مطالعه تنوع گونه‌های متعلق به کمپلکس گونه *Anopheles maculipennis s.l* با استفاده از نشانگر مولکولی سیتوکروم اکسیداز یک (COI) در استان آذربایجان غربی (مطالعه مقطعی)

شبنم پاشایی[۱]، محمدمهدی صداقت[۲]، فرخ دبیری[۳]، مظفر واحدی[٤]، مولود محمدی بوانی[٥]، علیرضا چاوشین[٦]*

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۲/۰۷ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۵/۰۷

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: گونه‌های مختلف پشه آنوفل علاوه بر ایجاد مزاحمت ناشی از گزش و خون‌خواری، به دلیل دارا بودن نقش اساسی در انتقال برخی بیماری‌ها، دارای اهمیت قابل‌توجهی هستند. مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی گونه‌های متعلق به کمپلکس گونه *Anopheles maculipennis s.l* در استان آذربایجان غربی با استفاده از نشانگر مولکولی سیتوکروم اکسیداز یک (COI)انجام شد.

مواد و روش کار: در مطالعه حاضر پس از جمع‌آوری نمونه‌ها از ۱۲ منطقه در پنج شهرستان در استان آذربایجان غربی، گونه‌ها شناسایی شدند. پس از استخراج DNA، با استفاده از پرایمرهای ویژه، توالی میتوکندریایی COI نمونه‌ها تکثیر شدند و قرابت و تفاوت‌های اختلافات توالی‌های نوکلئوتیدی درون‌گونه‌ای و برون گونه‌ای توالی‌های بررسی گردید.

یافته‌ها: حضور سه گونه *An. maculipennis s.s*، *An. messeae* و *An. sacharovi* از گونه کمپلکس موردمطالعه و تنوع ژنتیکی قابل‌توجه در بین جمعیت‌های مختلف این‌گونه‌ها در استان آذربایجان غربی مشاهده شد. پراکنش گونه *An. maculipennis s.s* در مناطق موردمطالعه غالب بود.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به حضور سه گونه‌ی مختلف از گونه‌های متعلق به کمپلکس *An. maculipennis s.l* در آذربایجان غربی و تفاوت‌های اساسی در ویژگی‌های زیستی، قدرت انتقال بیماری‌ها و مقاومت به حشره‌کش‌ها در هرکدام ازاین‌گونه‌ها، تعیین این پارامترها در تدوین برنامه‌های کنترلی برعلیه هر یک ازاین‌گونه‌ها در شرایط انتقال و استقرار بیماری‌های منتقله توسط این‌گونه‌ها، از اهمیت اساسی برخوردار است.

کلیدواژه‌ها: *Anopheles maculipennis s.l*، سیتوکروم اکسیداز یک (COI)، آذربایجان غربی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره هفتم، ص ٥١٤-٥٠٧، مهر ١٣٩٩

آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده نازلو، دانشکده بهداشت، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۵۲۳۰۰

Email: chavshin@umsu.ac.ir, chavshin@gmail.com

مقدمه

پشه‌ها به‌عنوان اعضای خانواده کولیسیده (شامل جنس‌هایی همچون Anopheles, Culex, Aedes) به‌واسطه ایجاد مزاحمت ناشی از گزش و خون‌خواری و انتقال بیماری‌ها، ازجمله حشرات مهم ازنظر پزشکی و بهداشت محسوب می‌شوند (۱). از میان گونه‌های مختلف متعلق به جنس‌های این خانواده، اعضای جنس آنوفل علاوه بر ایجاد مزاحمت، به دلیل دارا بودن نقش اساسی در انتقال بیماری‌های مهمی نظیر مالاریا و نیز نقش ثانویه اما قابل‌توجه در انتقال عوامل بیماری‌های بیماری‌هایی همچون فیلاریازیس لنفاویوآربوویروس‌های متعدد ازجمله تب نیل غربی موردتوجه قرار گرفته‌اند (۲).

برخی از گونه‌های آنوفل جزء گونه‌های کمپلکس (خصوصیات زیست‌شناسی و رفتاری متفاوت اما ویژگی‌های ظاهری یکسان) هستند. شناسایی این‌گونه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی

[۱] کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی ، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[۲] استاد، گروه حشره شناسی پزشکی ، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

[۳] استادی‌ار، گروه حشره شناسی پزشکی ، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[٤] کارشناس ارشد حشره شناسی پزشکی، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[٥] استادیار، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

٦ دانشیار گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسئول)

امکان‌پذیر نیست (۳). ازجمله گونه‌های مهم کمپلکس، گونه *Anopheles maculipennis s.l* است که تاکنون ۲۴ گونه از آن با پراکنش وسیع از اروپا و خاورمیانه گزارش شده‌اند (۴). این‌گونه علاوه بر نقش اساسی در انتقال مالاریا، در انتقال بیماری‌های بیماری‌هایی همچون فیلاریازیس لنفاوی، برخی بیماری‌های آربوویروسی همچون تب نیل غربی نقش دارد (۵). از گونه کمپلکس *An. maculipennis s.l*، تاکنون ۷ گونه از ایران گزارش شده‌اند (۶) که شامل *Anopheles atroparvus, Anopheles labranchiae, An. maculipennis, Anopheles messeae, Anopheles melanoon, An. sacharovi* and *Anopheles persiensis*، می‌باشند (۷-۹) . *An. maculipennis s.l* دارای پراکنش وسیع در شمال و شمال غرب ایران بوده (۱۰) و یکی از ناقلین مهم مالاریا در بخش‌های مذکور بوده است (۷). در همه‌گیری مالاریا در شمال و شمال غرب ایران، پس از فروپاشی شوروی در سال ۱۹۹۱، این‌گونه به‌عنوان ناقل اصلی، عمل نموده است (۱۱). با توجه به امکان حضور و همه‌گیری برخی بیماری‌های ویروسی منتقله توسط پشه‌ها در منطقه، احتمال نقش‌آفرینی این‌گونه در انتقال و استقرار احتمالی آن‌ها، دور از ذهن نیست (۱۲، ۱۳).

ازآنجاکه گونه*An. maculipennis s.l s.l* به‌عنوان یک‌گونه مطرح می‌باشد، با در نظر گرفتن تفاوت گونه‌های کمپلکس در خصوصیات زیستی و حتی قدرت انتقال بیماری‌ها، شناسایی دقیق گونه‌های ناقل بیماری به‌منظور تعیین نقش دقیق گونه‌ها در چرخه انتقال بیماری‌ها و نیز تدوین برنامه‌های کنترلی بر اساس خصوصیات زیستی و بوم‌شناختی آن‌ها از اهمیت بسیاری برخوردار است (۱۴). با توجه به شباهت بسیار بالای گونه‌های موجود در *An. maculipennis s.l* و عدم امکان جداسازی گونه‌های این مجموعه بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، از دیرباز از روش‌ها روش‌های مختلفی برای شناسایی و جداسازی گونه‌های آن استفاده شده است (۱۵ و ۸). با توجه به ناکارآمدی روش‌ها روش‌های معمول در تشخیص گونه‌ها (که همچنان نیز از اعتبار بالایی برخوردار است)، استفاده از نشانگرهای مولکولی در این حیطه، به‌عنوان روش‌ها روش‌های مکمل موردتوجه قرار گرفته و حتی بهره‌گیری از این روش‌ها، منجر به شناسایی گونه‌های جدید از کمپلکس *An. maculipennis s.l* شده است (۱۶). از میان نشانگرهای مولکولی متداول، بهره‌گیری از نشانگر سیتوکروم اکسیداز شماره یک (COI)، با توجه به کارآیی آن در شناسایی گونه‌های جانوری، دارای نقش و جایگاه تأیید شده است (۱۷، ۱۸).

گونه *An. maculipennis* s.*l* دارای پراکندگی وسیعی در سطح استان آذربایجان غربی می‌باشد (۱۳، ۱۹، ۲۰). با توجه موقعیت ویژه استان آذربایجان غربی (هم‌جواری با چندین کشور) و مخاطرات احتمالی ناشی از آن (بلایای سیاسی و طبیعی کشورهای هم‌جوار، ورود مهاجران)، تنوع اقلیمی آن و سابقه همه‌گیری و استقرار بیماری‌هایی که گونه *An. maculipennis s.l* در انتقال آن نقش دارد، ضرورت شناسایی دقیق این‌گونه را نشان می‌دهد. بر این اساس مطالعه حاضر باهدف شناسایی تنوع احتمالی گونه‌های موجود در گونه کمپلکس *An. maculipennis s.l* در استان آذربایجان غربی با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز شماره یک (COI) و آنالیز فیلوژنی این نشانگر در جمعیت‌های مختلف این‌گونه، طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر نمونه‌های پشه از ۱۲ منطقه در سطح پنج شهرستان ماکو، بازرگان، ارومیه، مهاباد و میاندوآب در استان آذربایجان غربی با استفاده از روش‌های استاندارد همچون ملاقه زنی برای صید لاروها و نیز صید دستی با آسپیراتور، صید از اماکن داخلی و خارجی برای نمونه‌های بالغ (جدول شماره ۱)، جمع‌آوری شدند (۲۱). نمونه‌های صید شده به آزمایشگاه گروه حشره‌شناسی پزشکی دانشکده بهداشت ارومیه منتقل شدند. شناسایی پشه‌های صید شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و با استفاده از کلیدهای تشخیص،، شناسایی شدند (۲۲). نمونه‌های مربوط به گونه کمپلکس*An. maculipennis s.l* از سایر نمونه‌ها جدا شده و تا زمان استخراج DNA و تکثیر بخشی از ژن COI، در یخچال با دمای ۴ درجه سیلسیوس نگهداری شدند.

از هر منطقه سه نمونه از گونه کمپلکس An. *maculipennis s.l* (مجموعاً ۳۶ عدد)، برای استخراج DNA انتخاب شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت یکتا تجهیز گستر، تهران، ایران) و بر اساس دستور العمل شرکت سازنده، انجام شد. به‌منظور تکثیر ژنCOI از پرایمرهای استاندارد استفاده شد (۲۳). تنظیم برنامه چرخه‌های حرارتی PCR با ۱۰ دقیقه زمان واگشایی ابتدایی دو رشته آغاز شد. برنامه حرارتی با ۳۰ چرخه (بصورت ۴۵ ثانیه ۹۵ درجه سیلسیوس، ۶۰ ثانیه ۵۱ درجه سیلسیوس و ۵۰ ثانیه ۷۲ درجه سیلسیوس)، ادامه یافت و با ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سیلسیوس، برنامه حرارتی خاتمه یافت.

محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز یک درصد آزموده شده و با استفاده از منبع ماوراء بنفش، آشکارسازی شدند. نمونه‌های دارای طول باند مورد انتظار (حدود ۶۵۰ جفت باز) و با کیفیت مناسب، برای تعیین توالی انتخاب و برای تعیین توالی ارسال شدند. توالی‌های به‌دست آمده برای شناسایی مشابهت و تفاوت‌های احتمالی با استفاده از نرم‌افزار Clustal Omega و نیز

شناسایی و دریافت توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک جهانی ژن با استفاده از روش BLAST ارزیابی شدند. توالی‌های ارزیابی شده، در بانک جهانی ژن ثبت شدند (جدول شماره ۱). توالی‌های حاصل از مطالعه حاضر همراه با توالی‌های مشابه به‌دست آمده از بانک جهانی ژن، با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (24) و الگوریتم Maximum Likelihood مبتنی بر Tamura-Nei مورد بررسی فیلوژنی قرار گرفتند (۲۵).

یافته‌ها

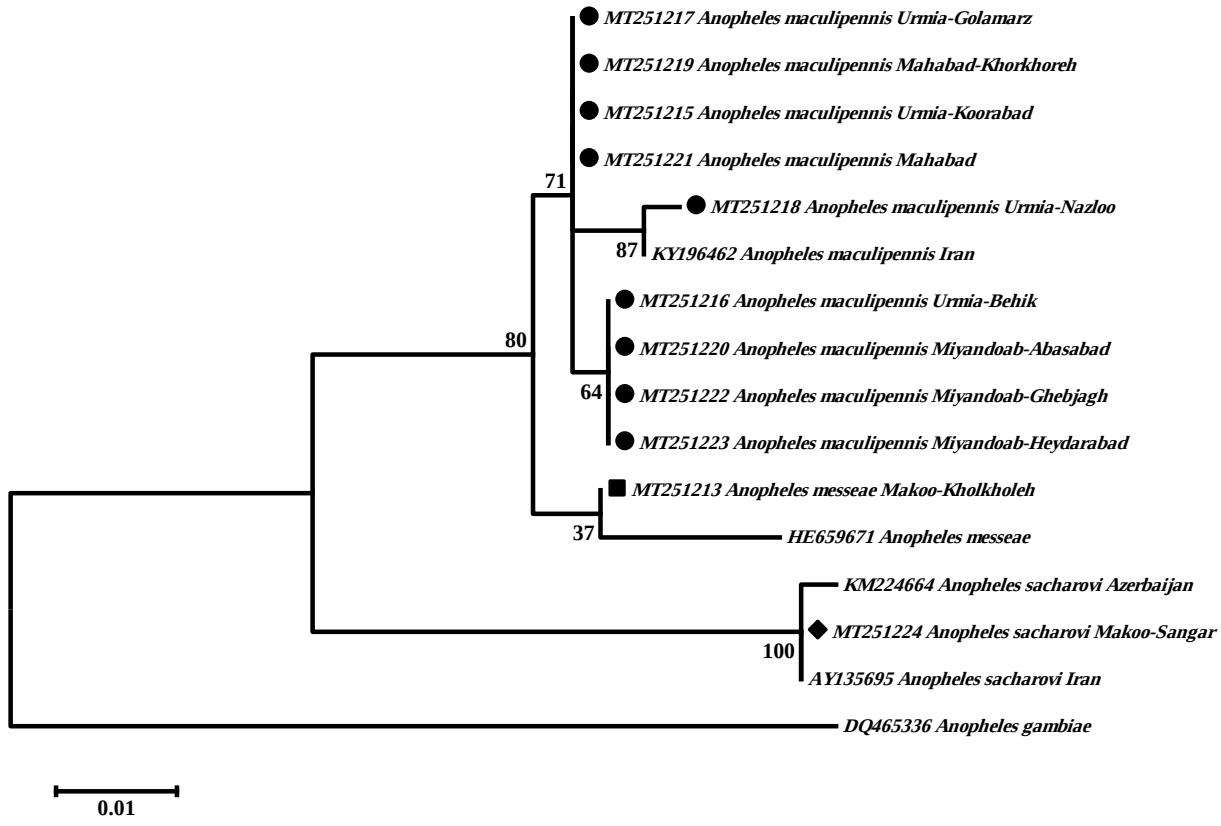
توالی‌های به‌دست آمده از نمونه‌های مورد بررسی در بانک جهانی ژن ثبت شدند (جدول ۱).

جدول (۱): جغرافیایی و شماره دسترسی گونه‌های شناسایی شده از گونه کمپلکس An. maculipennis s.l

شهرستان	منطقه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع منقطه	گونه شناسایی شده	شماره دسترسی
ارومیه	کورآباد	۳۷.۲۳۱۹۰	۴۴.۶۷۴۶۳۱	۱۵۴۵	Anopheles maculipennis	MT251215
	بهیک	۳۷.۷۱۳۷۹۷	۴۴.۶۶۴۴۳۹	۱۵۸۰	Anopheles maculipennis	MT251216
	گلمرز	۳۷.۶۵۹۸۶۹	۴۵.۲۰۷۵۵۰	۱۰۰۰	Anopheles maculipennis	MT251217
	نازلو	۳۷.۶۵۱۲۱۳	۴۴.۹۸۳۲۸۵	۱۳۵۸	Anopheles maculipennis	MT251218
بازرگان	یاریم قیه	۳۹.۴۶۷۴۰۱	۴۴.۴۲۲۳۴۷	۱۳۸۹	Anopheles messeae	MT251214
مهاباد	خورخوره	۳۶.۹۳۶۰۰۸	۴۵.۷۰۷۹۷۳	۱۲۷۹	Anopheles maculipennis	MT251219
	مهاباد	۳۶.۹۸۹۰۳۵	۴۵.۷۷۰۷۵۱	۱۲۷۰	Anopheles maculipennis	MT251221
ماکو	سنگر	۳۹.۳۱۶۴۱۰	۴۴.۴۳۲۰۳۹	۱۳۴۸	Anopheles sacharovi	MT251224
	خولخوله	۳۹.۷۲۷۰۰۰	۴۴.۶۳۳۸۱۳	۷۸۴	Anopheles messeae	MT251213
میاندوآب	حیدرآباد	۳۶.۹۸۳۸۶۴	۴۶.۰۷۳۷۵۸	۱۳۱۴	Anopheles maculipennis	MT251223
	عباس آباد	۳۷.۰۱۰۶۷۲	۴۶.۰۷۱۸۵۵	۱۳۰۰	Anopheles maculipennis	MT251220
	قبچاق	۳۷.۱۴۵۶	۴۶.۹۸۳۵	۱۳۱۰	Anopheles maculipennis	MT251222

نتایج حاصل از بررسی ساختار توالی COI و مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن، نشان از مشابهت بالای توالی‌های حاصل از مطالعه حاضر با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن برای گونه‌های مربوط به *An. maculipennis s.l* بود. آنالیز فیلوژنی توالی‌ها بیانگر چینش مشخص توالی‌های حاصل از مطالعه حاضر با توالی‌های شاهد از سه گونه از گونه‌های مربوط به *An. maculipennis s.l* بود. در درخت مربوط به آنالیز فیلوژنی، توالی‌های مطالعه حاضر به همراه توالی‌های شاهد از بانک جهانی ژن هرکدام در یک شاخه مجزا قرار گرفتند (تصویر شماره یک). با توجه به درصد بالای مشابهت (بیش از ۹۹ درصد) توالی‌های حاصل از این مطالعه با توالی‌های شاهد (از بانک جهانی ژن) و نیز بالا بودن احتمال محاسبه شده در قالب Bootstrap Value شناسایی توالی‌های مربوط به نمونه‌ها قطعی شد (تصویر ۱).

شواهد حاصل از آنالیز فیلوژنی توالی‌ها، حاکی از حضور سه گونه از کمپلکس *An. maculipennis s.l* در استان بود. سه گونه شناسایی شده شامل *An. maculipennis s.s* (از ۹ منطقه در شهرستان‌های ارومیه، مهاباد و میاندوآب)، *An. messeae* (از دو منطقه در شهرستان‌های ماکو و بازرگان) و *An. sacharovi* (از شهرستان ماکو) بودند.



تصویر (۱): آنالیز فیلوژنی توالی‌های ژن COI مربوط به گونه *An. maculipennis s.l* استان آذربایجان غربی با استفاده از الگوریتم Maximum Liklihood (توالی به‌دست آمده از این مطالعه و شناسایی شده به‌عنوان گونه *An. messeae*، توالی به‌دست آمده از این مطالعه و شناسایی شده به‌عنوان گونه *An. sacharovi* و توالی به‌دست آمده از این مطالعه و شناسایی شده به‌عنوان گونه *An. maculipennis s.s*)

بحث و نتیجه‌گیری

توالی COI به‌عنوان توالی استاندارد برای بررسی و تحلیل سیستماتیک مولکولی گونه‌های مختلف جانوری (بارکد گونه‌ها) مطرح است (۲۶، ۲۷). مطالعات متعددی در سطح بین المللی و داخلی در زمینه استفاده از این نشانگر میتوکندریایی انجام گرفته است. نتایج مطالعات مختلف نشانگر کارآیی نشانگر COI در جداسازی گونه و حتی جمعیت‌های مختلف از پشه‌ها بوده‌است (۲۹ و ۲۸ و ۳).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که نشانگر COI علاوه بر شناسایی و جداسازی سه گونه اصلی از کمپلکس‌های *An. maculipennis s.l* در استان آذربایجان غربی، بیانگر تنوع ژنتیکی قابل‌توجه در جمعیت‌های مختلف این‌گونه در سطح استان بود.

در مطالعه حاضر حضور سه گونه از گونه کمپلکس *An. maculipennis s.l* مشتمل بر *An. maculipennis*, *An. messeae* و *An. sacharovi* بر اساس مشابهت بالای توالی نشانگر COI نمونه‌های مورد بررسی با توالی‌های شاهد در بانک جهانی ژن و آنالیزهای فیلوژنی، تأیید شدند. این در حالیست که مطالعات ریخت‌شناسی پیشین انجام گرفته در منطقه، حاکی از حضور فقط گونه *An. maculipennis* بود (۱۹). بنابراین بهره‌گیری از نشانگر مولکولی COI منجر به شناخت دقیق‌تر از حضور گونه‌های متعدد متعلق به گونه کمپلکس *An. maculipennis s.l* شد.

از نشانگر COI در مقایسه با سایر نشانگرهای مولکولی معمول در طبقه بندی پشه‌ها، بطور محدودتری استفاده شده است و تاکنون از توالی ITS2 بیشتر استفاده شده است. در مطالعه‌ای که توسط دین پرست و همکاران در سال ۲۰۰۷ بر روی گونه‌های کمپلکس *An. maculipennis* با استفاده از توالی ITS2 در شمال ایران در پنج استان کشور (استان آذربایجان‌شرقی، اردبیل، گیلان، خراسان و مازندران) انجام شد، گونه‌های *An. atroparvus An. labranchia,An. maculipennis* و *An.messeae* از استان‌های مختلف شمالی شناسایی شدند (۸). به نظر می‌رسد وسعت نمونه‌گیری در مطالعه مذکور ازجمله دلایل تعدد گونه‌های شناسایی شده در مقایسه با مطالعه حاضر باشد. همچنین استفاده

از نشانگر ITS2 در سال ۲۰۰۳ برای شناسایی گونه‌های *An. maculipennis s.l* منتج به شناسایی گونه جدیدی از این ناقل (*An. persiensis*) برای اولین بار در ایران و دنیا شد (۱۶).

در مطالعه دیگری که با بهره‌گیری از نشانگر ITS2 برای شناسایی گونه‌های گونه کمپلکس *An. maculipennis s.l* در استان آذربایجان غربی انجام شد، گونه *An. persiensis* نیز از استان آذربایجان‌غربی گزارش شد (۳۰). عدم امکان شناسایی گونه *An. persiensis* در این مطالعه با استفاده از نشانگر COI ممکن است به دلیل عدم وجود توالی ثبت شده شاهد از گونه *An. persiensis* در بانک جهانی ژن باشد. بر این اساس می‌توان نتیجه گیری نمود که نتایج حاصل از بهره‌گیری از روش‌های مولکولی در شناسایی و طبقه بندی گونه‌ها، مشروط به وجود توالی‌های ثبت شده کافی در بانکهای معتبر بین المللی، قابل استناد خواهند بود.

در نهایت می‌توان نتیجه گیری نمود که با بهره‌گیری از نشانگر مولکولی COI و ITS2، حضور حداقل چهار گونه از گونه‌های موجود در گونه کمپلکس *An. maculipennis* در استان قطعی است. با توجه به تفاوت‌های اساسی در ویژگی‌های زیستی، قدرت انتقال بیماری‌ها و مقاومت به حشره‌کش‌ها، در هرکدام ازاین‌گونه‌ها، تعیین این پارامترها در تدوین برنامه‌های کنترلی برعلیه هرکدام ازاین‌گونه‌ها در شرایط انتقال و استقرار بیماری‌های منتقله توسط این‌گونه‌ها، از اهمیت اساسی برخوردار است. بر این اساس پیشنهاد می‌گردد تا توجه جدی به مطالعات تکمیلی در خصوص تعیین پارامترهای زیستی، مقاومت به حشره کش‌ها و قدرت انتقال هرکدام از بیماری‌ها توسط هرکدام از این ناقلین، بعمل آید.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، بخشی از نتایج پایان نامه نویسنده اول برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین از دانشگاه علوم پزشکی ارومیه بوده است. تیم تحقیقاتی از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارومیه از پژوهش حاضر در قالب طرح مصوب شماره ۱۸۳۰-۳۴، قدردانی می‌نماید.

References:

1. Clements AN. The biology of mosquitoes, Volume 3: Transmission of viruses and interactions with bacteria. Cabi; 1992.
2. Goddard J. Physician's guide to arthropods of medical importance. CRC Press; 2012.
3. Walton C, Sharpe R, Pritchard S, Thelwell NButlin R. Molecular identification of mosquito species. Biol J Linn Soc Lond 1999; 68 (1-2): 241-56.
4. Linton YM, Smith L, Koliopoulos G, Samanidou‐Voyadjoglou A, Zounos A KHarbach RE. 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 (1): 39-56.
5. Hubálek ZHalouzka J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. Emerg Infect Dis 1999; 5 (5): 643.
6. Saatlou ZA, Sedaghat MM, Taghilou B, Gholizadeh S. Identification of novel Glutathione S-Transferases epsilon 2 mutation in Anopheles maculipennis ss (Diptera: Culicidae). Heliyon 2019; 5 (8): e02262.
7. Azari-Hamidian S, Norouzi BHarbach RE. A detailed review of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Iran and their medical and veterinary importance. Acta Trop 2019; 194: 106-22.
8. Djadid ND, Gholizadeh S, Tafsiri E, Romi R, Gordeev M, Zakeri S. Molecular identification of Palearctic members of Anopheles maculipennis in northern Iran. Malar J 2007; 6 (1): 6.
9. Santa-Ana M, Khadem M, Capela R. Natural infection of Culex theileri (Diptera: Culicidae) with Dirofilaria immitis (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal. J Med Entomol 2006; 43 (1): 104-6.
10. Hanafi-Bojd AA, Sedaghat MM, Vatandoost H, Azari-Hamidian S, Pakdad K. Predicting environmentally suitable areas for Anopheles superpictus Grassi (sl), Anopheles maculipennis Meigen (sl.) and Anopheles sacharovi Favre (Diptera: Culicidae) in Iran. Parasit Vectors 2018; 11 (1): 382.

11. Vatandoost H, Ashraf H, Lak SS, Mahdi RE, Abai M, 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.
12. Azari-Hamidian S, Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Abai MR, Mobedi I, Linton YM, et al. Distribution and ecology of mosquitoes in a focus of dirofilariasis in northwestern Iran, with the first finding of filarial larvae in naturally infected local mosquitoes. Med Vet Entomol 2009; 23 (2): 111-21.
13. Bagheri M, Terenius O, Oshaghi MA, Motazakker M, Asgari S, Dabiri F, et al. West Nile virus in mosquitoes of Iranian wetlands. Vector Borne Zoonotic Dis 2015; 15 (12): 750-4.
14. Coetzee M, Craig MLE, Sueur D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the Anopheles gambiae complex. Parasitol Today 2000; 16 (2): 74-7.
15. Romi R, Boccolini D, Di Luca M, La Rosa G, Marinucci M. Identification of the sibling species of the Anopheles maculipennis complex by heteroduplex analysis. Insect Mol Biol 2000; 9 (5): 509-13.
16. Sedaghat M, Linton Y-M, Oshaghi M, Vatandoost H, Harbach R. The Anopheles maculipennis complex (Diptera: Culicidae) in Iran: molecular characterization and recognition of a new species. Bull Entomol Res 2003; 93 (6): 527-35.
17. Chan A, Chiang L-P, Hapuarachchi HC, Tan C-H, Pang S-C, Lee R, et al. DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. Parasit Vectors 2014; 7 (1): 569.
18. Laboudi M, Faraj C, Sadak A, Harrat Z, Boubidi SC, Harbach RE, et al. DNA barcodes confirm the presence of a single member of the Anopheles maculipennis group in Morocco and Algeria: An. sicaulti is conspecific with An. labranchiae. Acta tropica 2011; 118 (1): 6-13.
19. Khoshdel-Nezamiha F, Vatandoost H, Azari-Hamidian S, Bavani MM, Dabiri F, Entezar-Mahdi R, et al. Fauna and Larval Habitats of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of West Azerbaijan Province, Northwestern Iran. J Arthropod Borne Dis 2014; 8 (2): 163-73.
20. Khoshdel-Nezamiha F, Vatandoost H, Oshaghi MA, Azari-Hamidian S, Mianroodi R A, Dabiri F, et al. Molecular Characterization of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Northwestern Iran by Using rDNA-ITS2. Jpn J Infect Dis 2016; 69 (4): 319-22.
21. Silver JB. Mosquito ecology: field sampling methods. springer science & business media; 2007.
22. Azari-Hamidian S, Harbach RE. Keys to the adult females and fourth-instar larvae of the mosquitoes of Iran (Diptera: Culicidae). Zootaxa 2009; 2078 (1): 1-33.
23. Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol 1994; 3 (5): 294-9.
24. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013; 30 (12): 2725-9.
25. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol 1993; 10 (3): 512-26.
26. Hebert PD, Ratnasingham SDE, Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species Proc R Soc Lond B Biol Sci 2003; 270 (suppl_1): S96-S99.
27. Wilson-Wilde L, Norman J, Robertson J, Sarre S, Georges A. Current issues in species identification for forensic science and the validity of using the cytochrome oxidase I (COI) gene. Forensic science, medicine, and pathology 2010; 6 (3): 233-41.
28. Naddaf SR, Oshaghi MA, Vatandoost H. Confirmation of two sibling species among

Anopheles fluviatilis mosquitoes in south and southeastern Iran by analysis of cytochrome oxidase I gene. J Arthropod Borne Dis 2012; 6 (2): 144-50.

29. Oshaghi M, Yaaghoobi F, Abaie M. Pattern of mitochondrial DNA variation between and within Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae) biological forms suggests extensive gene flow. Acta tropica 2006; 99 (2-3): 226-33.

30. Pashaei S, Sedaghat MM, Dabiri F, Vahedi M, Aghaei-Afshar A, Chavshin AR. Molecular Analysis of ITS2 Fragment among Anopheles maculipennis Species Complex, West Azerbaijan Province, Iran. J Kerman Univ Med Sci 2017; 24 (3): 220-8.

Original Article

STUDY OF SPECIES DIVERSITY OF *ANOPHELES MACULIPENNIS S.L* USING MOLECULAR MARKER (CYTOCHROME OXIDASE I: COI) IN WEST AZERBAIJAN PROVINCE: A CROSS-SECTIONAL STUDY

Shabnam Pashaei[1], Mohammad Mahdi Sedaghat[2], Farrokh Dabiri[3], Mozaffar Vahedi[4], Mulood Mohammadi-Bavani[5], Ali Reza Chavshin[6]

Received: 26 April, 2020; Accepted: 28 July, 2020

Abstract

Background & Aims: Different species of Anopheles mosquitoes, in addition to causing discomfort from biting and blood-feeding, are of significant importance due to their essential role in the transmission of some diseases. The present study was performed to identify the species belonging to the *Anopheles maculipennis s.l* complex in West Azerbaijan province using the molecular marker cytochrome oxidase I (COI).

Materials & Methods: In the present study, collected species were identified after collecting samples from 12 regions in five counties in West Azerbaijan province. After DNA extraction, mitochondrial COI sequences of the samples were amplified using specific primers and the affinities and differences of nucleotide sequences were investigated.

Results: The presence of three species including *An. maculipennis s.s, An. messeae,* and *An. sacharovi* of the studied species complex and notable genetic variation was observed among different populations of these species in West Azerbaijan province. *An. maculipennis s.s* was found as a predominant species in the study areas.

Conclusion: Due to the presence of three different species belonging to the *An. maculipennis s.l* in West Azerbaijan and fundamental differences in biological characteristics, vectorial capacity and resistance to insecticides in each of these species, determination of these parameters in the design of control programs against each of these species in the conditions of transmission, and establishment of diseases transmitted by these species are of fundamental importance.

Keywords: *Anopheles maculipennis s.l*, Cytochrome Oxidase I (COI), West Azerbaijan Province

Address: Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
Tel: +984432752300
Email: chavshin@umsu.ac.ir, chavshin@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(7): 514 ISSN: 2717-008X

[1] MSc of Medical Entomology and Vector Control, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
[2] Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
[4] MSc of Medical Entomology and Vector Control, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
[5] Assistant Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
[6] Associate Professor, Department of Medical Entomology and Vector Control, School of Public Health, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran. (Corresponding Author)