فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی۵۵، جلد۱۴، شماره۴، پاییز ۱۴۰۰، صفحه ۱۲۹ تا ۱۳۷
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

کاربرد تکنیک DNA بارکدینگ و استفاده از نشانگرهای مولکولی در شناسایی کک ها

سعید محمّدی[۱]، هایکا لوترمن[۱]، نایجل بنت[۱]، بتین ون وورن[۲]
۱- گروه جانورشناسی و حشره شناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه پرتوریا، آفریقای جنوبی.saeed.mohammadi3@gmail.com
۲ -گروه جانورشناسی، دانشگاه ژوهانسبورگ، آفریقای جنوبی

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: کک ها حشرات کوچکی از راسته سیفونپترا (Siphonaptera)، بدون بال و بیضی شکل هستند که بدن آن ها در طرفین فشرده شده است. نقش آن ها در انتقال برخی از عوامل بیماری زا و ایجاد بیماری های زئونوز مانند طاعون و تیفوس آندمیک تایید شده است. با توجه به تنوع و نزدیک بودن ویژگی های ریخت شناسی، شناسایی دقیق گونه ها و زیرگونه های کک بر اساس مشخصات ریختی مشکل است. استفاده از نشانگرهای مولکولی و بارکدگذاری ژنتیکی با استفاده از یک یا چند بخش کوچک ازDNA به عنوان بخش استاندارد شده ژنوم یک روش رده بندی مناسب جهت شناسایی گونه هاست. هدف از این مطالعه ارزیابی روابط فیلوژنتیکی چیاستوپسیلا گودفری با استفاده از تعیین توالی قسمتی از ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ (COI)، با استفاده از روش‌های زیست سنجی و مولکولی است.

روش کار: این مطالعه در تمامی فصول سال ۲۰۱۷ در ذخیره گاه طبیعی Telperian/Ezemvelo واقع در استان خاتینگ آفریقای جنوبی انجام شد. به منظور صید جوندگان از تله های زنده گیر شرمن استفاده گردید. با استفاده از پنس تمامی کک های مستقر بر روی بدن میزبان جمع آوری و در الکل ۷۰ درصد نگهداری و جهت انجام بررسی ریختی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شد.

یافته ها: نتایج بررسی ریختی بین نمونه های جمع آوری شده نشان داد که دوریختی جنسی بین افراد نر و ماده این کک به استثنای متغیر طول بدن می باشد وجود ندارد ($P<0.05$). ترسیم درخت تبارزایی توالی ژن مورد مطالعه نشانگر تفاوت جزیی در افراد جمعیت مورد مطالعه می باشد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج درخت فیلوژنی، با وجود اختلافات جزیی همه نمونه ها در یک کلاد قرار گرفتند. نتایج این مطالعه مؤید این است که توالی COIمی‌تواند در مطالعه تعیین و بررسی روابط تبارشناسی کک‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: کک ها، سیتوکروم اکسیداز زیرواحد ۱ (COI)، مورفولوژی،DNA بارکدینگ.

مقدمه

کک ها یکی از مهم ترین انگل های خارجی و ناقلین بیماری های عفونی هستند که به راسته Siphonaptera تعلق دارند(۲۱). این حشرات کوچک که حدود یک تا چهار میلی متر طول دارند، خونخوار و بدون بال بوده و دارای بدنی بیضی شکل هستند که در طرفین فشرده شده است. هم چنین دارای پاهای عقبی بلند و جهنده هستند(۳). همه گونه های کک در مرحله بالغ انگل هستند و برخی از این گونه ها نقش متفاوتی در انتقال و همزیستی با عوامل بیماری زا دارند، بر این اساس شناسایی دقیق گونه های کک ضروری است. کک های بالغ ازطریق نیش زدن، مدفوع و بزاق در انتقال عوامل بیماری زا مانند طاعون، تیفوس اندمیک، تیفوس موشی، تب کیو، تولارمی و بارتونلا نقش دارند(۲). علاوه بر این، نیش این حشرات ممکن است باعث خارش و

عفونت های پوستی شود(۴). کک ها توزیع جهانی دارند و تا کنون ۲۷۰۰ گونه کک در دنیا شناسایی شده که این تعداد در ۱۶ خانواده و ۲۳۸ جنس قرار می گیرند(۱۳). کک ها به راحتی با میزبان های مختلف از جمله سطح بدن پستانداران و پرندگان زندگی می کنند(۱۰). وسیع بودن طیف میزبانی کک ها این قابلیت را به آن ها می دهد تا بتوانند به سهولت با میزبان‌های مختلف زندگی کنند(۱۱). شناسایی دقیق کک ها برای یک راهبرد موثر در برابر ناقلین و بیماری ها مورد نیاز است(۲۷). معمولاً مطالعات مولکولی اختلاف بین گونه-ای را دقیق تر از مطالعات ریختی نشان می دهد. به همین جهت امروزه بیشتر مطالعات فیلوژنی بر مبنای روش های مولکولی انجام می شود. شناسایی ریختی کک ها به زمان و تخصص آرایه شناسی نیاز دارد و معمولاً شناسایی بر پایه نمونه های بالغ انجام می گیرد. طی سال های گذشته مطالعات مرفولوژیک زیادی بر روی کک‌ها در کشورهای مختلف دنیا انجام گرفته است(۲۸). Linardi و همکاران(۱۴) مطالعه ای بر روی تمایز مرفولوژیکی دو گونه کک سگ و گربه با استفاده از مشخصه های مرفولوژیک انجام دادند. آن ها نشان دادند که برخی ویژگی های ریختی همچون خارهای ساق پای عقب از کلید تشخیصی مربوط به گونه مورد نظر تبعیت نمی کند و عنوان شد که در تشخیص ریختی با در نظر گرفتن تمام ویژگی های تشخیصی (از جمله سر، اندازه خار اول و دوم شانه گونه‌ای، تعداد گره یا مفصل در ساق پا، تعداد خار در ناحیه پشتی پای عقبی و کوکسا و تصویر قبضه کلاسپر) می‌توان به تصمیم گیری درست و قابل اطمینان دست یافت(۱۴). مشکلات موجود در روش های شناسایی سنتی حشرات که مبتنی بر ویژگی های ریخت شناسی هستند، پژوهش گران را بر آن داشت تا یک روش سریع و قابل اطمینان جهت شناسایی دقیق گونه ها به کار گیرند. در میان این روش ها، توالی یابی DNA بیشترین کاربرد را دارد(۸). ابزارهای شناسایی مولکولی، اطلاعاتی ارزشمند را برای حل مشکلات رده بندی در اختیار قرار داده است. فنون مبتنی بر توالی یابی DNA، در شناسایی و مطالعه روابط تبارشناسی حشرات مورد استفاده قرار گرفته اند. شناسایی مولکولی گونه ها به طور گسترده تری در مطالعات بوم شناختی و تشخیصی، به ویژه در رابطه با حشراتی که شناسایی ریخت شناسی آن‌ها سخت و وقت گیر مورد استفاده قرار می گیرد(۱۹). در این مطالعات از نواحی ریبوزومی و نیز ژن‌های میتوکندری استفاده می شود. تکنیک DNA بارکدینگ مورد استفاده در شناسایی مولکولی گونه ها، بر پایه یک قطعه استاندارد متشکل از ۵۰۰ تا ۶۵۰ باز از ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ DNA (COI) میتوکندری بوده که در مطالعات آرایه شناسی جانوران متداول است و شناسایی نمونه را تا سطح گونه امکان‌پذیر می کند(۸). در مطالعات مختلف این ژن برای نشان دادن اختلاف درون گونه ای، تشخیص جنس و گونه کک ها استفاده شده است(۲۶). خانواده Chimaeropsyllidae در منطقه آفروتروپیکال بومی محسوب می شوند(۲۰). این خانواده شامل سه زیرخانواده Chiastopsyllinae, Chimaeropsyllinae, Epiriminae است. جنس چیاستوپسیلا از خانواده Chimaeropsyllidae است و یکی از بزرگ ترین جنس های این خانواده است. بر اساس مطالعات قبلی عمده اعضای این جنس گونه های میزبان ویژه محسوب می شوند و جوندگان خانواده میوریده میزبان های غالب این گونه های کک می-باشند(۲۰ ، ۲۳). با وجود پراکنش تعداد ۱۹ گونه بومی از کک ها در این جنس در جنوب قاره آفریقا، این گروه هنوز به طور کافی از لحاظ رده بندی و ریخت شناسی مورد توجه قرار نگرفته است. گونه های این جنس به دلیل ویژگی های تخصص یافته سر و سینه از سایر

اعضای خانواده Chimaeropsyllidae متمایز می-شوند(۲۰).گونه *Chiastopsylla rossi* از این خانواده به عنوان یک ناقل مهم بیماری طاعون معرفی شده است(۶). چیاستوپسیلا گودفری یکی دیگر از اعضای این جنس برای نخستین بار از جونده *Rhabdomys pumilio* در آفریقای جنوبی جمع آوری گردیده است، اگرچه تا کنون از میزبان های دیگری نیز گزارش شده است(۲۰)، با این وجود به نظر گونه میزبان ویژه به شمار می آید و میزبان غالب آن *Micaelamys namaquensis* گزارش شده است(۶، ۲۰ ، ۲۴). هدف از انجام این مطالعه شناسایی گونه کک چیاستوپسیلا گودفری در آفریقای جنوبی با استفاده از تعیین‌توالی قسمتی از ژن COI و ارزیابی عملکرد این نشانگر بارکدینگ در تفکیک گونه های کک و در عین حال اختصاص بارکد انحصاری برای گونه مورد مطالعه است.

مواد و روش ها

نمونه برداری

این مطالعه طی تمامی فصول سال ۲۰۱۷ در ذخیره‌گاه طبیعی Telperian/Ezemvelo (25°41′S, 28°56′E) واقع در استان خاتینگ کشور آفریقای جنوبی انجام گردید. به منظور صید *Micaelamys namaquensis* از تله های زنده گیر شرمن (H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, Florida, USA) در هشت پلات نمونه برداری استفاده شد. این جونده در مناطق صخره‌ای پراکنش داشته و میزبان چندین گونه کک دیگر با اهمیت پزشکی و دامپزشکی مانند *Xenopsylla brasiliensis* است(۲۴). تله ها به تعداد ۱۵۰ عدد و در هر فصل به مدت یک ماه به مدت سه شبانه روز در هر پلات به صورت ترانسکت های نواری در سه نوار موازی(با فاصله ده متر از همدیگر) قرار داده شدند. تله‌ها در هنگام غروب آفتاب در محل پلات ها قرار داده شده و اوایل صبح جمع‌آوری گردیدند. پس از ثبت موقعیت جغرافیایی محل صید و مشخصات ظاهری میزبان، جانور به صورت زنده برای جمع آوری انگل های خارجی مورد بررسی قرار گرفته وکک ها با پنس جدا گردیده و در لوله حاوی الکل ۹۹ درصد قرار گرفتند و برای تشخیص با استفاده از کلید تشخیص شناسایی کک های آفریقا(۲۰) به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از جداسازی انگل ها، حیوان در زیستگاه خود رها شد.

عکس برداری و تحلیل ریخت شناسی

به منظور بررسی تفاوت ریخت شناسی جنس نر و ماده، اندازه گیری ها برای تعداد ۲۰ نمونه (۱۰ نر، ۱۰ ماده) از تصاویر دیجیتال تهیه شده با استریومیکروسکوپ چند کانونی Carl Zeiss Axio Zoom مجهز به دوربین رنگی(Axiocam 105 (Olympus, Tokyo, Japan استفاده شد. بدین منظور هفت صفت ریختی که شامل طول سر(حاشیه جلوی سر تا پیش سینه)، عرض سر(پیشانی تا پس سر)، طول نوتا(مجموع اندازه پرونوتوم، مزونوتوم و متانوتوم)، طول بدن (ترژیت ۱ تا ترژیت ۸)، عرض بدن (ترژیت ۵ تا استرنیت ۵) و همچنین استخوان ران عقبی و ساق پای عقبی با استفاده از نرم افزار ImageJ مورد بررسی قرار گرفت(۱). نرمال بودن متغیرهای ریختی با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. برای مقایسه ویژگی های ریختی بین نر و ماده از آزمون تی زوجی استفاده شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم-افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. مقدار $P\leq0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

استخراج و توالی یابی DNA

استخراج DNA از تعداد ده نمونه با استفاده از کیت مخصوص استخراج DNA توسط روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) انجام شد. تمام نمونه‌های کک به تعداد سه مرتبه در آب مقطر شسته شدند و متعاقباً به یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی

۲۰ میکرولیتر آنزیم پروتئینازK به عنوان بافر لیزکننده منتقل شدند و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از استخراج، تا زمان انجام واکنش PCR، نمونه های DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. برای توالی یابی ژن COI با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با استفاده از پرایمرهای ویژه (جدول ۱) از دستگاه ترموسایکلر (Multigene Optimax) استفاده شد. برنامه حرارتی واکنش PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سپس تیمار در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت نگهداری در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. در پایان بسط آنزیمی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. به منظور تایید تکثیر ناحیه مورد نظر، طی واکنش های PCR الکتروفورز مقدار سه میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد صورت گرفت. از روی شدت وضوح باندها می توان به کیفیت و تا حدودی کمیت DNA پی برد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR خالص سازی شد و به همراه ۳۰ میکرولیتر از هر یک پرایمرهای رفت و برگشت به روش سنگر با غلظت ۱۰ پیکومول در آزمایشگاه مطالعات مولکولی دانشگاه استلنبوش توالی یابی انجام شد.

تحلیل ژنتیکی

برای تجزیه و تحلیل نتایج از ابزارBLAST و رویه BLASTN در پایگاه NCBI جهت تعیین همولوژی توالی ها استفاده گردید. از نرم افزار Geneious R11 به منظور اصلاح و ردیف آرایی نوکلئوتیدی توالی ای ab1 استفاده شد(Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). سپس توالی ها توسط افزونه Clustal W در نرم افزار Geneious R11 هم ردیف شدند و به صورت چشمی تنظیم نهایی توالی ها صورت گرفت. برآورد میزان واگرایی تکاملی بین توالی ها با استفاده از فاصله ژنتیکی جفتی(Pairwise distances) انجام شد(۲۲). با توجه به این که هیچ توالی COIاز گونه های خانواده *Chimaeropsyllidae* در سامانه بانک ژن در دسترس نبود، برای ریشه دار کردن درخت تبارنما از نزدیک ترین خویشاوندان موجود در راسته Siphonaptera با کمک توالی های اعضای خانواده پولیسیده استفاده شد و از توالی COI تعدادی از گونه‌های کک خانواده پولیسیده شامل *Ctenocephalides canis*، *Echidnophaga gallinacea*، *Echidnophaga oschanini* ، و *Xenopsylla brasiliensis* به عنوان برون گروه استفاده شد. کد دسترسی هر کدام از توالی ها در شکل ۱ درج شده است. در نهایت درخت تبارزایی بر اساس روش بیشینه درست نمایی(Maximum likelihood) به کمک نرم افزار Geneious R11 ترسیم شد.

نتایج

توصیف اصلی و اولیه سگرمن (۲۰) از این گونه نسبتاً مختصر است. بنابراین، توصیف مجدد با جزییات بیشتر و دقیق تر الزامی است. تفاوت آن با سایر گونه های *Chiastipsylla*، به دلیل داشتن دو خار در شانه دهانی و خارهای شانه پرونوتوم است. اندازه‌گیری‌های ریخت سنجی برای هر دو جنس در جدول ۲ خلاصه شده‌اند. تنها تفاوت معنی‌دار آماری در داده‌های ریخت‌سنجی بین نرها و ماده‌های *C. godfreyi* برای صفت طول بدن بود که در ماده ها به طور معنی‌داری بزرگ‌تر از نرها بود ($P<0.05$) (جدول ۲). در این مطالعه برای نخستین بار ۶۱۷ جفت باز از ژن سیتوکروم اکسیداز COI مربوط به شش نمونه از کک های چیاستوپسیلا گود فری توالی-یابی شد. توالی های به دست آمده با توالی های بیرون گروه از چهار تاکسون متفاوت خانواده پولیسیده تجزیه و تحلیل گردید. بیشترین فاصله ژنتیکی مشاهده شده بین

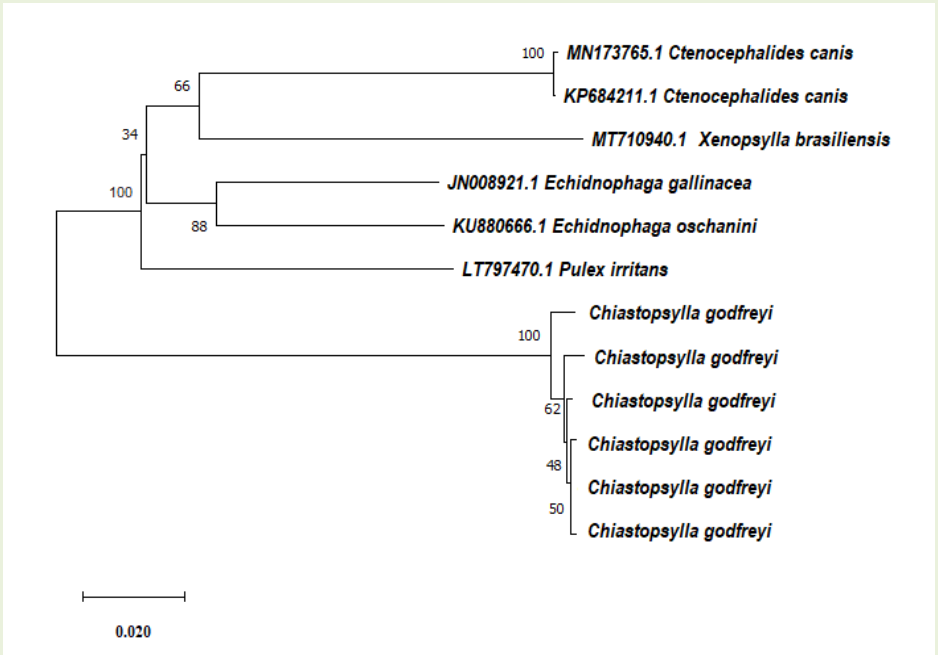
افراد به میزان تقریبی ۲۵ درصد برآورد گردید. بر اساس نتایج درخت تبارشناسی به روش بیشترین و تفاوت‌های توالی بین نمونه‌ها، نشان داده شده است که هر شش نمونه *C. godfreyi* یک گروه تک‌نیایی، با حمایت ۱۰۰٪ بوت استرپ تشکیل داده اند. با این حال، یک گونه کک منفرد یک کلاد مجزا تشکیل داده است که به این طریق از دیگر نمونه های مورد مطالعه جدا شده است. بر اساس نتایج درخت تبارشناسی، نمونه های مورد مطالعه در دو کلاد اصلی و سه خوشه فرعی قرار می گیرند و به خوبی از گونه های برون گروه جدا می شوند(شکل ۱). به نظر می آید در میان نمونه های چیاستوپسیلا گود فری فاصله ژنتیکی مشاهده شده است. چهار هاپلوتیپ برای شش نمونه مشاهده شد. توالی های دیگر از گونه های مختلف Pulicidae مستخرج ازبانک ژن به عنوان دومین کلاد اصلی با احتمال بوت استرپ بالا در کنار هم قرار گرفتند(شکل ۱).

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در فرآیند تکثیر ژن COI

منبع	توالی	نام پرایمر
Folmer *et al.*, 1994	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	COI- LCO1490 (F)
Folmer *et al.*, 1994	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	COI- HCO2198 (R)

جدول ۲- اندازه‌گیری‌های ریخت‌سنجی نر و ماده

متغیر (میلی‌متر)	ماده (۱۰ فرد)	نر (۱۰ فرد)	آزمون تی	
	میانگین±خطای استاندارد	میانگین±خطای استاندارد	آماره تی	احتمال
طول سر	۰/۵۲ ±۰/۰۱	۰/۵۰ ±۰/۰۳	۰/۴۸	۰/۶۳
عرض سر	۰/۳۲ ±۰/۰۱	۰/۳۵ ±۰/۰۳	۰/۵۲	-۰/۶۵
طول Nota	۰/۳۹ ±۰/۰۲	۰/۳۵ ±۰/۰۳	۰/۳۷	۰/۹۰
طول بدن	۱/۹۲ ±۰/۱۱	۱/۳۴ ±۰/۱۵	۲/۹۸	۰/۰۰۰۱[a]
عرض بدن	۱/۱۳ ±۰/۰۵	۰/۹۵ ±۰/۰۸	۱/۸۶	۰/۰۷
استخوان ران پشتی	۰/۴۶ ±۰/۰۱	۰/۴۲ ±۰/۰۳	۱/۰۷	۰/۲۹
طول ساق پای پشتی	۰/۴۳ ±۰/۰۲	۰/۳۹ ±۰/۰۲	۱/۱۴	۰/۲۶



شکل ۱- درخت تبارشناسی به روش بیشترین احتمال بر اساس ژن COI.

بحث و نتیجه گیری

اطلاعات کمی در مورد بارکدهای DNA میتوکندری برای ککک ها وجود دارد و تنوع ریختی این گونه ها در آفریقای جنوبی می تواند شناسایی ظاهری را دشوار کند. علیرغم مطالعات متعددی که در مورد پراکنش و استفاده از میزبان های جنس *Chiastopsylla* انجام شده است(۱۵، ۱۶)، بسیاری از جنبه های زیست-شناسی، تاکسونومی و هم چنین ویژگی های ژنتیکی این جنس به استثنای یک گونه *C. rossi* (۲۳ ، ۲۵) تا کنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در شناسایی ککک‌ها، مهم ترین ویژگی ریختی بدن که معمولاً در شناسایی مورد استفاده قرار می گیرد تعداد تار در قسمت بیرونی ساق پای عقبی است(۲۰). در مطالعه حاضر کلیه نمونه های ککک جمع آوری شده بر اساس ویژگی‌های ظاهری تشخیصی مشاهده شده از جمله پیشانی‌های گرد و کوتاه بودن برآمدگی پشتی، عدم وجود تار ریز روی ترژیت-های شکمی و طول کوتاه دو خار دهانی بر روی شانه دهانی به عنوان گونه *C. godfreyi* شناخته شدند. بر اساس مطالعات قبلی(۱۱، ۱۷) خصوصا در حشرات، اندازه بزرگ تر بدن در ماده ها که به دلیل قدرت باروری آن هاست تایید شده است که این مهم در مورد گونه مورد مطالعه نیز با اختلاف این متغیر در بین دو جنس مشهود است. ککک ها به عنوان ناقل بالقوه عوامل پاتوژن های عفونی از جمله گونه های مختلف *Bartonella* و *Rickettsia* عمل می کنند(۲ ، ۱۸). نرخ بالای آلودگی با بارتونلا برای میزبان ککک مورد مطالعه در کشور آفریقای جنوبی ثبت شده است(۷). اعضای راسته جوندگان پراکندگی گسترده ای در دنیا داشته و گونه های آن در زیستگاه های مختلف، از نواحی توندرا تا بیابان ها یافت می شوند. اهمیت جوندگان در انتقال بیماری های مشترک بین انسان و حیوان به عنوان یکی از موضوعات مورد توجه عموم است. با توجه به اهمیت این جانوران برای محیط زیست، بهداشت انسانی و محصولات غذایی، شناخت جانوران مرتبط با این پستانداران و به ویژه انگل های آن ها اهمیت زیادی پیدا می کند. ککک ها از مهم ترین انگل های خارجی هستند که می توانند طیف وسیعی از حیوانات را آلوده کنند و از آنها خونخواری کنند.ککک ها می توانند از حیوانات به انسان منتقل شده و انسان را آلوده نمایند. برای جلوگیری از آلودگی احتمالی، این حیوانات باید همیشه مورد بازدید قرار گیرند و در صورت آلودگی احتمالی درمان شوند. از این رو، شناسایی دقیق ککک¬های انگل این میزبان ها برای درک بهتر سناریوهای احتمالی بیماری های مشترک بین انسان و دام در آینده ضروری است. شناسایی گونه ککک ها بر اساس ویژگی های ریختی هر گونه و استفاده از کلیدهای تدوین شده صورت می گیرد و این ابزار تا به امروز در این زمینه کارکرد قابل قبولی از خود نشان داده است، اما در ارتباط با روابط فیلوژنی و تعریف نشانگرهای مناسب مولکولی در این گروه مهم از حشرات با اهمیت پزشکی و دامپزشکی هم چنان ابهاماتی باقی مانده اند که بایستی مورد توجه قرار گیرند(۲۵). آرایه شناسی ککک ها بر اساس تکثیر ژن COI یک ابزار ضروری برای شناسایی سریع گونه های مختلف بر اساس تنوع نوکلئوتیدی مورد استفاده در تمایز گونه ها است(۱۲). روش مولکولی امکان شناسایی انگل های خارجی با مشخصات ظاهری نزدیک به هم را فراهم می کند. Hornok و همکاران(۹) پس از مطالعه توالی میتوکندریایی در راسته سیفوناپترا در اروپا و مدیترانه که تنوع درون گونه ای در گونه های نزدیک به هم را مورد بررسی قرار دادند، توالی های میتوکندریایی را برای نشان دادن تنوع درون گونه ای در مناطق آب و هوایی مختلف مفید دانستند. قبل از انجام این مطالعه هیچ مرجع قابل اعتمادی برای توالی های COI برای کلیه گونه های جنس *Chiastopsylla* وجود

نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگر سیتوکروم اکسیداز ژن مفیدی برای تایید یافته های ریختی می باشد. مطالعات بیشتر به منظور بررسی تشخیص ژنتیکی سایر اعضای خانواده Chimaeropsyllidae و هم چنین تعیین توالی ژنوم کامل میتوکندری و استفاده از نشانگرها و نمونه های بیشتر به منظور ایجاد روابط فیلوژنتیکی گونه-های موجود در خانواده مورد نیاز است.

منابع

1.Abramoff MD., Magelhaes PJ., Ram SJ. (2004). Image processing with ImageJ. Biophotonics International, 11; 36-42.

2.Billeter SA., Levy MG., Chomel BB., Breitschwerdt, EB. (2008). Vector transmission of Bartonella species with emphasis on the potential for tick transmission. Medical and Veterinary Entomology, 22; 1–15.

3.Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. (2010). Fleas and flea-borne diseases. International Journal of Infectious Diseases, 14(8); 667–76.

4. Chomel BB., Boulouis HJ., Maruyama S., Breitschwerdt, EB. (2006). Bartonella spp in pets and effect on human health. Emerging Infectious Diseases, 12; 389–94.

5.Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoeket R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3(5); 294–9.

6.Haeselbarth E., Segerman J., Zumpt F. (1966). The arthropod parasites of vertebrates in Africa south of the Sahara (Ethiopian Region). Vol. III. (Insecta excl. Phthiraptera). Johannesburg: Publications of the South African Institute for Medical Research, 13; 52.

7. Hatyoka LM., Brettschneider H., Bennett NC., Kleynhans DJ., Muteka SP., Bastos ADS. (2019). Bartonella diversity and zoonotic potential in indigenous Tete Veld rats (Aethomys ineptus) from South Africa. Infection, Genetics and Evolution, 73; 44-48.

8.Hebert PDN., Ratnasingham S., deWaard JR. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society B (Suppl. 1), S96–S99.

9.Hornok S, Beck R, Farkas R, Grima A, Otranto D, Kontschan J, et al. (2018). High mitochondrial sequence divergence in synanthropic flea species (Insecta: Siphonaptera) from Europe and the Mediterranean. Parasites & Vectors, 11(1).

10. Khoobdel M., Shayeghi M., Piazak N., Bazrafkan S. (2011). Diversity and relative abundance of medically important fleas in the rural areas of Kohgiloye-andBoyerahmad, Iran. Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research, 9(3); 63-72.

11. Krasnov BR., Burdelov SA., Khokhlova IS., Burdelova NV. (2006). Sexual size dimorphism, morphological traits and jump performance in seven species of desert fleas (Siphonaptera). Journal of Zoology, 261; 181-189.

12. Lawrence, AL., Brown GK., Peters B., Spielman DS., Morin-adeline V., S˘lapeta J. (2014). High phylogenetic diversity of the cat flea (Ctenocephalides felis) at two mitochondrial DNA markers. Medical and Veterinary Entomology, 28; 330–336.

13. Lewis RE. (1999). Resume of the Siphonaptera (Insecta) of the World. Medical Entomology, 35; 377-389.

14. Linardi, PM., Santos JL. (2012). Ctenocephalides felis felis vs. Ctenocephalides canis (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. Rev Bras Parasitol Vet, 21(4); 345-54.

15. Matthee, S., Horak IG., Beaucournu JC., Durden LA., Ueckermann EA., McGeoch MA. (2007). Epifaunistic arthropod parasites of the four-striped mouse, Rhabdomys pumilio, in the Western Cape

Province, South Africa. Journal of Parasitology, 93; 47-59.
16. Matthee S., Krasnov BR. (2009). Searching for generality in the patterns of parasite abundance and distribution: Ectoparasites of a South African rodent, Rhabdomys pumilio. International Journal for Parasitology, 39; 781-788.
17. Poulin R. (2007). Evolutionary ecology of parasites. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 342 pp.
18. Pretorius AM., Beati L., Birtles RJ. (2004). Diversity of Bartonellae associated with small mammals inhabiting Free State province, South Africa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54; 1959-1967.
19. Saccaggi DL., Kruger K., Pietersen G. (2008). A multiplex PCR assay for the simultaneous identification of three mealybug species (Hemiptera: Pseudococcidae). Bulletin of Entomological Research, 98; 27– 33.
20. Segerman J. (1995). Siphonaptera of Southern Africa. Handbook for the identification of fleas, Publications of The South African Institute for Medical Research No. 57. Johannesburg, South Africa: South African Institute for Medical Research.
21. Service MW. (2008). Medical entomology for students. 4th ed.UK: University Press, 110-16.
22. Tamura K., Nei M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution, 10; 512-526 .
23.van der Mescht L. (2015). Exploring mechanisms that shape Siphonaptera composition and distribution patterns on small mammals across South Africa. PhD Thesis. Stellenbosch University, South Africa.
24.van der Mescht L., Matthee S. (2017). Host range and distribution of small mammal fleas in South Africa, with a focus on species of medical and veterinary importance: Flea vector distribution in South Africa. Medical and Veterinary Entomology, 31; 402-413.
25. Whiting MF, Whiting AS, Hastriter MW, Dittmar K. (2008). A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. Cladistics, 24(5): 677-707.
26. Ying MA., Hai-Long L., Jian H., Yan-Mei Z., Han-Qing Y., Liang L., Qi-Yong L. (2018). Molecular identification and phylogenetic analysis of 44 species of fleas in Qinghai Province, western China based on mtDNA COI gene sequence. Acta Ecologica Sinica, 61(4); 488-497 .
27. Yssouf A., Socolovschi C., Leulmi H., Kernif T., Bitam I., Audoly G., Almeras L., Raoult D., Parola P. (2014). Identification of flea species using MALDITOF/MS. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 37; 153–157.
28. Zurita A, Callejon R, Garcia-sanchez AM, Urdapilleta M, Lareschi M, Cutillas C. (2019). Origin, evolution, phylogeny and taxonomy of Pulex irritans. Medical and Veterinary Entomology, 33(2); 296-311.

Application of DNA Barcoding and Use of Molecular Markers in the Identification of Fleas

S.Mohammadi [1]

1. Department of Zoology and Entomology, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

saeed.mohammadi3@gmail.com

Received: 2021.08.06 **Accepted: 2021.09.16**

Abstract

Introduction & Objective: Fleas are small insects of the order Siphonaptera, wingless and oval, their bodies are compressed on both sides. Their role in transmitting some pathogens and causing zoonotic diseases has been confirmed. Using molecular markers and genetic barcoding using one or more small pieces of DNA as a standardized part of the genome is a good classification method to identify species. The aim of this study was to evaluate the phylogenetic relationships of an endemic flea in South Africa using sequencing of part of the cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene using morphometric and molecular methods.

Materials and Methods: This study was conducted in 2017 in the Telperian/Ezemvelo Nature Reserve in South Africa. Sherman live traps were used to catch rodents. Fleas were removed from their hosts using forceps, and mice were released at their point of capture within the same day. Fleas were stored in 70% alcohol and transferred to the laboratory for morphological and molecular analysis.

Results: The results of morphological analysis of the collected samples showed that there is no sexual dimorphism between males and females of this species except for the body length variable ($P < 0.05$). The phylogenetic tree showed a slight difference in the study population. Despite minor differences, all specimens were placed in a clad.

Conclusion: The results of this study confirm that the COI sequences can be used to study the genealogical relationships of fleas.

Keywords: Fleas, COI, morphology, DNA barcoding.