بررسی برخی از خصوصیات مرفولوژیک و ژنتیکی جمعیتهای آنوفل سوپرپیکتوس ناقل مالاریا در ایران

خدیجه شمشاد[1]، محمد علی عشاقی[1*]
محمدرضا یعقوبی ارشادی[1]، حسن وطن دوست[1]، محمدرضا عبائی[1]، ذبیح اله‌زارعی[2]، فرشته فقیه نائینی[1]
ملیحه جداری[1].

۱-گروه حشره شناسی
۲-گروه انگل شناسی پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

*نویسنده مسئول، تهران، گروه حشره‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، ص پ ۱۴۱۵۵-۶۴۴۶، تلفن: ۸۸۹۵۷۳۹۳
email: moshaghi@sina.tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آنوفل سوپرپیکتوس یکی از ناقلین مهم مالاریا در ایران محسوب می‌شود. این گونه در تمام فلات ایران و نیز مناطق کوهستانی دامنه‌های سلسله جبال البرز و جنوب سلسله جبال زاگرس تا ارتفاع نزدیک به ۲۰۰۰ متر از سطح دریا و نیز در دشتهای ساحلی کناره بحر خزر و خلیج فارس یافت می‌شود. جمعیتهای مختلف این گونه نقشهای مختلفی در انتقال مالاریا در مناطق تحت اشغال خود به عهده دارند. بررسی‌های مورفولوژیک نشان داده که دو فرم متمایز بر اساس حلقه روی انتهای پالپ ماده‌ها در میان جمعیتهای مختلف این گونه وجود دارد. ***روش بررسی:*** در این مطالعه سایر خصوصیات مورفولوژیک و نیز تنوع ژنتیکی دو فرم مذکور در ۳۵ جمعیت مختلف این گونه در ایران مورد بررسی قرار گرفتند. مطالعات مولکولی به کمک تکنیک PCR-RFLP و PCR-direct sequencing بر روی ژن سیتوکروم اکسیداز شماره ۱ (COI) ژنوم میتوکندری انجام گرفت. ***یافته‌ها:*** نتایج بررسی‌های مورفولوژیک نشان دادند که دو فرم مذکور علاوه بر وجود و یا عدم وجود لکه روی پالپ از نظر طول نوار روشن انتهایی پالپ ($p<۰/۰۱$)، طول بال ($p<۰/۰۵$) و فاصله محل انشعاب رگبال ۲ یا ۴ تا انتهای بال ($p<۰/۰۵$) اختلاف معنی‌داری دارند. بررسی پراکندگی جغرافیایی دو فرم مورفولوژیک نشان داد که هر دو فرم در اکثر نقاط مختلف کشور به‌طور سیمپاتریک وجود دارند. ***نتیجه‌گیری:*** نتایج بررسی های تنوع ژنتیکی ژن سیتوکروم اکسیداز I به کمک ۱۸ آنزیم مختلف و نیز تعیین توالی حدود ۷۱۰ bp نشان داد که اختلافات مشخصی داخل یا بین جمعیتهای هر دو گروه وجود دارد ولی این تفاوتها ارتباطی با دو فرم مرفولوژیک مورد بررسی ندارند. برای تعیین وضعیت تاکسونومیک دقیق این هاپلوتایپهای ژنتیکی و نیز ارتباط آنها با انتقال مالاریا توصیه می‌شود مطالعات تکمیلی اکولوژیکی، سیتولوژیکی و ملکولی صورت پذیرد.

کلمات کلیدی: آنوفل سوپرپیکتوس, مالاریا، مرفولوژی، ژنوم میتوکندری، واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز، ایران.

مقدمه

بیماری مالاریا از نظر بهداشتی از اهمیت جهانی برخوردار است و یکی از شش بیماری مهم مطرح شده در برنامه‌های سازمان بهداشت جهانی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری محسوب می‌شود. سالیانه حدود ۳۰۰ میلیون نفر در سرتاسر دنیا تحت تاثیر این بیماری قرار می‌گیرند و حدود ۱/۵-۱ میلیون نفر در اثر این بیماری فوت می‌شوند که بیشتر آنها را کودکان زیر پنج سال تشکیل می‌دهند.[1] علی‌رغم تلاشهای فراوان جهت کنترل و پیشگیری بیماری متاسفانه طی ده سال اخیر وضعیت مالاریا در بسیاری از نقاط جهان شکل بدتر و وخیمتری به خود گرفته است. در حال حاضر بیش از دو میلیارد نفر از ساکنان ۱۰۰ کشور مختلف در گوشه و کنار جهان در مناطقی زندگی می‌کنند که به طور قطع در معرض آلودگی و خطر ابتلا به بیماری قرار دارند. کشور ایران با داشتن آب و هوای مختلف یکی از مناطق مالاریا خیز جهان بوده و مالاریا یک بیماری بومی محسوب می‌شود که تا بحال زیانهای اقتصادی و اجتماعی فراوانی به بار آورده است. در سالهای اخیر سالیانه تعداد ۶۰-۱۱ هزار مورد مالاریا در کشور گزارش شده که عمدتا مربوط به استانهای جنوب شرقی کشور می‌باشد. علاوه بر این به واسطه مهاجرتها و رفت و آمدهای زیاد، این بیماری در سایر نقاط ایران به‌صورت موارد وارده یا خارجی (افغانی) و انتقال محلی اسپورادیک[2] و بازپدید در قسمتهای شمال غربی کشور مشاهده می‌شود.[2-4] آنوفل سوپرپیکتوس *(Anopheles superpictus)* ناقل مهم منطقه پالهٔ آرکتیک است و در

Archive of SID
www.SID.ir

کشورهای منطقه خاورمیانه, شمال آفریقا، هند، افغانستان، پاکستان،[۵-۷] نواحی مرکزی و جنوب اروپا[۸و۹] و کشورهای تازه استقلال یافته شوروی و روسیه پراکندگی دارد.[۱۰] در ایران آنوفل سوپرپیکتوس یکی از ناقلین مالاریا محسوب می‌شود و به‌طور گسترده‌ای در سرتاسر کشور پراکنده می‌باشد. این آنوفل در تمام فلات ایران و نیز مناطق کوهستانی دامنه‌های سلسله جبال البرز و جنوب سلسله جبال زاگرس پراکنده است و در دشت‌های ساحلی کناره بحر خزر و خلیج فارس نیز با وفور کم یافت شده است. این گونه تا ارتفاع نزدیک به ۲۰۰۰ متر از سطح دریا و در دشت‌های ساحلی خلیج فارس نیز تا ارتفاع ۵۰ متر از سطح دریا (قریه چلو میناب) صید شده است.[۱۱] تشریح غدد بزاقی این آنوفل درخراسان، کرمانشاه، کازرون و مسجد سلیمان انجام شده که قریب ۱/۲ درصد آنوفلهای تشریح شده در مسجد سلیمان آلوده به اسپوروزوئیت و ۰/۷ درصد دارای اووسیت بوده‌اند و درصد آلودگی به اسپوروزوئیت در طبس ۴/۶ درصد و در کازرون معادل ۰/۶۵ درصد آلوده به اسپوروزوئیت بوده‌اند.[۱۲] حشرات بالغ این گونه دارای رفتار اگزوفاژی و اندوفیلی می‌باشند و تعداد قابل ملاحظه‌ای از آنها در اماکن انسانی و حیوانی استراحت می‌کنند.[۱۱و۱۲]

بررسی‌های مرفولوژیک بر روی نمونه‌های مختلف این آنوفل نشان داده است که دو فرم مرفولوژیک کاملا مشخص بر اساس وجود یا عدم وجود لکه یا حلقه تیره روی بند انتهایی پالپ حشرات ماده در این گونه وجود دارد. مطالعات سیتوژنتیکی بر روی نمونه‌های مختلف سوپرپیکتوس در جنوب ایتالیا نشان داده که پلی‌مورفیسم کروموزومی بالایی در این گونه وجود دارد.[۱۳] وجود پلی‌مورفیسم کرموزومی در سایر گونه‌های آنوفل اکثر مواقع ارتباط مستقیمی با قدرت انتقال بیماری مالاریا داشته است.[۱۴] مطالعات انجام شده فوق و تنوع خصوصیات مرفولوژیک، رفتاری و کروموزومی بین جمعیتهای این گونه احتمال وجود فرمهای بیولوژیک و یا سیبلینگ را در این گونه افزایش می‌دهد. مطالعات قبلی نشان داده که حدود بیش از نیمی از ناقلین مالاریا متعلق به گونه‌های سیبلینگ هستند که تشخیص آنها از نظر مورفولوژی مشکل یا غیر ممکن است اما از نظر خصوصیات ژنتیکی، اکولوژیکی و بیولوژیکی از جمله قدرت انتقال بیماری، مقاومت به سموم، رفتار خونخواری، پراکندگی جغرافیایی، انتخاب میزبان و غیره بایکدیگر متفاوت می‌باشند.[۱۵و۱۶] بنابراین شناسائی گونه‌های سیبلینگ و تعیین نقش آنها در انتقال مالاریا جهت اجرای برنامه‌های کنترل مالاریا بسیار با اهمیت است. برای تعیین و شناسایی گونه‌های سیبلینگ از روشهای کلاسیک مختلفی از جمله استفاده از کروموزومهای پلی‌تن و میتوتیک، هیدروکربنهای کوتیکول، هیبریداسیون و خصوصیات مورفولوژیک استفاده می‌شد. به هر حال به‌واسطه محدودیت‌های موجود در روشهای فوق، در سالهای اخیر از روشهای ملکولی وابسته به DNA از جمله تکنیک PCR در سطح وسیعی برای تعیین گونه‌های سیبلینگ و یا بررسی ژنتیک جمعیت یک گونه مورد استفاده قرار گرفته است.[۱۶و۱۷] از بین قسمتهای مختلف ژنوم، ژنوم میتوکندری mtDNA برای مطالعات ژنتیک جمعیت و تعیین گونه‌های سیبلینگ ارجحیت فراوانی دارد. کپی‌های بسیار متعدد از این ملکول در هر سلول کار با آن را آسان نموده است و از طرف دیگر وراثت مادری (maternal)، عدم نوترکیبی (recombination) و سرعت بالای تغییرات ژنتیکی (۱۰-۵ برابر هسته) کاربرد آنرا در مطالعات فیلوژنی، دنبال کردن اجداد، جریان ژنی و پراکنش آنها، تشخیص مهاجرت‌ها و پراکندگی جغرافیایی گونه‌ها به‌ویژه گونه‌های سیبلینگ و جمعیتها بسیار وسیع نموده است. این خصوصیات باعث شده از mtDNA به‌عنوان یک مارکر ملکولی بسیار خوب برای ژنتیک جمعیت یاد شود.[۱۸و۱۹] با توجه به پراکندگی بسیار وسیع آنوفل سوپرپیکتوس در ایران و نیز وجود اختلافات مورفولوژیک، کروموزومی، رفتاری و میزان آلودگی به انگل مالاریا، تشخیص دقیق ساختار جمعیتهای مختلف و تعیین هویت آنها برای مطالعات و اقدامات پیشگیری کننده مالاریا در مناطق اندمیک و مناطقی که خطر امکان بازگشت مالاریا به آن وجود دارد ضروری خواهد بود. در این مطالعه جمعیتهای مختلف این گونه ابتدا بر اساس وجود یا عدم لکه یا حلقه تیره روی بند انتهایی پالپ حشرات ماده تفکیک شده سپس ارتباط سایر خصوصیات مرفولوژیک ژنتیکی بخشی از ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندری در این دو جمعیت مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی

۱- مناطق تحت بررسی: در این مطالعه مجموعا ۱۶۸ پشه متعلق به ۳۵ جمعیت مختلف آنوفل سوپرپیکتوس ایران شامل نمونه‌های حشرات بالغ ماده سه جمعیت صحرایی مربوط به استانهای سیستان و بلوچستان (ایرانشهر)، اردبیل (گرمی) و لرستان (الیگودرز) به همراه ۱۳۸ نمونه بالغ ماده جمع‌آوری شده از استانهای فارس، ایلام،

Archive of SID
www.SID.ir

گلستان، تهران، خراسان، کرمان، هرمزگان، کردستان، اردبیل، سیستان و بلوچستان و لرستان موجود در موزه حشره‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت مورد مطالعه قرار گرفتند (جدول ۱).

سه استان سیستان و بلوچستان، اردبیل و لرستان از نظر اکولوژیک، شرایط اقلیمی، آب و هوایی و توپوگرافی کاملا متفاوت می‌باشند. استان سیستان و بلوچستان در جنوب شرقی کشور با آب و هوای گرم و خشک و حاره‌ای مهمترین منطقه مالاریا خیز کشور محسوب می‌شود و این آنوفل در آن منطقه به‌عنوان یکی از ناقلین مالاریا مطرح می‌باشد. استان اردبیل با آب و هوای سرد و کوهستانی در شمال غربی کشور واقع شده است و در سالهای اخیر مالاریا در بعضی از نقاط استان مانند پارس آباد مجددا ظاهر شده است. استان لرستان دارای آب و هوای معتدل کوهستانی بوده و آنوفل سوپرپیکتوس به‌عنوان گونه غالب منطقه، ناقل اصلی مالاریا در این استان محسوب می‌شده است. در سال ۱۳۸۰در این استان یک مورد سوپرپیکتوس آلوده به اسپوروزوئیت گزارش شده است (امانی، مذاکرات شخصی). ۲-روشهای صید و بررسی‌های مرفومتریک: جمع‌آوری نمونه بالغ با روشهای استاندارد توتال کچ (اماکن انسانی و حیوانی)، هندکچ (اماکن انسانی و حیوانی)، شلترپیت، ویندوتراپ و گزش انسانی و حیوانی در پیک فعالیت پشه‌ها (تیر- شهریور) در اماکن انتخاب شده فوق انجام شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به کمک کلید تشخیص آنوفل‌های ماده بالغ ایران[۲۰] شناسایی و نمونه‌های آنوفل سوپرپیکتوس از میان سایر گونه‌ها جدا شدند. ۳۰ نمونه به‌صورت راندوم از بین نمونه‌های صحرایی و ۱۳۸ نمونه موزه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس موجودی موزه جمعیتهایی که کمتر از ۱۰ نمونه از آنها موجود بود همه نمونه‌های موجود بررسی شدند و از آنهایی که بیش از ۱۰ عدد نمونه موجود بود به‌صورت راندوم ۱۰ عدد انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در ابتدا بر اساس وجود و یا عدم وجود حلقه تیره در نوار روشن بند انتهایی پالپ ماده از همدیگر تفکیک و سپس از نظر صفات رنگ بدن، طول پالپ، طول نوار روشن انتهایی پالپ، طول بال از ابتدا تا رأس و فاصله انشعاب رگبال دو یا چهار تا انتهای بال مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول ۱). سپس نمونه‌هایی از دو گروه مرفولوژیک که از نظر وجود و یا عدم وجود حلقه تیره در نوار روشن انتهایی پالپ متمایز بودند، از نظر ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند.

۳-تهیه DNA ژنومیک، PCR و PCR-RFLP: DNA ژنومیک نمونه‌های صحرایی با استفاده از روش Collins تهیه شد و DNA حاصل در ۵۰ µl آب مقطر دوبار تقطیر استریل حل شده و در دمای ۴°C نگهداری شد. قطعه‌ای به‌طول ۸۸۷bp مربوط به قسمت '۳ انتهایی ژن COI از ژنوم حلقوی میتوکندری با بکارگیری پرایمرهای جلودار Cij-2183 با توالی 5'-caacacttattctgatttttttgg-3' و عقب دار CUL-Rev با توالی 5'-tgaagcttaaattcattgcactaatc-3' تکثیر داده شد.[۱۶] این پرایمرها مکمل حد فاصل باز شماره ۲۱۱۱ تا باز شماره ۲۹۹۸ در مقایسه با ژنوم mtDNA آنوفل گامبیه (Beard et al,1993) می‌باشد. ترکیب واکنش شامل ۱/۵ mM MgCl2، ۱ mM dNTPs، ۱ mM 10x buffer، ۲/۵ mM، ۱ از هر پرایمر، ۱٪ Gelatin ۰/۵ mM و ddH2O ۱۶/۳ بود. به این ترکیب مقدار ۱ µl DNA، ژنومیک اضافه می‌شود تا حجم نهایی واکنش به ۲۵ میکرولیتر برسد. واکنشها به کمک دستگاه ترموسایکلر اپندروف مدل (Master Cycler Personal) با برنامه حرارتی ۹۵ °C: ۴ دقیقه و سپس ۳۲ سیکل حرارتی ۹۴ °C: ۱ دقیقه، ۵۳°C: ۱ دقیقه و ۷۲ °C: ۲ دقیقه بود. سپس در انتها نمونه‌ها به‌مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ °C نگهداری می‌شوند تا Extension نهایی انجام شود. محصولات PCR با استفاده از آنزیمهای HindIII، KpnI، HpaII، BamHI، HaeII، EcoRI، MspI، DraI، Cfr13I، TaqI، NotI، AluI، EcoRV، XhoI، FbaI، SalI، BstyI، HinfI بررسی شدند. برای واکنشهای آنزیمی ۱۵-۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR را با ۲/۵ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم (۱۰X) و ۵ واحد آنزیم مخلوط و حجم محلول را با آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده و بسته به نوع آنزیم در دمای مناسب به‌مدت ۱۲-۴ ساعت نگهداری شدند. محصولات PCR و PCR-RFLP در ژل آگارز ۲-۱/۵٪ الکترفورز و بر روی دستگاهTransilluminator UV مورد بررسی قرار گرفتند. برای آزمون آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS ویراست ۱۱/۵ و برای مقایسه میانگین صفات کمی از t-student و برای صفت کیفی رنگ بدن از χ^2 استفاده شد.

۴- تعیین توالی (DNA sequencing) و تجزیه و تحلیل توالی‌ها

مقدار حدود ۱۰۰-۸۰ میکرولیتر از محصولات PCR ژن COI مربوط به تعداد ۱۸ نمونه از جمعیت‌های مختلف گونه سوپرپیکتوس تهیه شد و جهت تعیین توالی به کشور آلمان ارسال شد. این نمونه‌ها تعدادی متعلق به گروهی که دارای حلقه و گروهی فاقد حلقه تیره در

Archive of SID

www.SID.ir

نوار روشن انتهایی پالپ بودند. برای هر نمونه DNA تعیین توالی از دو جهت انجام شد و توالی‌های به‌دست آمده با هم مقایسه و هر نوکلئوتید در هر دو کروماتوگرام با استفاده از نرم افزار Chromas مقایسه و پس اصلاح موارد مشکوک توالی نهایی (Consensus) آنها تعیین شدند. توالی‌های حاصله سپس در بانک جهانی ژن‌ها با شماره‌های دسترسی (Accession Numbers) AY900633 تا AY900650 به ثبت رسیده‌اند.

یافته‌ها

مجموعا ۱۶۸ پشه آنوفل سوپرپیکتوس ماده متعلق به ۱۰ استان مختلف کشور شامل استانهای اردبیل، خراسان، ایلام، کرمان، تهران، کردستان، هرمزگان، فارس، چهار محال و بختیاری و لرستان مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد مطالعه ابتدا از نظر وجود یا عدم وجود حلقه یا لکه یا نوار تیره انتهایی پالپ ماده مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۴۷ (۲۸٪) نمونه‌ها دارای لکه یا حلقه تیره انتهایی و ۱۲۰ (۷۲٪) نمونه فاقد لکه بودند. به‌هر حال در بیش از نیمی از نقاط مورد بررسی هر دو فرم لکه‌دار و بی‌لکه به‌صورت همزمان (سیمپاتریک) یافت شدند و به استثناء روستای سرتنگ شهرستان(ایوان)، بسک سبزوار (خراسان)، خوراب فیروزآباد و لرستان وفور فرم فاقد لکه (یا نوار یا حلقه تیره) بیشتر از فرم دارای لکه (نوار یا حلقه تیره) می‌باشد. نتایج بررسی سایر مشخصات مرفولوژیکی، شامل وجود لکه در محل انشعاب رگبال پنجم، طول پالپ، طول نوار روشن انتهایی پالپ، طول بال از ابتدا تا راس، و فاصله انشعاب رگبال دو یا چهار تا انتهای بال در جدول ۱ نشان داده شده است. دو گروه مورد مقایسه از نظر فاصله محل انشعاب رگبال دوم یا چهارم تا انتهای بال، طول بال و طول نوار روشن انتهایی پالپ اختلاف معنی‌داری به‌ترتیب در سطح اطمینان ۹۵٪، ۹۵٪ و ۹۹٪ دارند (آزمون t-student). در مورد رنگ بدن بررسی‌ها نشان داد که هر دو رنگ (قهوه‌ای روشن و تیره) در هر دو گروه دارای لکه و بدون لکه وجود دارد، هرچند که فراوانی نمونه‌های تیره رنگ بسیار کمتر (۱۳٪) از نمونه‌های با رنگ روشن (۸۷٪) می‌باشد. میانگین طول بال در گروه دارای لکه (M±SE) ۰/۰۲±۱۰/۲۷ میلی‌متر بوده در حالی که در گروه فاقد لکه طول بال معادل (M±SE) ۰/۰۰۸±۱۰/۱۸ میلی‌متر می‌باشد که اختلاف بین این دو گروه از نظر آماری معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد. میانگین طول پالپ در گروه دارای لکه (M±SE) ۰/۱۱±۶/۴۴ میلی‌متر بوده در حالی که در گروه فاقد لکه طول پالپ معادل (M±SE) ۰/۰۸±۶/۲۹ میلی‌متر می‌باشد. مقایسه طول پالپ در دو گروه نشان داد که هرچند در گروه فاقد لکه، طول پالپ کوتاهتر می‌باشد ولی اختلاف آن با گروه دارای لکه معنی‌دار نمی‌باشد (p=۰/۴۰۴). میانگین طول نوار روشن انتهای پالپ ماده در گروه دارای لکه (M±SE) ۰/۰۲±۰/۶۸ میلی‌متر بوده در حالی که در گروه فاقد لکه معادل (M±SE) ۰/۰۲±۰/۶۹ می‌باشد این وضعیت نشان می‌دهد که بین این دو گروه اختلاف معنی‌دار در سطح (p<۰/۰۱) وجود دارد. میانگین فاصله محل انشعاب رگبال دوم و چهارم تا انتهای بال در گروه دارای لکه (M±SE) ۰/۰۰۸±۲/۶۴ میلی‌متر بوده در حالی که در گروه فاقد لکه معادل (M±SE) ۰/۰۰۳±۲/۷۳ می‌باشد که نشان می‌دهد این دو گروه از نظر صفت مورد بررسی اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۵) دارند. یافته‌های حاصل از PCR-RFLP: برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی تعدادی از نمونه‌های دو گروه (هر استان دو نمونه) انتخاب و قطعه COI از ژن میتوکندری تکثیر شد. طول محصول PCR همه نمونه‌ها ۸۸۷bp بودند و هیچگونه تفاوتی از نظر طول قطعه تکثیر شده در بین نمونه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. نتایج حاصل از واکنش آنزیمهای هضم‌کننده بر روی محصولات PCR اختلاف ژنتیکی نسبتا زیادی بین جمعیت‌های مختلف نشان دادند اما این اختلافات ارتباطی با دو گروه دارای لکه و فاقد لکه نداشتند. نمونه‌های دارای لکه و فاقد لکه متعلق به هر منطقه مشابه هم بودند و نحوه برش یا هضم قطعات PCR در دو گروه یکسان و مشابه بودند (تصویر ۱). به هر حال بعضی از آنزیمها اختلافاتی در داخل دو گروه نشان دادند. این اختلافات اختصاص به گروه خاص نداشت و در هر دو گروه هاپلوتایپهای ژنتیکی مشاهده شده وجود داشت. یافته‌های حاصل از تعیین توالی Sequencing: طول توالی‌های قابل شمارش و بدون ابهام از ژن COI نمونه‌ها بین ۷۰۸ الی ۷۵۰ باز می‌باشد که البته برای مقایسه این توالی‌ها با همدیگر حدود ۷۰۸ bp از تمام نمونه‌ها با هم مقایسه گردیدند. درصد بازهای آدنین و تیمین AT به طور متوسط برای آنوفل سوپرپیکتوس جمعیتهای مختلف ۷۱٪ تعیین گردید. میزان کل تنوع ژنتیکی (Rate of variation) در bp ۷۰۸ از ژن COI برای جمعیتهای مختلف معادل ۱۲/۳٪ محاسبه شد. از این میزان ۵۵/۲٪ موتاسیونها از نوع Transition و ۴۴/۸٪ از نوع Transversion

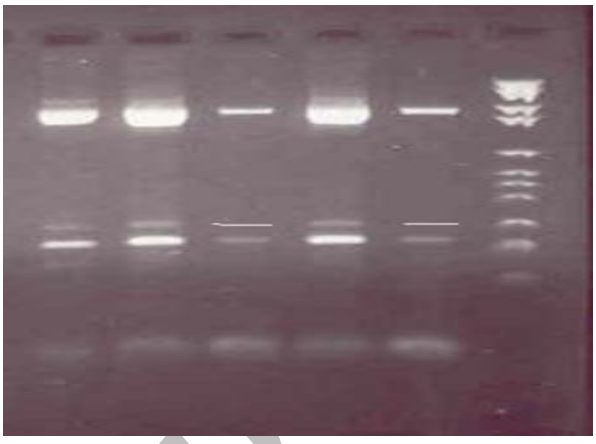
Archive of SID

www.SID.ir

جدول-۱: مشخصات و نتایج مرفومتریک نمونه های ماده بالغ *An.superpictus* نمونه‌های صحرایی و موزهای مورد مطالعه

محل صید	تعداد	رنگ بدن قهوه‌ای		طول	نوار (تیره انتهایی پالپ ماده)		طول نوار (روشن	طول بال	فاصله انشعاب (رگبال
		روشن	تیره	پالپ(mm)	وجود	عدم وجود	انتهایی پالپ mm)		۲ و ۴ تا انتهای بال (mm)
پیرسبز کازرون (فارس)	۱۰	۱۰	–	۵–۷	–	۱۰	۰/۵–۱	۷–۱۰/۵	۲–۳
ممسنی کازرون (فارس)	۱۰	۱۰	–	۴/۵–۷	۲	۸	۰/۵–۱	۹–۱۱	۲/۵–۳/۲
ده سرتنگ (ابوان)	۹	۹	–	۵/۵–۷	۷	۲	۰/۴–۰/۷	۹/۸–۱۰/۵	۲/۵–۳
ده پیرمحمد گنبد درکواز (مهران)	۱۰	۱۰	–	۴–۶/۵	*۴	۶	۰/۵–۰/۶	۹–۱۰/۵	۲–۲/۵
ده سرلب کلان شیروان (خراسان)	۱۰	۱۰	–	۵/۲–۷	۴	۶	۰/۶–۰/۸	۱۰–۱۰/۶	۲/۵–۳
روستای میش خاص ایلام	۱۰	۱۰	–	۴/۵–۷	–	۱۰	۰/۵–۰/۸	۹–۱۰/۵	۲/۵–۳/۱
روستای مهدی آباد (ایلام)	۱۰	۱۰	–	۶–۷/۵	۳	۷	۰/۶–۰/۹	۹–۱۰/۶	۲–۳/۵
صالح آباد ورامین تهران	۶	۶	–	۶–۷/۵	–	۶	۰/۶–۱	۱۰/۵–۱۲	۳–۳/۵
کاظم آباد ورامین تهران	۲	۲	–	۷/۳–۸	–	۲	۰/۹–۱	۱۰/۲–۱۱	۲/۶–۳/۷
فروان آباد ورامین تهران	۴	۴	–	۸	۲	۲	۰/۹–۱	۱۱–۱۳	۳/۱–۳/۹
بسک سبزوار (خراسان)	۳	۳	–	۵/۵–۶/۵	۳	–	۰/۵–۰/۷	۹–۱۰	۲–۲/۵
گائه سبزوار(خراسان)	۴	۴	–	۶–۷	۱	۳	۰/۶–۱	۸–۱۰	۲–۳
پادرسبزوار(خراسان)	۲	۲	–	۶–۶/۵	–	۲	۰/۵–۰/۷	۱۰–۱۰/۵	۲/۵–۳
شفی آباد سبزوار(خراسان)	۲	۲	–	۶–۶/۵	–	۲	۰/۵–۱	۱۰–۱۰/۵	۲/۵–۳
دره‌گز ارسنجان	۴	۴	–	۶/۵–۷	–	۴	۰/۸–۱	۱۰–۱۱	۲/۵–۳
بروجند	۳	۳	–	۶–۷	–	۳	۰/۷–۱	۱۱–۱۲	۲/۵–۳/۵
خوراب فیروزآباد	۳	۳	–	۶–۸	۲	۱	۰/۷–۱	۱۱–۱۳	۳–۳/۸
ده قائدی برازجان	۲	۲	–	۶/۹–۷/۱	–	۲	۰/۹	۱۱	۳–۳/۲
ده شور فردوس (خراسان)	۶	۶	–	۵–۷	۱	۵	۰/۵–۱	۷–۱۲	۳–۳/۵
ازمغان فردوس (خراسان)	۳	۳	–	۶–۷	–	۳	۰/۸–۱	۱۱–۱۲	۳–۳/۵
سیاهو(هرمزگان)	۲	۲	–	۵–۷	–	۲	۰/۶–۰/۹	۱۰	۲/۱–۲/۹
سنندج	۱	–	۱	۶/۱	–	۱	۰/۷	۶/۲	۲/۶
سنگاب تربت جام	۲	۲	–	۷/۵	–	۲	۰/۹	۱۱/۵–۱۲	۲/۵–۳
سفید خان نهاوند	۳	–	۳	۶–۷/۵	–	۳	۰/۵–۰/۹	۱۰/۲	۲/۵–۳
جوادیه تهران	۱	۱	–	۶/۵	–	۱	۰/۹	۱۲	۳/۵
برازجان	۲	۲	–	۶/۵	–	۲	۰/۵–۰/۶	۱۰	۲/۵–۳
حسین آباد شاه نظر	۲	۲	–	۶	۱	۱	۰/۵–۰/۶	۱۰–۱۰/۵	۲/۵
دره گاز اختر مشهد	۵	۵	–	۶–۷/۱	۲	۳	۰/۵–۰/۷	۱۰–۱۰/۵	۲/۵–۳
گلان ایلام تا مهران	۱	۱	–	۶/۵	–	۱	۰/۷	۱۱	۳
کلاته سلیمان سبزوار	۱	۱	–	۷	–	۱	۰/۷	۱۰/۵	۳
سرخ آباد تربت حیدریه	۴	۴	–	۶–۶/۵	–	۴	۰/۵–۱	۹–۱۰/۵	۲/۵–۳
روستای صلحله باکو	۱	۱	–	۵/۵	–	۱	۰/۷	۱۰	۲/۵
لرستان (صحرایی)	۱۰	۱۰	–	۵–۷/۶	۶	۴	۰/۵–۰/۹	۸/۸–۱۲	۲–۳/۵
اردبیل(صحرایی)	۱۰	۱۰	–	۴–۷	۵	۵	۰/۵–۱	۹/۵–۱۲	۲–۳
سیستان و بلوچستان (صحرایی)	۱۰	۱۰	–	۴/۵–۵/۷	–	۱۰	۰/۵–۰/۶	۹–۹/۵	۱/۷–۲/۵

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر-۱: نتایج حاصل از هضم محصولات PCR بخشی از سیتوکروم اکسیداز شماره ۱ (COI) ژنوم میتوکندری (mtDNA به‌طول ۸۷۷ باز) **توسط آنزیم HinfI در جمعیتهای مختلف آنوفل سوپرپیکتوس ایران**

می‌باشد. همانند اختلافات مشاهده شده در نتایج PCR-RFLP، اختلافات مشاهده شده در توالی ۷۰۸ bp از ژن COI نیز ارتباطی با لکه‌دار بودن یا بدون لکه بودن نوار روشن انتهایی پالپ ماده‌ها نداشت. به‌عبارت دیگر تعدادی از توالی‌های نمونه‌های لکه‌دار با نمونه‌های بدون لکه کاملا مشابه بودند هر چند که در عین حال ممکن بود دو یا بیش از دو فرم ژنتیکی در هر دو گروه مشاهده شود.

بحث

براساس مطالعات مرفولوژیکی انجام شده در ایران مشخص شده است که دو فرم کاملا متمایز در بین جمعیتهای مختلف گونه آنوفل سوپرپیکتوس بر اساس لکه‌دار بودن یا بدون لکه بودن نوار روشن انتهایی پالپ ماده‌ها وجود دارد. با اینحال تاکنون هیچ گونه اطلاعات و گزارشات علمی درباره تفاوتهای این دو فرم مرفولوژیک در خصوص قدرت انتقال بیماری مالاریا، رفتارهای خونخواری و استراحت، سطح مقاومت به حشره‌کشها، وفور و پراکندگی جغرافیائی و سایر خصوصیات بیونومیکی و اکولوژیکی آنها وجود ندارد. نتایج این مطالعه نشان دادند که حداقل این دو فرم از نظر پراکندگی جغرافیائی در بسیاری از نقاط کشور به‌صورت همزمان و توأم وجود دارند. ثانیا از نظر بعضی از صفات مرفولوژیک دیگر، اختلافات معنی‌داری در طول بال، فاصله انشعاب رگبال چهار یا دو تا انتهای بال و نیز طول نوار روشن انتهایی پالپ مشاهده می‌شود که این صفات نیز می‌توانند در تفکیک این دو فرم مورد استفاده قرار گیرند. مطالعات امانی (۱۳۷۷) بر روی جمعیتهای آنوفل سوپرپیکتوس در استان لرستان نشان داده که دو فرم کاملا متمایز لاروی در بین نمونه‌های صید شده این آنوفل وجود دارد. اختلافات مشاهده شده مربوط به تعداد ردیف ابریشم پیشانی، وجود یقه در بعضی از لاروها، تعداد ابریشم پالمه موجود در هر بند و وجود نوار تیره‌ای که ابریشم متاتوراکس را به‌هم وصل می‌کند، می‌باشد. بررسی‌های ملکولی انجام شده در تحقیق حاضر روی جمعیتهای مختلف این دو فرم نشان دادند که اختلافات ژنتیکی زیادی بین جمعیتهای این گونه وجود دارد اما این اختلافات ارتباط مستقیمی با وجود لکه یا عدم وجود لکه روی پالپ و سایر صفات بررسی شده ندارد. وجود اختلافات مرفولوژیک و عدم اختلاف ژنتیکی بین آنها می‌تواند مربوط به نقش ساختاری ژنوم میتوکندری باشد و محصولات ژنهای این ارگانل در فنوتیپ موجود نقشی ندارند و یا اینکه به احتمال زیاد هر دو گروه از میتوکندری اجدادی مشترکی مشتق شده‌اند و سیر تکاملی صفات مرفولوژیک و ژنتیکی به‌صورت مستقل از هم صورت پذیرفته‌اند.

در بررسیهای تاکسونومیک و طبقه‌بندی موجودات از جمله حشرات بررسی صفات مرفولوژیک ساده‌ترین و راحت‌ترین روش شناسایی گونه‌ها و یا جمعیتها می‌باشد ولی سیر تاریخی شناسایی گونه‌های سیبلینگ ثابت کرده که صفات مرفولوژیکی در این سطح طبقه‌بندی صفات قابل اعتمادی نیستند و اغلب کاربرد محلی دارند. برای مثال تا دو سال پیش براساس خصوصیات مرفولوژیک تخم، بیش از ۱۰ گونه مختلف در گروه ماکولی پنیس معرفی شد که با بررسی‌های جدید و اغلب به کمک روشهای ملکولی تعدادی از آنها از جمله آنوفلس ساب آلپانیوس از لیست این کمپلکس حذف و تعدادی دیگر به لیست اضافه شدند.[۲۱] مطالعات مشابهی بر روی سایر آنوفل‌ها به‌ویژه گونه‌های کمپلکس مانند آنوفلس گامبیه،[۲۲] آنوفلس ماکولی پنیس،[۲۱] آنوفلس کولیسیفاسیس،[۲۳] آنوفل فلوویاتیلیس[۲۳] و حتی گونه‌های غیر کمپلکس مانند آنوفل استفنسی[۲۳]، نشان داده‌اند که به کمک روشهای ملکولی می‌توان با اطمینان گونه‌های سیبلینگ یا جمعیتهای مختلف را از همدیگر تفکیک و شناسایی نمود. با توجه به نتایج مرفولوژیک و ملکولی حاصله، توصیه می‌شود که بررسی‌های دقیق ملکولی با استفاده از تکنیک Sequencing و نیز مطالعه بر روی سایر ژنها از جمله بخش ITS2 ژن ریبوزومال DNA انجام پذیرد. لازم

Archive of SID
www.SID.ir

است مطالعات اکولوژیکی، سیتولوژیکی و بیولوژیکی با مطالعات ملکولی همزمان انجام پذیرد تا نقش هر کدام از فرمهای مرفولوژیک و یا ژنتیکی گونه مربوطه در انتقال بیماری مالاریا به منظور کنترل بیماری روشن شود. *سپاسگزاری*: این پژوهش با حمایت مالی قطب علمی انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است. (شماره قرارداد ۲۴۰/۷۷۰۶ شماره طرح: ط-۲۴۱/۸۲/۶۴).

References

1. WHO. World malaria situation in 1994. WHO: Weakley epidemiological record: 1997.
۲. منوچهری ع، زعیم م، عمادی م. مروری بر وضع بیماری مالاریا در ایران. مجله دارو و درمان ۱۳۷۰: سال ۹، شماره ۹۷، صفحات ۱۲ تا ۱۷.
3. Yaghoobi-Ershadi MR, Namazi J, Piazak N. Bionomics of Anopheles sacharovi in Ardebil province, northwestern Iran during a larval control program. *Acta Tropica* 2001; 78: 207-15.
4. Vatandoost H, Ashraf SH, Salari Lak R, Entezar Mahdi MR, Nazari A, Nazari M. Factors involved in the re-emergence of malaria in borderline of Iran, Armenia, Azerbaijan and Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34: 6-14.
5. Lesson HS, Lumsden WHR, Yofe J, Macan TT. Anopheles and Malaria in the Near East. London: Lewis and Co Ltd: 1950.
6. Bruce-Chwatt LJ. Essential Malariology. 2nd ed. London: Heinemann, Greenwood: 1986.
7. Zahar AR. Review of the ecology of malaria vectors in the WHO eastern Mediterranean Region. *Bulletin of the World Health Organization* 1974: 50; 427-40.
8. Christophers SR. The Fauna of British India including Ceylon and Burma (Diptera Volume IV). London: Taylor and Francis: 1933.
9. Boyd MF. Malariology. Philadelphia: WB Saunders: 1949.
10. Knight KL, Stone A. Catalog of the mosquitoes of the world (Diptera: Culicidae). 2nd ed. Maryland, College Park: Entomological Society of America: 1977.
۱۱. فقیه م. مالاریا شناسی و ریشه کنی مالاریا. تهران: انتشارات دانشگاه تهران ۱۳٤۸: شماره ۱۲۵۷، صفحه ۷۲٦.
۱۲. منوچهری ع. مروری بر اکولوژی ناقلین مالاریا در ایران. انتشارات دانشکده بهداشت ۱۳٦٤: شماره ۷۷، صفحه ۲٤.
13. Coluzzi M, Petrarca V, Deco MA. Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in Anopheles gambiae. *Boll Zool* 1989; 52: 45-63.
14. Subbarao SK. Anopheline Species Complexes in South East Asia: World Health Organization, Regional Office for South East Asia, New Delhi. *Technical Publication SEARO* 1998; 18: 81.
15. White GB. Systematic reappraisal of An maculipennis complex. *Mosq Syst* 1978; 10: 13-44.
16. Collins FH, Paskewitz SM. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic Anopheles species. *Insect Mol Biol* 1996; 5: 1-9.
17. Scott JA, Brogdon WG, Collins FH. Identification of single specimens of the Anopheles gambiae complex by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 520-9.
18. Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. *Ann Entomol Soc Am* 1994; 87: 651-701.
19. Beaty BJ, Marquardt WC. The Biology of Disease Vectors. Niwot: University of Colorado Press: 1996.
20. Shahgudian ER. Biological and Bionomic features of malaria vectors in Iran, their role and importance. *Sch Publ Hlth* 1962; 9: 1-8.
21. Sedaghat MM, Linton YM, Nicolescu G, Smith L, Koliopoulos G, Zounos AK, et al. Morphological and molecular characterization of Anopheles sacharovi Favore, a primary vector of malaria in the Middle East. *Syst Entomol* 2003; 28: 241-56.
22. Beard CB, Hamm DM, Collins FH. The mitochondrial genome of the mosquito Anopheles gambiae: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol Biol* 1993; 2: 103-24.
23. Subbarao SK. Anopheline Species Complexes in South East Asia: World Health Organization, Regional Office for South East Asia, New Delhi. *Technical Publication, SEARO* 1998; 18: 81.

Archive of SID

www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 65, No. 8, Nov 2007: 6-13

Morphological and molecular characteristics of malaria vector *Anopheles superpictus* populations in Iran

Shemshad Kh.[1]
Oshaghi1 MA.[1*]
Yaghoobi-Ershadi MR.[1]
Vatandoost1 H.[1]
Abaie MR.[1]
Zarei, Z[2]
Faghih Naini, F.[1]
Jedari, M.[1]

1- Department of Medical Entomology
2- Department of Parasitology

School of Public Health and Institute of Health Researches, Tehran University of Medical Sciences

*Corresponding author
Dept. of Medical Entomology, School of Public Health and Institute of Health Researches, Tehran University of Medical Entomology Tehran, 14155-6446, Tel: +98-21-
email: moshaghi@sina.tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** *Anopheles superpictus* is one of the main malaria vectors in Iran. The mosquitoes of this species are found throughout the Iranian plateau up to 2000 meters above sea level in the Alborz Mountains, south of the Zagros Mountains, and in the plains near the Caspian Sea and Persian Gulf. It has been reported that different geographical populations of *An. superpictus* play different roles in malaria transmission. Based on the presence or absence of a black spot/band on the apical segment of the female maxillary palpi, two morphological forms have been reported in this species. This work has been conducted to study other morphological features as well as the genetic structure of these two forms of *An. superpictus* in Iran.

***Methods*:** The different morphological characteristics of 35 different populations were observed and recorded. An 887 bp portion of the mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome oxidase subunit I (COI) was amplified and assayed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using 18 enzymes and PCR-direct sequencing techniques.

Results: Among the morphological characteristics studied, there are significant differences between the two forms with regard to the length of the palp light band ($p<0.01$), wing length ($p<0.5$), and the distance from the branching point of the II/IV veins to the tip of the wing ($p<0.05$). Results also revealed that these two forms are sympatric in most localities of Iran. RFLP analysis and sequences of about 710 bp of the gene showed that there was great variation between and/or within the populations, but these variations were not associated with the morphological forms.

***Conclusion*:** This is the first comprehensive study on the morphological and molecular characteristics of *An. superpictus* in the literature. To determine the role of these morphological forms or genetic haplotypes in malaria transmission, further molecular, cytological, morphological, and epidemiological studies are necessary.

Keywords: *Anopheles superpictus*, malaria, morphology, mtDNA, PCR, Iran

Archive of SID

www.SID.ir