, Eapen A, et al. Evidence for a new malaria vector species, species E, within the *Anopheles culicifacies complex* (Diptera: culicidae). J Med Entomol 1999; 36(5), 595-600.

6- Subbarao SK. Malariogenic stratification of INDIA using *Anopheles culicifacies* sibling species prevalence. ICMR Bull. 1999; 29(7): 1-6.

7- Subbarao SK, Adak T, Vasantha K, et al. Susceptibility of *Anopheles culicifacies* species A and B to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* as determined by immunoradiometric assay. Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82(3): 394-7.

8- Zaim M, and Javaherian Z. Occurrence of *Anopheles culicifacies* species A in Iran. J Am Mosq Control Assoc 1991; 7: 324-6.

9- Subbarao SK, Nanda N, Chandrahas RK, et al. *Anopheles culicifacies* complex: cytogenetic characterization of Rameshwaram island populations. J Am Mosq Control Assoc 1993; 9(1): 27-31.

10- Milligan PJM, Phillips A, Molyneux DX, et al. Differentiation of *Anopheles culicifacies* Giles (Diptera: Culicidae) sibling species by analysis of cuticular components. Bull Entomo Research 1986; 76: 529-37.

11- De Silva BG, Gunasekera MB, Abeyewickreme W, et al. Screening of *Anopheles culicifacies* population of Sri Lanka for sibling species A. Indian J Malariol 1998; 35(1): 1-7.

12- Adak T, Subbarao SK, Sharma VP, et al. Lactate dehydrogenase allozyme differentiation of species in the *Anopheles culicifacies* complex. Med vet Entomol 1994; 8: 137-40.

13- Breland OP. Studies on the chromosomes of mosquitoes. Ann Entomol Soc Am. 1961; 54: 360-75.

14- Surendra SN, Abhayawardana TA, De Silva BG, et al. *Anopheles culicifacies* Y-chromosome dimorphism indicates sibling species (B and E) with different malaria vector potential in Sri Lanka. Med Vet Entomol 2000; 14(4): 437-40.

www.SID.ir

Archive of SID

15- Saifuddin VT, Baker RH, Kakai K. The Chromosomes of *Anopheles culicifacies*. Mosq News 1978; 38: 233-9.

16- Collins FH, Paskewits SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles species*. Insect Mol Biol 1996; 5(1): 1-9.

17- Oshaghi MA. The use of mitochondrial DNA in the molecular systematics of malaria vectors. PhD thesis, University of Liverpool; 1998.

18- Van Bortel W, Sochanta T, Harbach RE, et al. Presence of *Anophles culicifacies* B in Cambodia established by the PCR-RFLP assay develpoed for the identification of *Anopheles minimus* species A and C and four related species. Med Vet Entomol 2002; 16: 329-34.

19- Shahgudian ER. A key to the Anophelines of Iran. Acta Medica Iranica 1960; 3: 38-48.

20- Collins FA, Mendez MA, Rasmussen MO, et al. A ribosomal RNA gene probe differentiates members speeches of *Anopheles gambiae* complex. Am J Trop Med Hyg 1987; 37: 37-41.

21- Balinger-Crabtree ME, Black IV WC, Miller BR. Use of genetic polymorphisms detected by the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. Am J Trop Med Hyg 1992; 47: 893-901.

22- Roehrdaz RL. An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species. Insect Mol Biol 1993; 2: 89-91.

23- Crozier RH, Crozier YC. The mitochondrial genome of honey bee *Apis melifera* :Complete sequence and genome organization. Genetics 1993; 133: 97-17.

24- Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. NewYork: Cold spring Harbor Loboratory; 2001.

25- WHO. 25 year of Malaria Research Centre (Indian). Annual report; 2001.

www.SID.ir