JESI
DOI: 10.22117/JESI.2018.122186.1233

نامه انجمن حشره‌شناسی ایران۱۲۷-۱۱۷,(۱)۳۸ ,۱۳۹۷
JOURNAL OF ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF IRAN
2018, 38 (1),117-127

شناسایی مولکولی و ریخت‌شناسی دو گونه از کنه‌های خانواده Pachylaelapidae Berlese (Acari: Mesostigmata) در استان گیلان

سمانه مجاهد[۱]، رضا حسینی*[۱و]، جلیل حاجی‌زاده[۱] و علی احدیت[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان و ۲- گروه گیاه‌پزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Rhosseini@guilan.ac.ir

چکیده

کنه‌های خانواده Pachylaelapidae Berlese, 1913 کنه‌هایی شکارگر با زندگی آزاد هستند و از بندپایان و نماتودهای خاک‌زی تغذیه می‌کنند. از آن‌جا که تعداد قابل توجهی از کنه‌های این خانواده شباهت‌های ریخت‌شناسی به هم داشته و همچنین توصیف‌کنندگان تاکسون‌های جدید به برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی استناد کرده‌اند که وجه تمایز کافی برای افتراق آن‌ها از تاکسون‌های نزدیک را ندارند، شناسایی برخی از این کنه‌ها دشوار است. در این موارد استفاده از روش‌های نوین شناسایی می‌تواند در این زمینه راه‌گشا باشد. بنابراین، در این بررسی تلاش شده تا همراه با شناسایی بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناسی و اندازه‌ای (شناسایی مورفومتریک)، از روش مولکولی بر پایه‌ی توالی‌یابی ناحیه ژنی ITS (Internal Transcribed Spacer) برای شناسایی دو گونه *Olopachys compositus* Koroleva, 1976 و *Olopachys caucasicus* Koroleva, 1976 استفاده شود. به این منظور پس از استخراج DNA، با استفاده از آغازگر مناسب ناحیه‌ی ITS این دو گونه تکثیر و توالی‌یابی شدند و توالی‌های به دست آمده در بانک ژن ثبت شد. پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها، میزان اختلاف ژنتیکی بین آن‌ها ۲/۳ درصد محاسبه شد. در نتیجه این بررسی‌ها، علاوه بر تفکیک دو گونه *O. compositus* و *O. caucasicus* بر اساس اختلافات ریختی، روش مولکولی نیز به خوبی اختلاف این دو گونه را تأیید کرد.

واژگان کلیدی: کنه، ITS، توالی‌یابی، Pachylaelapidae، *Olopachys*

Molecular and morphological identification of two species of mites of the family Pachylaelapidae Berlese (Acari: Mesostigmata) in Guilan province

Samaneh Mojahed[1], Reza Hosseini[1&]*, Jalil Hajizadeh[1] & Ali Ahadiyat[2]

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran & 2- Department of Plant Protection, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

* Corresponding author: E-mail: Rhosseini@guilan.ac.ir

Abstract

Mites of the family Pachylaelapidae Berlese, 1913 are a group of predatory mites with free-living species, feeding on arthropods and soil-inhabiting nematodes. Identification of these mites is difficult, because of morphological similarities in a significant number of species and also the fact that new taxons descriptors have referred to some morphological features that have not sufficient distinction criteria to differentiate them from close taxons. Therefore, the use of new identification methods can be helpful in this context. In the present study, along with identification, based on morphological characteristics and size (morphometric identification), we used a molecular method, based on the sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) gene to identify two species *Olopachys compositus* Koroleva, 1976 and *Olopachys caucasicus* Koroleva, 1976. After DNA extraction, ITS region were amplified and sequenced, using the appropriate primers and afterward the sequences were recorded in GeneBank. Alignment of sequences was performed and the genetic differences between species was calculated as 2.3 percent. As a result of these investigations, in addition to the separation of the two

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۱۹، پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۰۳.

دبیر تخصصی : علیرضا صبوری

species O. compositus and O. caucasicus based on morphological differences, the molecular method also well confirmed the difference between these two species.
Keywords: Mite, ITS, Sequencing, Pachylaelapidae, *Olopachys*
Received: 9 June 2018, *Accepted*: 25 August 2018

مقدمه

میان‌استیگمایان (Mesostigmata) راسته بزرگی از کنه‌ها با پراکنش جهانی هستند و از نظر زیستگاه و شیوه‌های زندگی تنوع زیادی دارند. بیشتر گونه‌های این راسته شکارگرانی با زندگی آزاد هستند، برخی از آن‌ها پارازیت درونی یا بیرونی پستانداران، پرندگان، خزندگان و دیگر مهره‌داران‌اند و تعداد نسبتاً کمی از قارچ‌ها، گرده یا شهد گل‌ها تغذیه می‌کنند (Lindquist *et al*., 2009). خانواده Pachylaelapidae از راسته‌ی میان‌استیگمایان و بالاخانواده Eviphidoidea، دارای ۱۶ جنس و ۲۵۳ گونه‌ی معتبر می‌باشد (Mašán & Halliday, 2014). گونه‌های این خانواده به طور معمول در موادآلی در حال پوسیدن مانند هوموس، گیاخاک، خزه، چوب‌های پوسیده، بقایای گیاهی و لانه پستانداران، پرندگان و حشرات اجتماعی یافت می‌شوند (Mašán, 2007). این کنه‌ها بیشتر با کنه‌های خانواده‌ی Macrochelidae زیستگاه مشترک دارند و از بی‌مهرگان ریز ساکن خاک تغذیه می‌کنند (Lindquist *et al*., 2009). بسیاری از گونه‌ها با حشرات سرگین‌دوست، به ویژه سوسک‌های خانواده Scarabaeidae و تعدادی از آن‌ها منحصراً با مورچه‌ها در ارتباط می‌باشند (Mašán, 2007).

در ایران، کنه‌های خانواده Pachylaelapidae چندان مورد بررسی قرار نگرفته‌اند. طی تحقیقات انجام شده تا سال ۱۳۹۱، پنج جنس و ۱۸ گونه از کنه‌های خانواده Pachylaelapidae از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (Kazemi & Rajaei, 2013). هم‌اکنون تعداد ۲۳ گونه از این خانواده در کشور شناسایی و توصیف شده است (Ahadiyat *et al*., 2014; Ahadiyat *et al*., 2016; Babaeian *et al*., 2016a; Babaeian *et al*., 2016b; Mojahed *et al*., 2017).

امروزه برای شناسایی گونه‌ها در کنار روش‌های شکل‌شناسی و سنتی، از نشانگرهای مولکولی به منظور حل بسیاری از مشکلات و ابهاماتی که ممکن است در شناسایی وجود داشته باشد، استفاده می‌شود (Hebert *et al*., 2003, 2004a,b; Moritz & Cicero, 2004). در دهه‌های اخیر، روش‌های مولکولی برای شناسایی حشرات فاقد ویژگی‌های شکل‌شناسی مشخص، استفاده شده‌اند (Caterino *et al*., 2000)، اما برای شناسایی کنه‌ها به‌ویژه کنه‌های غیر دامی (Mites)، کمتر از روش‌های مولکولی استفاده شده است و صفاتی که برای رده‌بندی و شناسایی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته به طور معمول صفات ریختی بوده‌اند. زمانی که صفات ریخت‌شناسی قادر به حل ابهامات ایجاد شده نباشند، کار شناسایی با مشکل مواجه می‌شود. مهم‌ترین دلیل این امر را می‌توان به شباهت زیاد کنه‌ها به هم نسبت داد. امروزه روش‌های مولکولی بر این محدودیت‌ها غلبه کرده و به عنوان روشی قابل اعتماد برای شناسایی گونه‌ها شناخته شده‌اند (Navajas & Fenton, 2000).

در میان روش‌های مولکولی، توالی‌یابی DNA بیشترین کاربرد را دارد (Kim *et al*., 2010; Lee *et al*., 2011). به طور کلی برای مطالعات سیستماتیک از ژن‌های DNA ریبوزومی، DNA هسته و میتوکندری استفاده شده است (Hoy, 2013). Cruickshank (2002) در مطالعه‌ای به بررسی و مقایسه نشانگرهای مولکولی مورد استفاده در کنه‌ها پرداخت و به این نتیجه رسید که ITS2 و COI ابزاری مطمئن برای مطالعات فیلوژنتیک در سطوح پایین رده‌بندی و ژن‌های 18S و 28S rDNA نشانگرهای مؤثری برای مطالعات فیلوژنتیک در سطوح عمیق‌تر هستند. ناحیه غیر کدکننده ITS (شامل نواحی ITS1 و ITS2) در DNA ریبوزومی (rDNA) قرار دارد و

به دلیل تنوع بسیار زیاد، نشانگری موثر برای تمایز گونه‌های شبیه به هم محسوب می‌شود. به عنوان مثال در کنه‌های خانواده Ixodidae (Zahler *et al*., 1995; Rich *et al*., 1997; Rumer *et al*., 2011)، زنبورهای پارازیتوئید خانواده Encyrtidae و Trichogrammatidae (Ciociola *et al*., 2001; Alvarez *et al*., 2002; Stouthamer *et al*., 2004)، سوسک‌های خانواده Curculionidae (Gallego & Galián, 2001) و مگس‌های خانواده Calliphoridae (Yusseff-Vanegas & Agnarsson, 2017)، ژن ITS توانست به راحتی گونه‌های نزدیک به هم را از یکدیگر تفکیک نماید.

تاکنون، مطالعات در زمینه شناسایی مولکولی کنه‌ها اندک بوده است. به عنوان مثال می‌توان به پژوهش De Rojas *et al.* (2007) اشاره نمود که نشانگرهای ITS1، 5.8S، ITS2 و 16S را به منظور تفکیک گونه‌های مختلف کنه‌ی *Rhinonyssus* Trouessart, 1894 (Rhinonyssidae) به کار بردند. Khalili Mahani *et al.* (2009) به کمک توالی‌های COXI و ITS2، تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف کنه *Allothrombium pulvinum* Ewing 1917 (Trombidiidae) را بررسی کردند. Potenza *et al.* (2009) با استفاده از نشانگرهای ITS1، 5.8S و ITS2 به شناسایی مولکولی کنه‌هایی که پیش‌تر با کلیدهای شکل‌شناسی تحت عنوان *Dermanyssus gallinae* (De Geer 1778) (Dermanyssidae) شناسایی شده بودند، پرداختند. Marangi *et al.* (2014) به منظور بررسی روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف کنه *D. gallinae* از دو نشانگر COI و ITS2 استفاده کردند. Tixier *et al.* (2017) با استفاده از ژن‌های ITSS، CytB mtDNA و 12S rRNA به بررسی وجود گونه‌های مخفی در جمعیت‌های مختلف کنه *Phytoseius finitimus* Ribaga 1904 (Phytoseiidae) پرداختند. Knee (2017) با استفاده از ناحیه‌ی ژنی COI به تجزیه و تحلیل فیلوژنی در چند گونه از کنه‌های خانواده Macrochelidae پرداخت. Ahaniazad (2018) کنه‌های زیرراسته نهان‌استیگمایان (Oribatida) را به کمک آغازگرهای هسته‌ای و میتوکندریایی مطالعه نمود.

پژوهش حاضر برای اولین بار با هدف تأیید شناسایی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی دو گونه *O. compositus* و *O. caucasicus* در استان گیلان، انجام شد. این مطالعه نخستین اطلاعات را در زمینه شناسایی مولکولی کنه‌های خانواده Pachylaelapidae ارائه می‌کند و می‌تواند گامی ابتدایی در پایه‌ریزی یک کتابخانه مرجع برای شناسایی مولکولی کنه‌ها در ایران باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و بررسی‌های ریخت‌شناسی

در تحقیق حاضر، نمونه‌برداری از خاک پای درختان پهن برگ و سوزنی برگ دو ناحیه‌ی جنگلی در استان گیلان: جنگل سراوان (عرض جغرافیایی: ۳۷°۰۶′ شمالی، طول جغرافیایی: ۴۹°۶۶′ شرقی، ارتفاع از سطح دریا: ۷۲ متر) و منطقه جنگلی امامزاده هاشم (عرض جغرافیایی: ۳۷°۰۲′ شمالی، طول جغرافیایی: ۴۹°۶۲′ شرقی، ارتفاع از سطح دریا: ۱۱۳ متر) رشت انجام شد. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری توسط قیف برلیز جداسازی شده، در محلول نسبیت (Nesbitt's fluid) شفاف و در نهایت به وسیله‌ی مایع هویر (Hoyer's medium) از آن‌ها اسلاید میکروسکوپی دائم تهیه شد. شناسایی گونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی Mašán (2007) و Koroleva (1977) انجام شد. اسلایدهای میکروسکوپی در آزمایشگاه کنه‌شناسی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده‌ی علوم کشاورزی دانشگاه گیلان نگهداری می‌شوند.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA

برای انجام شناسایی مولکولی، از نمونه‌های نگهداری شده در الکل ۹٦ درصد در دمای ۲۰- درجه سلسیوس استفاده شد. استخراج DNA از یک کنه کامل، با استفاده از روش فنل-کلروفرم Phenol-Chloroform (Hosseini, 2010) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای تکثیر بخشی از ژن ITS (با ۸۵۰ جفت باز) از ترکیب دو آغازگر ITS-F (5'-AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') به عنوان آغازگر رفت و ITS-R (5'- ATATGCTTAAATTCAGGGGG-3') به عنوان آغازگر برگشت (Navajas *et al*., 1999) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه MyGenie® (Bioneer, South Korea) انجام شد. مواد استفاده شده در این واکنش عبارت بود از ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x، یک میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر آغازگر رفت و یک میکرولیتر آغازگر برگشت (۱۰ میکرومولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تک‌پلیمراز (۵ واحد/میکرولیتر) و چهار میکرولیتر DNA الگو (۵۰ نانوگرم). برنامه‌ی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه‌ی سانتی‌گراد برای چهار دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه (واسرشته‌سازی در ۹۳ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، اتصال در ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه، گسترش در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک دقیقه) و در نهایت، گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. برای اطمینان از تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر، چهار میکرولیتر از محصول PCR توسط رنگ Safe (DNA Safe Stain®) رنگ‌آمیزی و روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری (الکتروفورز) شد.

توالی‌یابی

محصولات PCR به منظور توالی‌یابی برای شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer Corporation) ارسال شدند. توالی‌یابی برای ژن ITS به صورت دوطرفه از سمت آغازگر رفت (ITS-F) و آغازگر برگشت (ITS-R) انجام پذیرفت.

آنالیز داده‌ها

کروماتوگرام توالی‌های به دست آمده به کمک نرم‌افزار Finch TV® (نسخه 1.4.0) (www.geospiza.com) بررسی و ویرایش شد، سپس توسط ابزار BLASTn در بانک ژن با سایر توالی‌های موجود مقایسه شدند. بعد از ویرایش، توالی‌ها به بانک ژن ارسال شدند و بعد از بارگزاری در تارنمای بانک ژن (NCBI)، به هر توالی یک کد دسترسی اختصاص داده شد که به همراه زیستگاه هر گونه و منطقه‌ی جمع‌آوری در جدول ۱ نشان داده شده است. برای یافتن تفاوت‌ها در موقعیت نوکلئوتیدها، توالی‌ها توسط نرم‌افزار GeneDoc (نسخه 2.7.000) هم‌ردیف سازی و فاصله‌ی نوکلئوتیدی آن‌ها با استفاده از مدل دو پارامتری کیمورا (K2P) (Kimura, 1980) در نرم‌افزار MEGA (نسخه 6) محاسبه شد.

جدول ۱- شماره دسترسی ژن ITS، زیستگاه و منطقه‌ی جمع‌آوری مربوط به دو گونه *Olopachys compositus* و *O. caucasicus*

Table 1- Accession number for ITS gene, habitat, collected area from two species *Olopachys compositus* and *O. caucasicus.*

species	habitat	collected area	Accession number for ITS
Olopachys compositus	Forest areas of the Imamzadeh Hashem	Soil under poplar tree	MG251567
Olopachys caucasicus	Saravan forest	Soil under pine tree	MH175160

نتایج و بحث

از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی دو گونه‌ی *O. compositus* و *O. caucasicus* انجام شد. براساس نتایج ریخت‌شناسی، این دو گونه دارای مشترکات ظاهری بالایی بوده و مهم‌ترین وجه تمایزشان در شکل سیستم دریافت اسپرم آن‌ها است. در هر دو گونه طول موهای *J5* به شدت تحلیل رفته، حاشیه‌های پشتی- جانبی صفحه پشتی دارای دو جفت غده (gdZ1 و gdS4) بوده، ناحیه جانبی و اپیستوگاستریک دارای ۱۳ جفت موی ساده بوده که هفت جفت آن در ناحیه اپیستوگاستریک و شش جفت در ناحیه جانبی واقع شده‌اند و پنجه‌ی پای دوم دارای دو موی خاری شکل است، اما در گونه *O. caucasicus* سیستم دریافت اسپرم دارای یک لوله‌ی کوتاه، اسکلروتینه و کمی منحنی بوده و در گونه *O. compositus* این اندام دارای یک لوله‌ی طویل، خوب رشد یافته و دارای چندین خمیدگی می‌باشد.

بررسی‌ها نشان داد تاکنون هیچ ژنی از گونه‌های خانواده Pachylaelapidae در بانک ژن ثبت نشده است و توالی‌های به دست آمده در این بررسی، برای اولین‌بار به ثبت رسیدند. شماره دسترسی این گونه‌ها برای ناحیه ITS در جدول ۱ آورده شده است.

برای ناحیه مورد نظر قطعه‌ای به طول ۸۵۰ نوکلئوتید تکثیر شد. براساس آنالیز BLASTn حاصل از این ژن مشخص شد که بین توالی‌های مورد بررسی در این مطالعه با گونه‌های سه خانواده از راسته‌ی میان‌استیگمایان به نام خانواده Laelapidae با گونه‌های (۹۵٪) *Coleolaelaps agrestis* (Berlese, 1887)، (۹۲٪/۵) *Stratiolaelaps miles* Berlese, 1892 و (۹٤٪/۵) *Androlaelaps casalis* (Berlese, 1887)، خانواده‌ی Macronyssidae با گونه‌های (۹۳٪/۵) *Ornithonyssus sylviarum* (G. Canestrini & Fanzago, 1877) و (۸۹٪) *O. bacoti* (Hirst, 1913)، و خانواده Phytoseiidae با گونه‌های (۹۳٪) *Typhlodromus rhenanoides* Athias-Henriot, 1960، *K. aberrans* (Oudemans, 1930) (۹۳٪)، *Kampimodromus corylosus* Kolodochka, 2003 (۹۳٪)، *Phytoseius finitimus* (۸۸٪)، *A. herbicolus* Chant, 1959 (۸۸٪)، *largoensis* (Muma) (۸۸٪)، *Amblyseius* Ribaga، (۸۸٪) *Neoseiulus paspalivorus* (De Leon) (۸۸٪)، *N. cucumeris* (Oudemans, 1930) (۹۳٪)، 1973 *N. picanus* (Ragusa, 2000) (۹۳٪)، *N. idaeus* Denmark & Muma، *Typhlodromus vulgaris* Ehara, 1959 (۹۳٪)، *Phytoseiulus longipes* Evans (۹۳٪)، *Neoseiulella litoralis* Swirski & Amitai, 1984 (۹۳٪) و

(۹۳٪) *N. aceri* (Collyer, 1957) درصد شباهت زیادی وجود دارد. نتایج هم‌ترازی توالی گونه‌های مورد مطالعه توسط نرم‌افزار GeneDoc در شکل ۱ نشان داده شده است. نواحی ثابت و متغیر و همچنین فاصله موجود در توالی‌ها (gap) در این شکل مشخص شده است. طبق نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها مشخص شد که در مجموع این دو گونه در ۲۲ نوکلئوتید دارای تمایز هستند. نتایج حاصله این دو گونه را به خوبی از هم متمایز نمود و شناسایی ریخت‌شناسی را تأیید کرد. فاصله‌ی ژنتیکی بین دو گونه‌ی مورد مطالعه به میزان۲/۳ درصد به دست آمد.

به طور کلی، با توجه به اندازه‌ی بسیار کوچک بدن کنه‌ها و دشواری در شناسایی آن‌ها از طریق ویژگی‌های ظاهری، روش‌های مولکولی می‌توانند در زمینه شناسایی و تشخیص گونه‌ها مکمل خوبی برای روش‌های ریخت‌شناسی باشند. این روش‌ها در تحقیقات تاکسونومیک، ژنتیک جمعیت و ترسیم درخت تبارشناسی نیز استفاده می‌شود. امروزه شناسایی مولکولی توانسته در مطالعات رده‌بندی کنه‌شناسی نیز مفید باشد؛ به‌عنوان مثال DNA بارکدینگ در مطالعات متعددی برای توصیف گونه‌های جدید کنه‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Badek *et al*., 2008; Dabert *et al*., 2008; Skoracka, 2009; Glowska *et al*., 2012a, b). محققان دیگر مانند (2015) Bennur *et al*. در پژوهش خود نشان دادند که می‌توان به کمک دو ژن COI و ITS گونه‌های مختلف خانواده کنه‌های تارتن (Tetranychidae) را شناسایی کرد. (2015) Doña *et al.* از روش بارکدسازی DNA برای شناسایی کنه‌های پر (Astigmatina: Analgoidea and Pterolichoidea) پرندگان استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که این روش شناسایی ریخت‌شناسی را تأیید می‌کند. در بررسی دیگری، (2012) Matsuda *et al*. با استفاده از دو ژن COI و 28S، ۱۷ گونه از کنه‌های جنس (Tetranychidae) *Oligonychus* Berlese, 1886 را شناسایی کردند. (Knee *et al*. 2012) با استفاده از دو ژن COI و ITS2 به وجود گونه‌های مخفی در جنس (Uropodoidea) *Uroobovella* spp. پی بردند. (2006) Tixier *et al*. در یک کار مشابه نشان دادند که توالی‌های COI و ITS می‌توانند موقعیت دو گونه مخفی *Typhlodromus exhilarates* Ragusa و *T. phialatus* Athias-Henriot (Phytoseiidae) را شناسایی کنند. (2012) Okassa *et al*. با کمک دو نشانگر میتوکندریایی 12S rRNA و Cytb mtDNA موفق به شناسایی دو گونه مخفی *T.* (*Typhlodromus*) *exhilaratus* و *T.* (*T.*) *phialatus* (Phytoseiidae) که به عنوان شکارگرهای کنه‌های آفت از اروپای جنوبی گزارش شده‌اند، شدند. (2015) Hosseini-Chegeni در قالب رساله دکتری، به کمک ژن‌های COI و ITS2 به بررسی تنوع ریخت‌شناسی، شناسایی مولکولی و روابط تبارشناسی گونه‌های مختلف جنس *Hyalomma* Koch, 1844 (Ixodidae) پرداخت و وضعیت تاکسونومیک و تنوع درون و بین گونه‌ای کنه‌های این جنس را مشخص کرد. در بررسی دیگری، (2017) Hosseini-Chegeni *et al.* دو گونه از کنه‌های خانواده Ixodidae را با استفاده از نواحی COI و ITS2 شناسایی کردند.

براساس نتایج این مطالعه، توالی ژن ITS به خوبی توانست دو گونه‌ی مورد نظر را از هم تفکیک نموده و یافته‌های مورفومتریک را تأیید کند. به دلیل اهمیت محاسبه‌ی فواصل بین و درون-گونه‌ای در شناسایی مولکولی، استفاده از جمعیت‌های بیشتر اهمیت زیادی دارد. به علاوه استفاده از ژن‌هایی نظیر COI، 28S، COII و یا 18S در کنار ژن ITS می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری از گونه‌های این خانواده در برداشته باشد. در پایان پیشنهاد می‌شود به منظور تکمیل اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن، سایر گونه‌های این خانواده و دیگر خانواده‌های راسته میان‌استیگمایان از نظر مولکولی نیز بررسی شوند تا مقایسه‌ی بهتر توالی‌ها با یکدیگر و روابط تبارشناسی را امکان‌پذیر کند.

```
          *   20    *   40    *   60
O.compositus : ............................G.............T................. :  60
O.caucasicus : ............................................................- :  59
               ATCCATTCACTCGCTATGGGAGAATGGT CTAGAATGATGAC TAACTCGTTGGTTGTG

                        *        80         *       100         *       120
O.compositus : ................................TT........................... : 120
O.caucasicus : -..............................G............................ : 118
                GCTGGCGCGAGCTGTTACTCGCCGCCGTT   GCCGAGTTTCCCCTGTCCTACCCAGCT

                        *       140         *       160         *       180
O.compositus : ...T........................G................................ : 180
O.caucasicus : ..-...-..T.........................................T....... : 176
               TG  TG CG CGAGCGGACACGGTTGGA ACGGCCACGGGAGAGGCATATAT ACCACCG

                        *       200         *       220         *       240
O.compositus : ............................................................ : 240
O.caucasicus : ............................................................ : 236
               CGTAATCGGCTACGCACTGTATTGCTAAAACGGATATGTATAGCGTTCTCACTTGTGCCA

                        *       260         *       280         *       300
O.compositus : .............T.............................................. : 300
O.caucasicus : ...........................................................-..... : 295
               TTACCCGGCGCCA AAAGTTAGACGCTCACGTCGTTGGACCGACCAACTCGACA CCCTT

                        *       320         *       340         *       360
O.compositus : ............................................................ : 360
O.caucasicus : ............................................................ : 355
               TTTTCCTATTCTGTGCTATTGAGAATCAAACATTACAAGACTCAATATGGGGGATCACTT

                        *       380         *       400         *       420
O.compositus : ............................................................ : 420
O.caucasicus : ............................................................ : 415
               AGTCCTTAAATCGATGAAAAACATAGTAATTTGTGGAAATTGATGTGAGTTGTGAAATTT

                        *       440         *       460         *       480
O.compositus : ............................................................ : 480
O.caucasicus : ..............................................T............. : 475
               TGTGAGCATTGTGTTTTTGAATGAAAATTTCAGCATGGATGCA TCGTATCTATGCTACA

                        *       500         *       520         *       540
O.compositus : ............................................................ : 540
O.caucasicus : ............................................................ : 535
               TTTGTTTCAGTATATAAAATGTACCATACGTATTTACTATTGCTGTACCCGTTTACAGCA

                        *       560         *       580         *       600
O.compositus : ....................................T.......-...........T... : 599
O.caucasicus : ............................................................ : 595
               ATGGTATAAAATCTCTTGGATCACAAGCGTGATTTA CCAAGCC TAGAGTGGACG GGT

                        *       620         *       640         *       660
O.compositus : ............................................................ : 659
O.caucasicus : ............................................................ : 655
               TGTGATGCTGCCCGTGTTGCTGTGTCAAAGGCCGTTCTGGCTGGCGACGAACCAACAGCG

                        *       680         *       700         *       720
O.compositus : ......................................-..................... : 718
O.caucasicus : .........................G..........................T......... : 715
               ACGCTTGTCTGCAGCGTACGCCCG CCGTTCGACCAA TGACGTGTATCT AAATCAAGT


O.compositus : ..... : 723
O.caucasicus : ..... : 720
               GTGAC
```

شکل ۱- توالی‌های مرتب شده ناحیه ژنی ITS مربوط به دو گونه *Olopachys compositus* و *Olopachys caucasicus*. نقاط و خط تیره به ترتیب معرف نوکلئوتیدهای یکسان و فاصله (gap) است. اعداد نشان‌دهنده موقعیت هر نوکلئوتید در توالی‌های مرتب شده هستند.

Fig. 1. Alignmented sequences of the ITS gene for two species *Olopachys compositus* and *Olopachys caucasicus*. The dots and hyphen represent the same nucleotides and spacing (gap), respectively. Numbers represent the position of each nucleotide in alignmented sequences.

این مطالعه کوششی در جهت استفاده از نشانگر ITS برای شناسایی مولکولی دو گونه از کنه‌های خانواده Pachylaelapidae در استان گیلان بود. نتایج این مطالعه مؤید این است که نشانگر ITS می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب برای تفکیک این دو گونه به شمار رود. امید است پژوهش حاضر آغازی برای استفاده گسترده‌تر از روش‌های مولکولی در این راستا و زمینه‌های مشابه باشد.

References

Ahadiyat, A., Mašán, P., Cheraghali, Z. & Joharchi, O. (2014) First report of the subgenus *Pachylaelaps* (*Longipachylaelaps*) Mašán (Mesostigmata: Eviphidoidea: Pachylaelapidae) from Iran. *Persian Journal of Acarology* 3(1), 99–102.

Ahadiyat, A., Ghasemi Moghadam, S. & Cheraghali, Z. (2016) *Pachyseius masanisimilis* (Mesostigmata: Eviphidoidea: Pachylaelapidae), a new species of edaphic mite from Iran. *Persian Journal of Acarology* 5(2), 109–120.

Ahaniazad, M. (2018) *Fauna of oribatid mites (excluding Astigmatina) in the southern half of East Azarbaijan province, with morphological and molecular analysis of some species*. Ph.D thesis of Agricultural Entomology, Maragheh University, 261 pp.

Alvarez, J. M. & Hoy, M. A. (2002) Evaluation of the ribosomal ITS2 DNA sequences in separating closely related populations of the parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Annals of the Entomological Society of America* 95(2), 250–256.

Babaeian, E., Mašán, P. & Saboori, A. (2016a) The genus *Pachyseius* Berlese, 1910 in Iran (Acari: Pachylaelapidae). *Zootaxa* 4088(3), 420–428.

Babaeian, E., Mašán, P. & Saboori, A. (2016b) A new species of the genus *Pachyseius* Berlese (Acari: Pachylaelapidae) from Iran, with remarks on the world fauna. *Persian Journal of Acarology* 5(4), 299–309.

Badek, A., Dabert, M., Mironov, S. V. & Dabert J. (2008) New species of the genus *Proctophyllodes* (Analgoidea, Proctophyllodidae) from the cetti's warbler *Cettia cetti* (Passeriformes: Sylviidae) with DNA barcode data. *Annales Zoologici* 58, 397–402.

Bennur, Sh., Abida, P. S., Valsala, P. A., Mathew, D. & Bhaskar, H. (2015) DNA barcoding of spidermites (Prostigmata: Tetranychidae) in vegetables using COI and ITS2 markers. *Genome* 58(5), 195.

Caterino, M. S., Cho, S. & Sperling, F. A. H. (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45, 1–54.

Ciociola, A. I. Jr., Querino, R. B., Zucchi, R. A. & Stouthamer, R. (2001) Molecular identification of closely related species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae): *T. rojasi* Nagaraja and Nagarkatti and *T. lasallei* Pinto. *Neotropical Entomology* 30(4), 575–578.

Cruickshank, R. H. (2002) Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology* 7, 3–14.

Dabert, J., Ehrnsberger, R., & Dabert, M. (2008) *Glaucalges tytonis* sp. n. (Analgoidea, Xolalgidae) from the barn owl *Tyto alba* (Strigiformes, Tytonidae): compiling morphology with DNA barcode data for taxon descriptions in mites (Acari). *Zootaxa* 1719, 41–52.

Doña, J., Diaz-Real, J., Mironov, S., Bazaga, P., Serrano, D. & Jovani, R. (2015) DNA barcoding and minibarcoding as a powerful tool for feather mite studies. *Molecular Ecology Resources* 15(5), 1216–1225.

De Rojas, M., Ubeda, J. M., Cutillas, C., Mora, M. D., Ariza, C. and Guevara, D. (2007) Utility of ITS1–5.8S–ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species

identification and phylogenetic inference within the *Rhinonyssus coniventris* species complex (Acari: Rhinonyssidae). *Parasitology Research* 100, 1041–1046.

Gallego, D. & Galián, J. (2001) The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) of the rDNA differentiates the bark beetle forest pests *Tomicus destruens* and *T. piniperda*. *Insect Molecular Biology* 10(5), 415–20.

Glowska. E., Dragun-Damian, A. & Dabert, J. (2012a) *Picobia dziabaszewskii* sp. nov. (Acari, Syringophilidae) – combined description (morphology with DNA barcode data) of a new quill mite species parasitizing *Garrulax formosus* (Passeriformes: Leiothrichidae). *Zootaxa* 3224, 57–61.

Glowska. E., Dragun-Damian, A. & Dabert, J. (2012b) A new quill mite *Syringophiloidus pseudonigritae* sp. nov. (Prostigmata, Syringophilidae) parasitizing *Pseudonigrita arnaudi* (Passeriformes, Ploceidae) – a combined description using morphology and DNA barcode data. *Zootaxa* 3532, 64–68.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & Dewaard, J. R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceeding Royal Society of London* seri B 270, 313–321.

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H. & Hallwachs, W. (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101(41), 14812–14817.

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. & Francis, C. M. (2004b) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2(10), 1657–1663.

Hosseini, R. (2010) *An introduction to the principle of molecular biology techniques (with emphasizing on the study of insects)*. 232 pp. University of Guilan Press. [In Persian]

Hosseini-Chegeni, A. (2015) *Taxonomy and phylogeny of Iranian ticks of the genus Hyalomma (Acari: Ixodidae) with morphologic and molecular methods.* Ph.D thesis of Agricultural Entomology, Guilan University, 190 pp.

Hoseeini-Chegeni, A., Kayedi, M. H., Telmadarraiy, Z. & Hoseeini, R. (2017) Multiplex-PCR differentiation of two *Hyalomma* and two *Haemaphysalis* species (Acari: Ixodidae). *Persian Journal of Acarology* 6(2), 103–112.

Hoy, M. A. (2013) *Insect Molecular Genetics: an introduction to principles and applications*. 808 pp. Academic Press, London UK.

Kazemi, Sh. & Rajaei, A. (2013) An annotated checklist of Iranian Mesostigmata (Acari), excluding the family Phytoseiidae. *Persian Journal of Acarology* 2 (1), 63–158.

Khalili Mahani, M., Inomata, N., Saboori, A., Sayed Tabatabaei, B. E., Ishiyama, H., Ariana, A. & Szmidt, A. E. (2009) Genetic variation in populations of *Allothrombium pulvinum* (Acari: Trombidiidae) from Northern Iran revealed by mitochondrial coxI and nuclear rDNA ITS2 sequences. *Experimental and Applied Acarology* 48, 273–289.

Kim, J .H., Kim, D. K., Forest, F., Fay, M. F. & Chase, M. W. (2010) Molecular phylogenetics of Ruscaceae *sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 106, 775–790.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111–120.

Knee, W., Beaulieu, F., Skevington, J. H., Kelso, S. & Forbes, M. R. (2012) Cryptic species of mites (Uropodoidea: *Uroobovella* spp.) associated with burying beetles (Silphidae: *Nicrophorus*): The collapse of a host generalist revealed by molecular and morphological analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65(1), 276–286.

Knee, W. (2017) New *Macrocheles* species (Acari, Mesostigmata, Macrochelidae) associated with burying beetles (Silphidae, *Nicrophorus*) in North America. *ZooKeys* 721, 1–32.

Koroleva, E. V. (1977) Family Pachylaelaptidae Vitzthum, 1931. pp. 411–483 in Ghilyarov, M. S. & Bregetova, N. G. (Eds.), *A Key to the Soil Inhabiting Mites, Mesostigmata*. Zoological Institute of the Academy of Sciences: Petrograd. Nauka, Leningrad, USSR. [In Russian]

Lee, D., Karchin, R. & Beer, M. A. (2011) Discriminative prediction of mammalian enhancers from DNA sequence. *Genome Research* 21(12), 2167–2180.

Lindquist, E. E., Krantz, G. W. & Walter, D. E. (2009) Order Mesostigmata. pp. 124–232 in Krantz, G.W. & Walter, D.E. (Eds.), *A Manual of Acarology*. 3th ed. Texas Tech University Press, Lubbock, USA.

Marangi, M., Cantacessi, C., Sparagano, O. A., Camarda, A. & Giangaspero, A. (2014) Molecular characterization and phylogenetic inferences of *Dermanyssus gallinae* isolates in Italy within a European framework. *Medical and Veterinary Entomology* 28, 447–452.

Mašán, P. & Halliday, B. (2014) Review of the mite family Pachylaelapidae (Acari: Mesostigmata). *Zootaxa* 3776(1), 1–66.

Mašán, P. (2007) *A review of the family Pachylaelapidae in Slovakia, with systematic and ecology of European species (Acari: Mesostigmata: Eviphidoidea)*. 247 pp. Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava.

Matsuda, T., Hinomoto, N., Singh, R. N. & Gotoh, T. (2012) Molecular-Based Identification and Phylogeny of Oligonychus Species (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 105(3), 1043–1050.

Mojahed, S., Hajizadeh, J., Hosseini, R. & Ahadiyat, A. (2017) Contribution to the Pachylaelapidae (Acari: Mesostigmata) fauna in some parts of Guilan province of Iran. *Persian Journal of Acarology* 6, 269–285.

Moritz, C. & Cicero, C. (2004) DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology* 2(10), 1529–1534.

Navajas, M. & Fenton, B. (2000) The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology* 24, 751–774.

Navajas, M., Lagnel, J., Fauvel, G., & de Moraes, G. J. (1999) Sequence variation of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Experimental and Applied Acarology* 23, 851–859.

Okassa, M., Kreiter, S. & Tixier, M. S. (2012) Obtaining molecular data for all life stages of *Typhlodromus* (*Typhlodromus*) *exhilaratus* (Mesostigmata: Phytoseiidae): consequences for species identification. *Experimental and Applied Acarology* 57, 105–116.

Potenza, L., Cafiero, M. A., Camarda, A., Salandra, G.La., Cucchiarini, L. & Dachà, M. (2009) Characterization of *Dermanyssus gallinae* (Acarina: Dermanissydae) by sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Veterinary Research Communications* 33, 611–618.

Rich, S. M., Rosenthal, B. M., Telford, I., Spielman, S. R., Hartl, A. D. L. & Ayala, F. J. (1997) Heterogeneity of the internal transcribed spacer (ITS–2) region within individual deer ticks. *Insect Molecular Biolog*y 6(2), 123–129.

Rumer, L., Sheshukava, O., Dautel, H., Danosa–Mantke, O. & Niedrig, M. (2011) Differentiation of medically important Euro–Asian tick species Ixodes ricinus, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes hexagonus*, and *Dermacentor reticulatus* by polymerase chain reaction. *Vector–Borne and Zoonotic Diseases* 11(7), 899–905.

Skoracka, A. (2009) Description of *Abacarus lolii* n. sp. (Prostigmata: Eriophyoidea: Eriophyidae), a cryptic species within a grass-feeding *Abacarus* complex. *International Journal of Acarology* 35, 405–417.

Stouthamer, R., Hu, J., van Kan, F. J. P. M., Platner, G. R. & Pinto, J. D. (2004) The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal

gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *BioControl* 43, 421–440.

Tixier, M. S., Kreiter, S., Barbar, Z., Ragusa, S. & Cheval, B. (2006) Status of two cryptic species: *Typhlodromus exhilaratus* Ragusa and *Typhlodromus phialatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae): consequences for taxonomy. *Zoologia Scripta* 35(2), 115–122.

Tixier, M. S., Santos Vicente, V. D., Douin, M., Duso, C. & Kreiter, S. (2017) Great molecular variation within the species *Phytoseius finitimus* (Acari: Phytoseiidae): implications for diagnosis decision within the mite family Phytoseiidae. *Acarologia* 57(3), 493–515.

Yusseff-Vanegas, S. Z. & Agnarsson, I. (2017) DNA-barcoding of forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) in the Caribbean Region. *PeerJ* 3516, 1–40.

Zahler, M., Gothe, R. & Rinder, H. (1995) Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae). *International Journal of Parasitology* 25(12), 1413–1419.