ساختار ژنتیکی میتوکندری جمعیتهای آنوفلس سوپرپیکتوس ایران

خدیجه شمشاد[۱]
محمدعلی عشاقی[۱*]
محمدرضا یعقوبی ارشادی[۱]
حسن وطن دوست[۱]
محمدرضا عبائی[۱]
کامران اکبرزاده[۱]
زکیه تلمادره‌ای[۱]
جواد رفیع نژاد[۱]
پوپک درخشنده پیکر[۲]

۱. گروه حشره شناسی پزشکی
۲. گروه ژنتیک پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

زمینه و هدف: مالاریا هنوز در جنوب و جنوب شرقی ایران به‌عنوان یکی از مسایل مهم بهداشتی محسوب می‌شود. در سال‌های اخیر تعداد ۳۰-۱۰ هزار مورد مالاریا در کشور گزارش شده است. یکی از ناقلین اصلی مالاریا در ایران آنوفل سوپرپیکتوس (*Anopheles superpictus*) می‌باشد که در تمام فلات مرکزی ایران، مناطق کوهستانی دامنه‌های سلسله جبال البرز و زاگرس و نیز با وفور کم در کناره‌های دریای خزر و خلیج فارس یافت می‌شود. تا به‌حال اختلافات مرفولوژیک در لارو و بالغ و نیز در قدرت انتقال بیماری مالاریا بین جمعیت‌های مختلف آن در ایران گزارش شده است.

روش بررسی: به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس متعلق به استان‌های سیستان و بلوچستان، اردبیل و لرستان ایران، تنوع اسیدهای نوکلئیک بخش سیتوکروم اکسیداز شماره ۱و۲ (COI-COII) به‌طول ۱۵۱۲ bp به‌روش PCR-RFLP و همچنین توالی ۷۰۸ باز از ژن COI مولکول میتوکندری (mtDNA) نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: اختلافات بسیار زیادی در توالی ژنهای مورد مطالعه بین جمعیت‌های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس وجود دارد. میزان کل تنوع ژنتیکی در ۷۰۸ bp از ژن COI برای جمعیت‌های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس معادل ۱۲/۳٪ و بین جمعیت‌های بلوچستان ۵-۲ درصد می‌باشد. در مجموع چهار هاپلوتایپ که سه عدد مربوط به بلوچستان و یک عدد مربوط به بقیه مناطق کشور می‌باشد در بین جمعیت‌های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: وجود هاپلوتایپ‌های ژنتیکی در این آنوفل برای اولین بار در دنیا گزارش می‌شود و به احتمال زیاد این گونه دارای سیبلینگ‌های متعدد و از گونه‌های کمپلکس می‌باشد. برای نتیجه‌گیری قطعی و تعیین ارتباط هاپلوتایپ‌های فوق با انتقال مالاریا در مناطق تحت اشغال آنها مطالعات بیشتری لازم است.

کلمات کلیدی: آنوفلس سوپرپیکتوس، د.ان.ا میتوکندری، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز، آنزیم‌های قطع‌کننده، سیتوکروم اکسیداز شماره یک و دو، مالاریا، ایران.

*نویسنده مسئول: گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، تهران. تلفن: ۸۹۵۱۳۹۳
email:moshaghi@sina.tums.ac.ir

مقدمه

مالاریا مهمترین بیماری انگلی منتقله به‌وسیله بندپایان می‌باشد. سالیانه بیش از ۱۲۰ میلیون مورد کلینیکی و بیش از ۱/۵–۱ میلیون مرگ در دنیا رخ می‌دهد.[۱] کشور ما با داشتن آب و هوای متنوع یکی از مناطق مالاریاخیز جهان است و تاکنون این بیماری زیان‌های اقتصادی– اجتماعی فراوانی به‌بار آورده است. سالیانه تعداد ۶۰–۲۰ هزار مورد مالاریا در کشور گزارش می‌شود. مالاریا در جنوب و جنوب شرقی ایران هنوز یکی از مسایل مهم بهداشتی است و علاوه بر این به واسطه مهاجرت‌ها و رفت و آمدهای زیاد، این بیماری در سایر نقاط ایران به‌صورت اسپورادیک دیده می‌شود.[۲] کل موارد بیماری مالاریای گزارش شده در سال ۱۳۸۲ در ایران ۲۳۵۶۲ مورد بوده است. ۹۰٪ این موارد در سه استان هرمزگان، جنوب کرمان و سیستان و بلوچستان شیوع دارد.[۳] یکی از مهمترین ناقلین مالاریا در ایران آنوفل سوپرپیکتوس می‌باشد. آنوفل سوپرپیکتوس ناقل مهم منطقه پاله آرکتیک است که در تمام فلات مرکزی ایران و نیز مناطق کوهستانی دامنه‌های سلسله جبال البرز و جنوب سلسله جبال زاگرس و شهرهای مرزی پراکنده است. این‌گونه در دشتهای ساحلی کناره دریای خزر و خلیج فارس نیز با وفور کم یافت می‌شود. این‌گونه تا ارتفاع نزدیک به ۲۰۰۰ متر از سطح دریا و در دشتهای ساحلی خلیج‌فارس نیز تا ارتفاع ۵۰ متر از سطح دریا (قریه چلو میناب) صید شده است.[۴] تشریح غدد بزاقی این آنوفل در خراسان، 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 اُأسیست بوده‌اند. درصد آلودگی به اسپوروزوئیت در طبس ۴/۶ درصد و در کازرون معادل ۰/۶۵ درصد آلوده بوده است.[۵] این‌گونه همچنین پراکندگی بسیار وسیعی در دنیا دارد. مطالعات قبلی روی جمعیت‌های این‌گونه حاکی از وجود اختلافات مرفولوژیک بین لاروهای مناطق مختلف می‌باشد. به‌علاوه این آنوفل در بعضی نقاط به‌عنوان ناقل اصلی و در برخی نقاط به‌صورت ناقل ثانویه عمل می‌نماید. همچنین این‌گونه در مناطق مختلف اندوفیلی و اگزوفیلی و اندوفاژی و اگزوفاژی متفاوتی دارد. مطالعات پلی تن کرموزومی نیز بر روی نمونه‌های جمعیت‌های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس از مناطق مختلف در جنوب ایتالیا انجام شده است که طی آن بیش از ۷۰۰۰ نمونه آنوفل ماده تقریبا هر روز از اماکن داخلی صید شدند و سپس از نظر پلی تن کروموزمهای Ovarian nurse cell مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های گزش شبانه صید شده از برخی مکان‌ها نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. تنها یک پلی‌مرفیسم‌کروموزومی، از نوع وارونگی Paracentric شامل مرکز سومین بازوی 2L، در همه نمونه‌ها گزارش شد. با وجودی‌که حداقل برخی از جمعیتهای مورد آزمایش به‌علت استعمال حشره‌کش و یا تغییرات اکولوژیکی در معرض پدیده bottle neck قرار داشتند ولی در همه مکانهای تحت مطالعه، ترتیب 2La وارونه شده وفور پایدار قابل توجهی را نشان داده است.[۶] 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 غیرممکن 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 با یکدیگر متفاوت می‌باشند.[۷و۸] 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 می‌شود. به هر حال به‌واسطه محدودیت‌های موجود در روش‌های فوق، در سالهای اخیر از روش‌های مولکولی وابسته به DNA استفاده شده است. روشهای جدید مولکولی از جمله تکنیک PCR در سطح وسیعی برای تعیین گونه‌های سیبلینگ و یا بررسی ژنتیک جمعیت یک گونه مورد استفاده قرار می‌گیرد.[۸و۹] از بین قسمتهای مختلف ژنوم، ژنوم میتوکندری mtDNA برای مطالعات ژنتیک جمعیت و تعیین گونه‌های سیبلینگ ارجحیت فراوانی دارد. کپی‌های بسیار متعدد از این مولکول در هر سلول کار با آن را آسان نموده است. وراثت مادری (Maternal inheritance)، عدم نوترکیبی (Lack of recombination) و سرعت بالای تغییرات ژنتیکی (۱۰–۵ برابر هسته) کاربرد آن‌را در مطالعات تاکسونومی، 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 مولکولی بسیار خوب برای ژنتیک

جمعیت یاد شود.[۱۰و۱۱] 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 پیشگیری‌کننده مالاریا در مناطق اندمیک و مناطقی که خطر امکان بازگشت مالاریا به آن وجود دارد ضروری خواهد بود.

روش بررسی

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی می‌باشد. در این مطالعه نمونه‌های صحرایی حشرات بالغ ماده مربوط به استان‌های سیستان و بلوچستان (ایرانشهر)، اردبیل (گرمی) و لرستان (الیگودرز) مورد بررسی قرار گرفتند. سه استان فوق 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 مالاریاخیز کشور محسوب می‌شود و این آنوفل در آن منطقه به‌عنوان یکی از ناقلین اصلی 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 پارس‌آباد 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 ۱۳۸۰ در این استان یک مورد سوپرپیکتوس آلوده به اسپوروزوئیت گزارش شده است (امانی، مذاکرات شخصی). علاوه بر این تعدادی از نمونه‌های بالغ ماده این گونه جمع‌آوری شده توسط سایر همکاران گروه حشره‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران از استانهای فارس، خراسان رضوی، زنجان، کرمان، و قم نیز مورد مطالعه قرار گرفتند. جمع‌آوری نمونه بالغ با روشهای استاندارد توتال کچ، از اماکن داخلی (اماکن انسانی و حیوانی)، هندکچ (اماکن انسانی و حیوانی)، شلترپیت، ویندوتراپ، و گزش انسانی و حیوانی، جمع‌آوری لارو و پرورش آنها در پیک فعالیت پشه‌ها (تیر- شهریور) در اماکن انتخاب شده فوق انجام شد. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که درصد اختلافات مرفولوژیک بین لاروها حدود دو درصد می‌باشد لذا نمونه‌ای به حجم حدود ۳۴۸ برای اعتماد ۹۵ درصد و اشتباهی کمتر از ۱/۵ درصد جوابگوی بررسی خواهد بود. جدول شماره۱ مکان‌های تحت مطالعه و تعداد آنوفلهای صید شده از هر مکان را نشان می‌دهد. پشه‌های صید شده پس از انتقال به محل آزمایشگاه با استفاده از کلید تشخیص بالغین و لارو آنوفلهای ایران شناسایی شده[۱۲] و از بین آنها آنوفلهای سوپرپیکتوس جدا و به‌صورت جداگانه پس از خشک شدن نمونه‌ها داخل تیوب‌های ml ۱/۵ تا زمان انجام آزمایشات بعدی (استخراج DNA) در فریزر نگهداری شدند. تیوب‌ها هر کدام جداگانه شماره‌گذاری و به آنها کد داده شد و کلیه مشخصات شامل: گونه، جنس (بالغ)، محل صید، تاریخ صید و نحوه صید در دفتر مربوط به گزارش کار یادداشت شد. تهیه DNA ژنومیک، PCR Amplification و هضم آنزیمی RFLP–PCR از این قرار بود:

مجموعا" ۳۲۰ نمونهDNA از کل نمونه‌های جمع‌آوری‌شده استخراج گردید که از این تعداد ۱۶ نمونه لارو، ۲۶۶ نمونه ماده و ۳۸ نمونه نر بود. از تعداد ۲۶۶ ماده ۲۰۴ ماده خون نخورده و ۶۲ ماده خون‌خورده بودند. ژنوم نمونه‌ها با استفاده از روش کولینز[۱۳] تهیه شد و DNA حاصل در ۵۰ µl آب مقطر دو بار تقطیر استریل حل شده و در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شد. در این مطالعه بخشی از ژنوم میتوکندری به‌طول تقریبی ۱۵۱۲ bp شامل حدود ۸۴۰bp بخش ′۳ انتهایی ژن COI، حدود ۶۶ bp کل ژن ترانسفر RNA لوسین ($tRNA^{Leu}$) و حدود ۶۰۶bp از بخش ′۵ انتهایی ژن COII از ژنوم سیتوپلاسمی mtDNA مورد بررسی قرار گرفتند. قطعه COI-COII با استفاده از پرایمرهای مناطق ثابت (conserved) شامل پرایمر جلودار COI با توالی ′5-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3 و عقب‌دار COII با توالی ′5-CCACAAATTTCTGAACATTGACC-3 تکثیر داده شد. همچنین قطعه‌ای به‌طول ۸۸۷ bp قسمت ′۳ انتهایی ژن COI از ژنوم حلقوی میتوکندری با بکارگیری پرایمرهای جلودار COI و عقب‌دار CUL-Rev با توالی ′5-TAGAGCTTAAATTCATTGCACTAATC-3 جهت تعیین توالی ژن مربوطه تکثیر داده شد.

این پرایمرها مکمل حد فاصل باز شماره ۲۱۱۱ تا باز شماره ۲۹۹۸ در مقایسه با ژنوم mtDNA آنوفل گامبیه[۱۴] می‌باشد. ترکیب واکنش برای تکثیر هر دو قطعه DNA شامل $MgCl_2$ ۱/۵ mM، ۱ mM dNTPs، ۲/۵ mM 10x buffer، ۱ mM از هر پرایمر، ۱% Gelatin و۰/۵ mM ۱۶/۳ ddH_2O بود. به این ترکیب مقدار ۱µl، 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 $95^{\circ}C$ چهار دقیقه، ۳۲ سیکل حرارتی شامل $94^{\circ}C$ یک دقیقه، $53^{\circ}C$ یک دقیقه و $72^{\circ}C$ دو دقیقه و در انتها هفت دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ نگهداری می‌شوند تا Extension نهایی انجام شود. تنوع ژنتیکی محصولات PCR با استفاده از ۱۸ آنزیم‌مختلف *Hind*III، *Kpn*I، *Hpa*II، *Bam*HI، *Hae*II، *Eco*RI، *Msp*I، *Dra*I، *Cfr*13I، *Taq*I، *Not*I، *Alu*I، *Eco*RV، *Xho*I، *Fba*I، *Sal*I، *Bsty*I، *Hinf*I مورد بررسی قرار گرفتند. برای واکنشهای آنزیمی ۱۵–۱۰ میکرولیتر از محصولات PCR را با ۲/۵ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم (۱۰X) و پنج واحد آنزیم مخلوط کرده و حجم محلول را با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده و بسته به نوع آنزیم در درجه حرارت مناسب به‌مدت ۱۲–۴ ساعت نگهداری شدند. محصولات PCR و یا PCR-RFLP در ژل آگارز ۲–۱/۵٪ الکترفورز و بر روی دستگاه UV Transilluminator مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار حدود ۱۰۰–۸۰ میکرولیتر از محصولات PCR ژن COI مربوط به تعداد ۱۸ نمونه از جمعیت‌های مختلف گونه سوپرپیکتوس تهیه و جهت تعیین توالی (DNA sequencing) به کشور آلمان ارسال شد. برای هر نمونه DNA تعیین توالی از دو جهت انجام شد و توالی‌های بدست 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 در بانک جهانی ژنها (GeneBank) با شماره‌های دسترسی (Accession Numbers) AY900633 تا AY900650 به ثبت رسیده‌اند. توالی‌های حاصله با توالی‌های موجود در Gene Bank با استفاده از سایتهای اینترنتی مربوط به بانک جهانی ژنها یعنی FASTA search و یا Blast (http://www.ebi.ac.uk/fasta33/) مقایسه‌شدند. جهت‌مقایسه زنجیره پپتیدی حاصل از ژن COI ابتدا موقعیت شروع کدون‌ها برای ترجمه اسیدهای نوکلئیک با کمک مقاله رفرانس،[۱۴] مشخص و سپس تمام ۱۸ توالی موجود به کمک نرم افزار Translation Machine (http://www2.ebi.ac.uk/translate) به اسید آمینه ترجمه شدند. همچنین روابط سیستماتیک یا فیلوژنی (Phylogeny) بین جمعیتها با استفاده از روش‌های Maximum Parsimony Method و Neighbour-Joining Method با کمک نرم‌افزار MEGA2[۱۵] انجام گرفت (http://www.megasoftware.net). با روش Maximum Parsimony Method هـمه احتمالات فیلوژنیک را در نظر گرفته و با به حداقل رساندن مراحل تکاملی به نمایش بهترین درخت فیلوژنی (http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/parsimony.html)می‌پردازد و روش دوم بر اساس قرابت و مشابهت، گونه‌های نزدیک به هم دوتایی کنار هم قرار گرفته تا نهایتا" تمام گونه‌ها در آنالیز و درخت فیلوژنی وارد شوند (http://www.tau.ac.il/~doronadi/neighbourJoining.pdf).

یافته‌ها

PCR Amplification و PCR-RFLP

تکثیر بخش‌های COI-COII و COI از ژنوم میتوکندری نمونه‌های مورد بررسی با موفقیت انجام شد و به‌ترتیب محصولات PCR به‌طول ۱۵۱۲ bp و ۸۸۷ bp تولید شدند. بخش ′۳ انتهایی COI با بکارگیری پرایمرهای CUL-Reverse و COI(F) و بخش COI-COII با پرایمرهای COI(F) و COII(R) تکثیر شدند. تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها و جمعیتهای موجود در مرحله اول با بررسی الگوهای برشی آنزیم‌های قطع‌کننده (Restriction Enzymes) بر روی محصول ۱۵۱۲ bp مربوط به قطعه COI-COII انجام گردید. محصولات PCR، تحت تیمار با ۱۸ آنزیم قرار گرفتند. بعضی از آنزیم‌ها فاقد محل برش، بعضی دارای محل برش یکسان و برخی دیگر دارای محل برش متفاوت بودند و توانستند چندشکلی ژنتیکی (Genetic polymorphism) را در بین نمونه‌ها نشان دهند. برای مثال الگوهای هضم آنزیمی و طول باندهای ایجاد شده توسط آنزیم *Alu*I توانست سه شکل ژنتیکی یا هاپلوتایپ یا آلل به نام‌های A، B و C در بین جمعیت‌های مختلف ایران نشان دهد (شکل شماره۱). نکته قابل توجه این بود که هر سه فرم در منطقه سیستان و بلوچستان مشاهده می‌شود و سایر نمونه‌های مربوط به سایر نقاط ایران اکثرا" مشابه و از نوع A و تعدادی هم از نوع C بودند.

DNA Sequencing:

برای تعیین توالی ژن COI و مشخص شدن میزان حقیقی اختلافات ژنتیکی میان جمعیتهای مختلف آنوفل سوپرپیکتوس مجموعا" تعداد ۱۸ نمونه *An.superpictus* از مناطق تحت مطالعه مورد سکوئنسینگ قرار گرفتند که نتایج آن در Genbank تحت شماره‌های AY900633 تا AY900650 به ثبت رسیده‌اند. طول توالی‌های قابل شمارش و بدون

ابهام از ژن COI نمونه‌ها بین ۷۰۸ الی ۷۵۰ باز می‌باشد که برای مقایسه توالی‌ها حداقل ممکن یعنی حدود ۷۰۸ bp از تمام نمونه‌ها با هم مقایسه گردیدند. درصد بازهای آدنین و تیمین A+T به‌طور متوسط ۷۱٪ و میزان کل تنوع ژنتیکی (Rate of variation) در ۷۰۸ bp 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 می‌باشد. درصد قابل ملاحظه‌ای از اختلافات ژنتیکی مشاهده شده مربوط به تفاوت بین جمعیتهای بلوچستان و کهنوج با سایر مناطق ایران بود. علاوه بر این در داخل جمعیت بلوچستان و کهنوج ۵-۲ درصد اختلاف ژنتیکی وجود داشت.

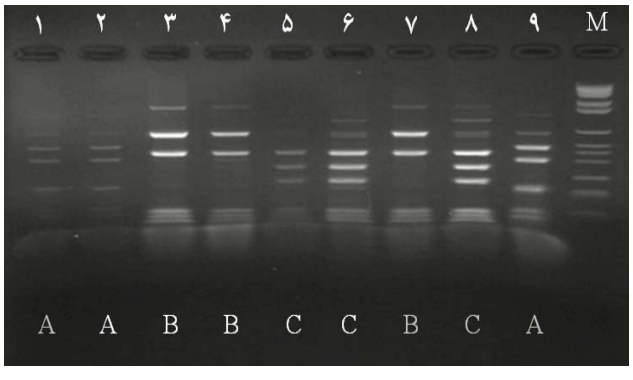
فیلوژنی:

جهت افزایش اعتماد و قراردادن ریشه (root) در درخت فیلوژنی یک توالی از اسیدهای نوکلئیک ژن COI موجود در Genbank از جنس *Anopheles* که قرابت زیادی با گونه آنوفل سوپرپیکتوس نداشت به‌عنوان Outgroup (نماینده خارج از گروه) انتخاب شد. در این بررسی از توالی ژن COI آنوفلس آرابینسیس (*An.arabiensis*) با شماره دسترسی (Accessron Number) AF 417705 استفاده شد. درخت فیلوژنی حاصل از روش Maximum Parsimony Method و در شکل شماره۲ ارائه شده است. همانطور که درخت شجره‌شناسی نشان می‌دهد جمعیتهای سوپرپیکتوس ایران در دو دسته کلی قرار می‌گیرند و در هر دسته گروه‌های فرعی وجود دارند که هر کدام می‌توانند نماینده یک گونه باشند.

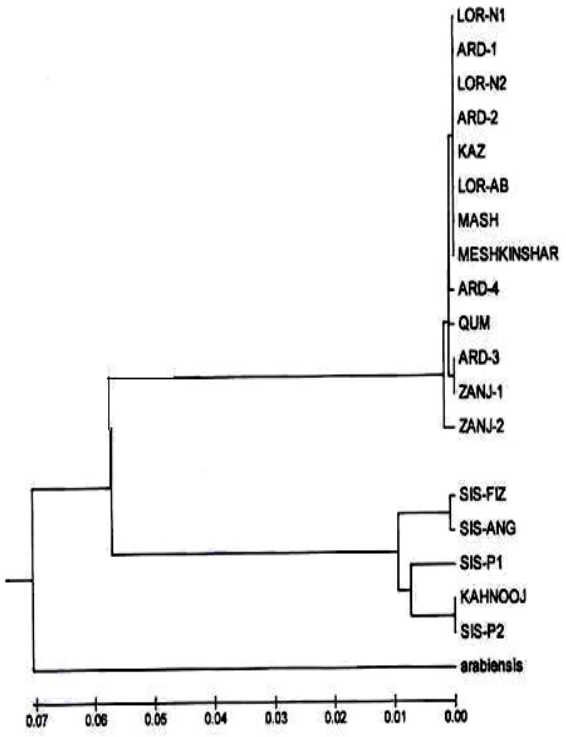
نحوه تقسیم‌بندی جمعیتها نشان می‌دهد که به احتمال زیاد جمعیتهای جنوب شرقی کشور ایران (سیستان و بلوچستان و کهنوج) ترکیبی از حداقل دوگونه و حداکثر سه‌گونه و سایر جمعیتهای مرکز و شمال غربی کشور یک گونه دیگر را تشکیل می‌دهند. این چهارگونه در قالب چهار شاخه (گروه) اصلی که شامل سه گروه در بلوچستان و کهنوج که عبارتند از ۱) بخشی از جمعیت روستای پیرین ده، ۲) بخشی از جمعیت روستای پیرین ده شهرستان ایرانشهر و کهنوج کرمان و ۳) روستای فیروزآباد و ده انگوری از بخش سرباز شهرستان ایرانشهر و گروه۴ که متعلق به جمعیتهای استان اردبیل (شهرستان گرمی)، دادین علیا کازرون در استان فارس، استان زنجان، شهرستان الیگودرز در استان لرستان، شهرستان مشکین شهر (روستای کوجنق)، استان قم و آشخانه مشهد می‌باشد. در درخت‌های فیلوژنی گروه‌های اصلی کاملا" متمایز از همدیگر مشخص می‌باشند. مقایسه اسیدهای آمینه جمعیتهای مختلف نشان داد که تنها ۰/۸٪ درصد اختلاف بین نمونه‌ها وجود دارد. تفاوت شدید اختلافات ژنتیکی بین جمعیتها بین اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه حاکی از ماهیت خاموش موتاسیونها (Silent mutations) می‌باشد.

جدول-۱: مشخصات مکانی نمونه‌های صید شده آنوفل سوپرپیکتوس (شامل نمونه‌های لارو و بالغ) در سیستان و بلوچستان، اردبیل و لرستان تابستان سال ۱۳۸۲.

استان	شهرستان	شهر	روستا	تعداد آنوفل صید شده
سیستان و بلوچستان	ایرانشهر	سرباز	روستای پیرین ده از بخش پارود	۲۳
			روستای فیروزآباد ،بخش راسک	۱۷
			روستای انگوری بخش پارود	۶۰
اردبیل	گرمی	گرمی	روستای آقا محمد بیگلو	۱۵۰
لرستان	الیگودرز	ازنا	مبارک‌آباد، سرخیمه‌گه، دستگرد، کیگوران، مرگسر گلسفید، شول‌آباد، پیر امام، ایوج (روستاهای کوهستانی)	۷۰
جمع	---	---	------	۳۲۰



شکل-۱: نتایج PCR-RFLP قطعه COI-COII بطول تقریبی حدود ۱۵۱۲ bp در جمعیتهای مختلف آنوفل سوپرپیکتوس تحت تیمار با آنزیم AluI، سه هاپلوتایپ موجود در سیستان و بلوچستان در تصویر مشخص است. ۱: کازرون، ۲ و ۳: روستای پیرین ده سیستان و بلوچستان، ۴ تا ۷: روستای فیروزآباد سیستان و بلوچستان، ۸: اردبیل، ۹: لرستان، M: مارکر ملکولی شماره ۸ (Roche)



شکل-۲: درخت فیلوژنتیک حاصل از توالی‌های DNA ژن COI بطول ۷۰۸ bp در جمعیتهای مختلف آنوفل سوپرپیکتوس با بکارگیری روش Maximum Parsimony method. مقیاس پایین نمودار بیان کننده فاصله ژنتیکی می باشد.
LOR-N1: فرم تیپیک استان لرستان، ARD: اردبیل، KAZ: کازرون، LOR-AB: فرم غیر تیپیک استان اردبیل، MASH: مشهد، MESHKINSHAHR: شهرستان مشکین شهر در استان اردبیل، QUM: قم، ZANJ: زنجان، SIS-FIZ: روستای فیروزآباد استان سیستان و بلوچستان، SIS-ANG: روستای انگوری استان سیستان و بلوچستان، SIS-P1: روستای پیرین ده استان سیستان و بلوچستان، KAHNOOJ: شهرستان کهنوج در استان کرمان.

بحث

با توجه به پراکندگی بسیار وسیع آنوفل سوپرپیکتوس در ایران و نیز اختلافات مورفولوژیک، کرموزومی، رفتاری و آلودگی به انگل مالاریا در این‌گونه و همچنین به‌دلیل افزایش مسافرتها (ورود و خروج) به مناطق اندمیک و خطر امکان بازگشت مالاریا به مناطق پاک‌شده تحت اشغال این‌گونه، تشخیص دقیق ساختار جمعیت‌های مختلف آنوفل سوپرپیکتوس جهت شناسایی و تعیین هویت آنها برای مطالعات و اقدامات پیشگیری‌کننده مالاریا در ایران اقدامی لازم به نظر می‌رسد. مطالعات سیتوژنتیکی انجام شده بر روی نمونه‌هایی مختلف آنوفل سوپر پیکتوس در جنوب ایتالیا نشان داده که پلی‌مورفیسم کروموزومی در این‌گونه وجود دارد[۱۶] و از طرف دیگر نشان داده شده است که پلی‌مورفیسم کرموزومی در گونه‌های آنوفل اکثر مواقع ارتباط مستقیمی با قدرت انتقال بیماری مالاریا داشته است[۱۷] بنابراین انجام مطالعات ژنتیکی و مشخص نمودن ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها در کنار سایر مطالعات اپیدمیولوژیک می‌تواند در هدفمند نمودن مبارزه با ناقلین مالاریا موثر واقع شود. در این مطالعه اختلافات ژنتیکی زیادی بین جمعیتهای مختلف سوپرپیکتوس مورد مطالعه مشاهده شد. این اختلافات بیشتر وابسته و مربوط به منطقه جغرافیایی صید بودند و روش‌های مختلف صید و یا مکان و زمان صید در هر منطقه نقش زیادی در اختلافات نداشتند. این بررسی تاثیر اقلیمها و آب و هواهای مختلف بر تنوع ژنتیکی گونه سوپرپیکتوس در مناطق مختلف جغرافیایی ایران را به‌خوبی نشان داد. نتایج حاصله نشان دادند که حداقل سه و حداکثر چهار تیپ، فرم و یا گونه مختلف ژنتیکی در بین جمعیتهای مختلف این گونه وجود دارد. این نتایج نشان دادند که فرمهای مناطق جنوب شرقی کشور کاملا" متمایز از گونه یا فرم موجود در سایر نقاط ایران می‌باشند. نکته قابل توجه این است که در منطقه بلوچستان، تنوع ژنتیکی مشاهده شده بین نمونه‌ها خیلی زیاد بود. یکی از دلایل تنوع بسیار بالا در منطقه بلوچستان مربوط به موقعیت منحصر به فرد منطقه بلوچستان می‌باشد که در محل تلاقی سه منطقه اورینتال، پالهآرکتیک، و آفروتروپیکا قرار گرفته است و بدین ترتیب ترکیبی از گونه‌ها یا فرمهای بیولوژیکی سازگار با این سه منطقه را به‌طور همزمان می‌تواند در بر داشته باشد. میزان تنوع ژنتکی در ژن COI جمعیتهای بلوچستان ۵-۲٪ محاسبه شد. این مقدار بیشتر از میزان تغییرات گزارش شده درون جمعیت یک‌گونه (Intra-population variation) می‌باشد. برای مثال در درون گونه آنوفل گامبیه از کمپلکس گامبیه این میزان کمتر از ۰/۱٪[۱۸] و در درون گونه آنوفل ساکاروی این مقدار ۲٪ گزارش شده است.[۱۹] مقدار تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده بین گونه‌های A و B در کمپلکس آنوفل کولیسیفاسیس *An.culicifacies* complex ۵-۴٪ و در کمپلکس آنوفل گامبیه ۶-۰٪ محاسبه شده است.[۱۸و۲۰و۲۱] بنابراین به احتمال زیاد گونه آنوفل سوپرپیکتوس با بیش از ۱۲٪ اختلاف ژنتیکی شامل بیش از یک گونه است و از گونه‌های کمپلکس محسوب می‌شود. این اولین گزارش از کمپلکس بودن این گونه در دنیا می‌باشد. تجزیه و تحلیل

درختهای فیلوژنی به‌روشهای مختلف نیز نشان داد که بیش از یک گونه در ایران وجود دارد. میزان تنوع ژنتیکی در جمعیتهای مختلف تحت بررسی حدود ۱۲/۳٪ محاسبه شد. مقدار اختلاف ژنتیکی موجود نشان می‌دهد که انشعاب و گونه‌زایی در آنوفل سوپرپیکتوس و بوجود آمدن گونه‌های سیبلینگ در آن به‌تازگی صورت نگرفته است. با توجه به استاندارد ارائه شده برای سرعت تغییرات ژنتیکی در میتوکندری یا ساعت ملکولی (molecular clock) و معادل بودن هر دو درصد اختلاف ژنتیکی با یک میلیون سال،[۲۲] به نظر می‌رسد سابقه گونه‌زایی در این آنوفل به شش میلیون سال قبل باز می‌گردد. با توجه به اینکه هزینه‌های کنترل ناقلین روز به‌روز افزایش می‌یابد اهمیت شناسائی گونه‌های Cryptic که دارای استعداد یا ظرفیت انتقال (Vectorial capacity) متفاوت هستند، آشکار می‌شود. بررسی توالی نوکلئوتیدهای ژن سیتوکروم اکسیداز یک (COI) از ابزارهای بیوسیستماتیک نوین می‌باشد که از آن در بررسی‌های جمعیتی، تکاملی و طبقه‌بندی استفاده می‌گردد.

ژن COI بزرگترین ژن میتوکندری موجودات پرسلولی می‌باشد و از بخش‌های مختلف این ژن جهت مطالعه در گروه‌های مختلف حشرات به‌ویژه سطوح گونه‌های کمپلکس و جمعیتها استفاده شده است.[۲۰و۲۱و۲۳و۲۴] طبق نتایج حاصل از این مطالعه، آنزیمهای هضم‌کننده مختلفی را جهت انجام واکنشهای PCR-RFLP برای تفکیک اعضاء آنوفل سوپرپیکتوس می‌توان بکار گرفت. آنزیم *Alu*I بین آنزیمهای مختلف به‌تنهایی قادر به تفکیک تمام اعضاء و حتی اختلافات درون گونه‌ای می‌باشد. در این مطالعه از طریق تیمار با آنزیم *Alu*I و مطالعه بر روی COI-COII سه هاپلوتایپ در استان سیستان و بلوچستان مشخص شد.

در پایان ذکر این نکته ضروری است که بررسی و تعیین قطعی تعداد گونه‌های سیبلینگ آنوفل سوپرپیکتوس در تمام نقاط انتشار آن در ایران و نقش هر کدام در انتقال مالاریا به مطالعات وسیع و همه‌جانبه نیازمند بوده و باید با مطالعات اپیدمیولوژیک مالاریا همراه گردد. علاوه بر این لازم است نتایج بدست آمده در این تحقیق با سایر مطالعات ژنتیکی از جمله مطالعه بر روی سایر بخش‌های ژنوم میتوکندری و هسته و نیز مطالعات سیتولوژیک بخصوص پلی‌تن کرموزوم تکمیل و مورد تایید قرار گیرد.

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. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72: 285-90.
۲. منوچهری عبدالوهاب، زعیم مرتضی، م عمادی. مروری بر وضع بیماری مالاریا در ایران. مجله دارو و درمان ۱۳۷۰، سال ۹، شماره ۹۷: صفحات ۱۷ تا ۱۲.
۳. ادریسیان غلامسین. مروری بر وضعیت مالاریا در ایران. مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ۱۳۸۱; سال ۱، شماره ۱، صفحات ۵۰ تا ۶۰.
۴. فقیه محمد علی. مالاریا شناسی و ریشه کنی مالاریا تهران، انتشارات دانشگاه تهران ۱۳۴۸، شماره ۱۲۵۷، صفحه ۷۲۶.
۵. منوچهری، عبدالوهاب، مروری بر اکولوژی ناقلین مالاریا در ایران. انتشارات دانشکده بهداشت، ۱۳۶۴ ، شماره ۲۴،۷۷صفحه.
6. Sabatini A, Coluzzi M, Boccolini D. Field studies on inversion polymorphism in Anopheles superpictus from southern Italy. *Parassitologia* 1989; 31: 69-87.
7. White GB. Systematic reappraisal of Anopheles maculipennis complex. *Mosquito System* 1978; 10: 13-44.
8. 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.
9. 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.
10. 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 polymerase chain reaction primers. *Entomol Soc Am* 1994; 87: 651-701.
11. Black IV, Munstermann LE. Molecular taxonomy and systematics of Arthropod Vectors. In: The Biology of Disease Vectors. Beaty BJ, WC Marquardt, Editors. University Press of Colorado: 1996; p. 438-70.
12. Shahgudian, E.R. Biological and Bionomic features of malaria vectors in Iran, their role and importance. *Sch Publ Hlth* 1962; 9: 1-8.
13. Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the Anopheles gambiae complex . *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 37-41.

14. 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.
15. Kumar A, Rai KS. Chromosomal localization and copy number of 18S+28S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Hereditas* 1990; 113: 277-89.
16. Torre A, Fanello C, Akogbeto M, Dossou-yovo J, Favia G, Petrarca V, et al. Molecular evidence of incipient speciation within Anopheles gambiae s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 2001; 10: 9-18.
17. Subbarao KS. Anopheline species complexes in south-east Asia. *World Health Organization Documents:* 81pp. 1997.
18. Oshaghi,M.A. The use of mitochondrial DNA in the molecular systematics of malaria vectors. Ph.D. Thesis University of Liverpool, Liverpool School of Tropical Medicine. 1998, 355pp.
19. Sedaghat,M.M., Linton,Y.-M., Nicolescu, G., Smith, L., Koliopoulos, G., Zounos,A.K., Oshaghi,M.A., Vatandoust, H. &Harbach, R.E. Morphological and molecular characterization of *Anopheles (Anopheles)sacharovi* Favre, a primary vector of malaria in the Middle East. *Systematic Entomology*. 2003; 28, 1-16.
20. Besansky N.J., Lehnmann, T., Thomas Fahey,T., Fontenille, D., Braack, E.O., Hawley, W.A. and Collins, F.H. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis,* suggest extensive gene flow. *Genet.* 1997;147**:**1817-1828.
21. Besansky N.J., powell,J. R., Caccone, A. and Hamm D.M. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.(USA).* 1994; 91**:**6885-6888.
22. DeSalle,R., Freedman, T., Prager, M. and Wilson, A.C. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaian *Drosophila.*1987; *J.Mol.Evol.*26: 157-164.
23. Porter, C.H. and Collins, F.H. Species–diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae) *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 45 : 271-279 .
24. Linton, Y.-M., Smith,L., Koliopoulos,G., Samanidou-Vojadjoglou,A., Zounos, A.K.& Harbach,R.E. Morphological and molecular characterization of *Anopheles(Anopheles)maculipennis* Meigen, type species of the genus and nominotypical member of the *Maculipennis* Complex .*Systematic Entomology*. 2003; 28:399-55.

Mitochondrial DNA (mtDNA) structure of *Anopheles superpictus* populations in IRAN

Shemshad K[1]
Oshaghi MA[1*]
Yaghoobi-Ershadi MR[1]
Vatandoost H[1]
Abaie MR[1]
Akbarzadeh K[1]
Telmadarraiy Z[1]
Rafi-Nejad J[1]
Derakhshandeh PaykarP[2]

1- Department of Medical Entomology
2- Department of Human Genetics

Tehran University of Medical Sciences

* Corresponding author: Depart. of Medical Entomology, School of Public Health and Institute of Health Researches, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, 14155-6446, I.R.
Tel: +98-21-8951393
email:moshaghi@sina.tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** Malaria is still one of the main health problems in south and southeast provinces of Iran and recently on average 10,000-30,000 malaria cases were reported annually. Mosquitoes of *Anopheles superpictus* are one of the main malaria vectors in Iran and have been reported from all areas of the country including central plateau and plains of Alborz and Zagrous Mountains chains, and with low numbers in shore plains of the Persian Gulf and Caspian Sea. There are variations in larval and adult morphological characters and also in vectorial capacity of this species in different areas of Iran.
***Methods*:** This study has been conducted to investigate rate of mtDNA variation among various populations of this species in Iran. The sequence variation of an 1512 bp length of mitochondrial DNA (mtDNA) cytochrome oxidase subunits 1 and 2 (COI-COII) and an 708 bp sequences of COI gene were analyzed by PCR-RFLP and PCR-direct sequencing respectively.
***Results*:** This study showed that there are considerable variations between and within populations. Rate of variation was 12.3 % between populations and this was 2-5% for within Baluchistan population. Totally 4 haplotypes were observed between populations where 3 occur in Baluchistan and one in other places.
***Conclusion*:** This is the first report on existence of various haplotypes in *An. superpictus* in science, and presumably this species comprising siblings and is a species complex. Further studies need to confirm this result and to determine the relationship between mtDNA haplotypes and their role in malaria transmission in each locality.

Keywords: *Anopheles superpictus*, mtDNA, COI, COII, PCR-RFLP, malaria, Iran