نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۳۹۹؛ ۱۴(۱):۲۳-۳۱.

پراکندگی، ریخت‌شناسی و مطالعه فیلوژنتیکی *هیپودرما بویس* به روش PCR و تعیین توالی ژن *CO1* در سه منطقه آب و هوایی ایران

مریم قلی‌زاده[۱]، موسی توسلی[۲*]، علیرضا محمودیان[۳]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی انگل‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.
۲. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.
۳. استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه- ایران.

دریافت: ۲۰ تیرماه ۹۸ **پذیرش:** ۲۰ آبان‌ماه ۹۸

چکیده

هیپودرما بویس (Diptera: Oestridae) به طور عمده انگل بیماری‌زای گاو با پراکندگی جهانی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است و موجب خسارات اقتصادی شدید ناشی از کاهش میزان تولیدات دامی، از جمله شیر، گوشت و کاهش کیفیت پوست می‌شود. در این پژوهش نمونه‌های لارو از گاوهای کشتار شده در طی کشتار سالیانه از سه منطقه آب و هوایی ایران جمع‌آوری شد. استخراج DNA و آزمون PCR بر روی نمونه‌های لارو جمع‌آوری شده صورت گرفت؛ سپس محصول PCR خالص‌سازی شده برای تعیین توالی ارسال شد. پاسخ توالی‌های اخذ شده بررسی و تصحیح گردید؛ در نهایت، توزیع *هیپودرما بویس* با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی در سه منطقه آب و هوایی ایران بررسی شد. ژن *CO1* در لارو مگس‌های مولد میاز جمع‌آوری و بررسی شد و داده‌ها یک شباهت و هم‌بستگی بین گونه‌ای را نشان دادند. بر اساس مشاهدات ریخت‌شناسی از مجموع ۴۱۶ عدد لارو مرحله سوم به دست آمده از گاوهای کشتار شده در سه منطقه تعداد ۲۶۸ عدد (۶۴/۴٪) آن‌ها لارو *هیپودرما بویس* بود. متعاقب آنالیزهای فیلوژنتیک، مشخص شد که جدایه‌های حاضر با تعدادی از گونه‌های هیپودرمای پژوهش شده در کشورهای دیگر در یک خوشه قرار می‌گیرند در حالی که برخی دیگر از گونه‌ها در خوشه‌ی جدا قرار دارند. به نظر می‌رسد که ناحیه CO1 در بین عوامل مولد میاز بسیار متغیر است، یافته‌های حاضر همچنین نشان می‌دهد CO1 می‌تواند به عنوان یک نشانگر مولکولی مناسب برای شناسایی و تشخیص گونه‌های هیپودرما استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: *هیپودرما بویس*، پراکندگی، فیلوژنتیک، ژن *CO1*، ریخت‌شناسی، ایران.

مقدمه

جنس هیپودرما شامل هفت گونه مگس مولد میاز است که به عنوان میاز زیرجلدی در مناطق پشتی وکمری نشخوارکنندگان اهلی و وحشی درسراسر جهان دیده می‌شود (۱۸) و توزیع جغرافیایی وسیعی دارد (۱۵). *هیپودرما بویس* موجب ایجاد هیپودرموزیس درگاو می‌گردد و به عنوان میاز داخلی طبقه‌بندی می‌شود (۵).

هیپودرموزیس موجب بروز زیان‌های اقتصادی قابل توجه در صنعت چرم و تولیدات دامی (از طریق سقط جنین، کاهش تولید شیر، کاهش وزن و کاهش باروری و شناسایی مراحل سوم لاروی (L3) گونه‌های هیپودرما درحال حاضر با کلیدهای تشخیصی ارائه شده از سوی وزن‌گیری و کیفیت پایین چرم) در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه می‌شود (۹).

تشخیص دقیق گونه‌های هیپودرما در گاو برای ارزیابی دقیق حضور این دو گونه در ناحیه مشخص ضروری است؛ زیرا مشکلات موجود در استفاده از داروها زمانی که لاروهای مرحله اول هنوز در بدن میزبان مهاجرت می‌کنند، برای *هیپودرما بویس* به نسبت خطرناک‌تر از *هیپودرما لینه‌آتوم* است. با توجه به محل حضور لارو، مرحله اول و علایم ایجاد شده از سوی این دو گونه، درمان متعاقب آن متفاوت است (۹).

Zumpt و James (۶ و ۲۰) با توجه به اسپینولاسیون در قسمت شکمی بند دهم و ریخت‌شناسی صفحات اسپیراکل

* پست الکترونیکی نویسنده مسؤول: mtavassoli2000@yahoo.com

خلفی انجام می‌شود، همچنین در سال‌های اخیر سیتوکروم‌اکسیداز زیر واحد ۱ دی ان ای میتوکندریایی (mtDNA) به عنوان یک ژن هدف برای تمایز طبقاتی، شناسایی مولکولی و مطالعات تاکسونومیکی (۱۳) به دلیل اندازه بزرگ و ساختار بسیار حفاظت شده در موجودات هوازی مورد توجه قرار گرفته است (۱۲) و کاربرد آن به عنوان ژن ساعت جهانی مولکولی از سوی Gaunt و Miles در سال ۲۰۰۲ نشان داده شده است (۴).

امروزه نشانگرهای مولکولی مانند ژن‌های *28S rRNA* و ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ (*CO1*) برای بررسی روابط تکاملی حشرات مانند راسته Diptera (۷)، Orthoptera (۱۹) و لاروهای اعضای خانواده Oestridae (۸) با موفقیت استفاده شده است، با این‌حال به نظر می‌رسد که پژوهش‌های بیشتری برای روشن شدن مسأله وابستگی انگل‌ها ضروری است. هدف از این پژوهش، تشخیص مولکولی یکی ازشایع‌ترین گونه‌های هیپودرما (*هیپودرما بویس*) و توصیف ریخت‌شناسی لارو مرحله سوم همان گونه با استریومیکروسکوپ است. بررسی ژن *CO1* که به طور هم‌زمان همه لاروهای هیپودرما را تمایز می‌دهد نیز انجام شد و داده‌های مولکولی با مشاهدات ریخت‌شناسی حاصل از استریومیکروسکوپ مقایسه گردید؛ بنابراین پژوهش حاضر با هدف تشخیص لارو هیپودرما براساس ژن *CO1* در سه منطقه آب و هوایی ایران انجام شد تا تفاوت‌های این‌گونه را بر اساس ویژگی‌های مولکولی در این سه منطقه ارزیابی کند.

مواد و روش کار

این پژوهش از پاییز ۱۳۹۵ تا بهار ۱۳۹۶ روی لاروهای *هیپودرما بویس* و *هیپودرما لینه‌آتوم* جمع‌آوری شده از کشتارگاه‌های سه منطقه آب و هوایی ایران شامل مناطق زیر انجام گرفت: ۱. حاشیه اطراف دریای خزر (دمای هوای ۸ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد و میزان بارندگی سالیانه 1500 -400 mm)، ناحیه ۲. مناطق کوهستانی (دمای هوای ۵- تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد و میزان بارندگی سالیانه ۵۰۰- ۲۰۰ mm)، ناحیه ۳. حاشیه اطراف خلیج فارس (دمای هوای ۱۲/۶ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد و میزان بارندگی سالیانه ۳۰۰- ۲۰۰ mm) (۱۴).

نمونه‌های لارو مرحله سوم *هیپودرما بویس* جدا شده از گاودر اتانول ۷۰ درصد ثابت و با استریومیکروسکوپ و کلیدهای تشخیصی انگل‌شناسی بررسی شد (۶ و ۲۰). تعدادی از نمونه‌ها از هر منطقه آب و هوایی به شکل اتفاقی انتخاب و برای استخراج DNA استفاده شد.

DNA ژنومی با کیت تجاری (MBST، ایران) از اندام‌های داخلی بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده استخراج شد. ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد ۱ که جزء محافظت شده از میتوکندری است با استفاده از یک مجموعه خاص از پرایمرها (یعنی پرایمر رفت، 5'TACAGTTGGAATAGACGTTGATAC3' و پرایمر برگشت، 5'TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA3' تکثیر شد (۹ و ۱۸).

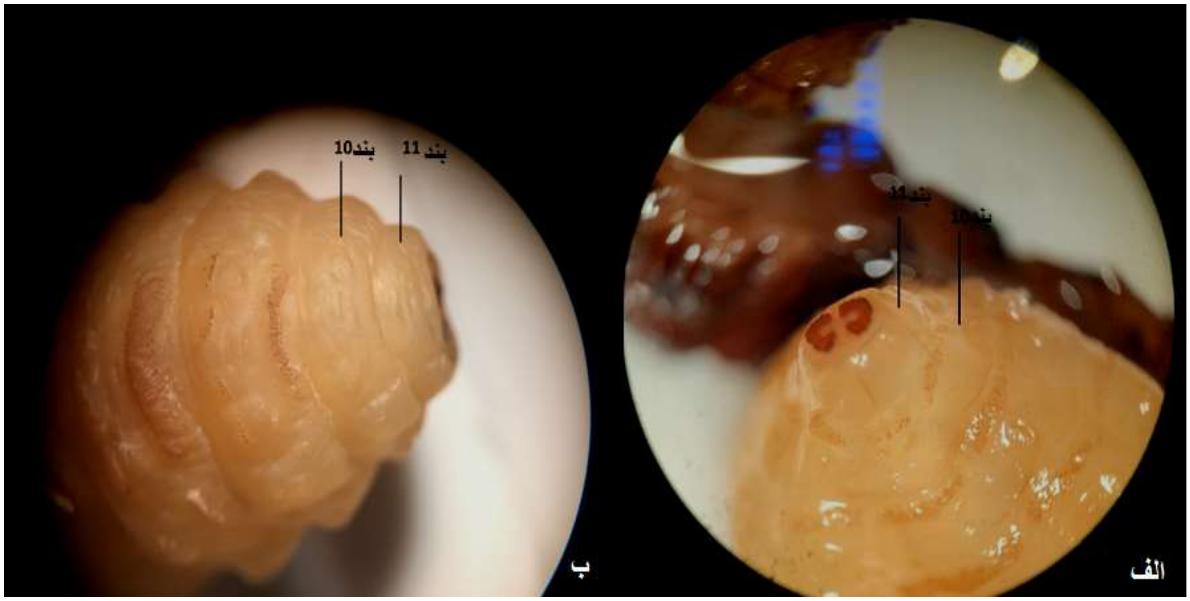
برنامه حرارتی شامل یک واسرشت اولیه DNA در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۳ دوره واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و یک مرحله توسعه نهایی به منظور تکمیل پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه اجرا گردید. محصولات PCR در ژل آگارز ۱٪ TBE ارزیابی شد؛ سپس محصولات DNA استخراج شده به منظور خالص‌سازی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد و پس از کسب نتیجه محصولات خالص‌سازی شده به همراه پرایمر رفت و برگشت، به منظور تعیین توالی به شرکت سیناکلون (SinaClon-Tehran, Iran) فرستاده شد و توالی‌یابی به صورت دو طرفه انجام گرفت. توالی‌های مربوط به منظور جست‌وجوی توالی‌های مرجع با بیشترین تشابه به داخل سایت NCBI وارد و موقعیت‌های ژن *CO1* با کمک روش بلاست (BLAST) تعیین گردید و از داده‌ها برای رسم درخت فیلوژنتیک در گونه *Oestrus ovis* با شماره دسترسی (MG755264) به عنوان گروه خارجی و با روش maximum parsimony استفاده شد.

نتایج

در طول این پژوهش بر اساس ویژگی‌های ریخت-شناسی با استریومیکروسکوپ تمایز بین دو گونه *هیپودرما*

بویس و *هیپودرما لینه‌آتوم* انجام گرفت. پریترم‌های خلفی لارو مرحله سوم *هیپودرما بویس* و *هیپودرما لینه‌آتوم* در شکل ۱ نشان داده شده است. ویژگی قابل اطمینان *هیپودرما بویس* در ساختار پریترم خلفی، یک کانال طویل و باریک است؛ همچنین در هر بند از لارو مرحله سوم، تعداد زیادی از خارهای تخت و کوچک وجود دارد که در تمام بندها به جز دو بند انتهایی بدن دیده می‌شود که در شکل ۲ نشان داده شده است.

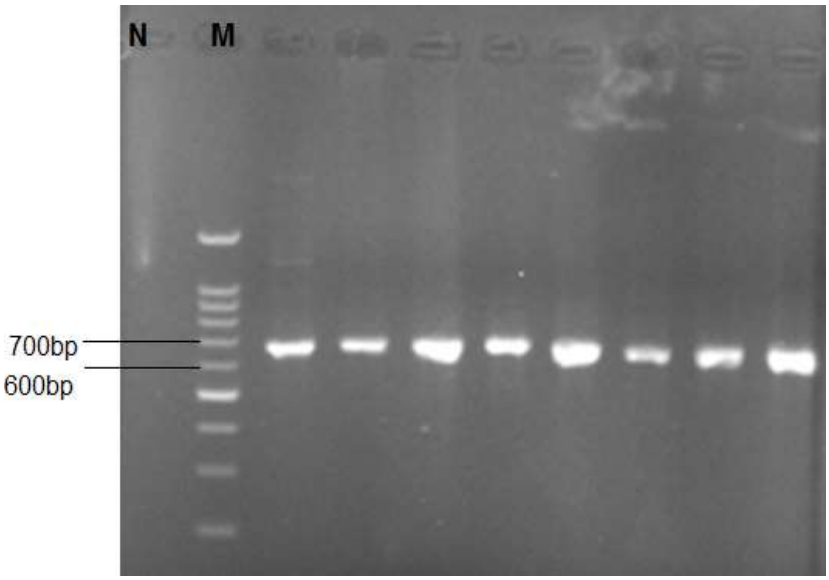
شکل۱- مقایسه پریترم‌های خلفی *هیپودرما لینه‌آتوم* (الف) با ساختاری تخت و *هیپودرما بویس* (ب) با ساختاری باریک و قیف مانند



شکل۲- مقایسه بندهای انتهایی *هیپودرما بویس* و *هیپودرما لینه‌آتوم*. در *هیپودرما لینه‌آتوم* (الف) تنها بند۱۱ فاقد خار است و *هیپودرما بویس بند ۱۰ و ۱۱* فاقد خار است.

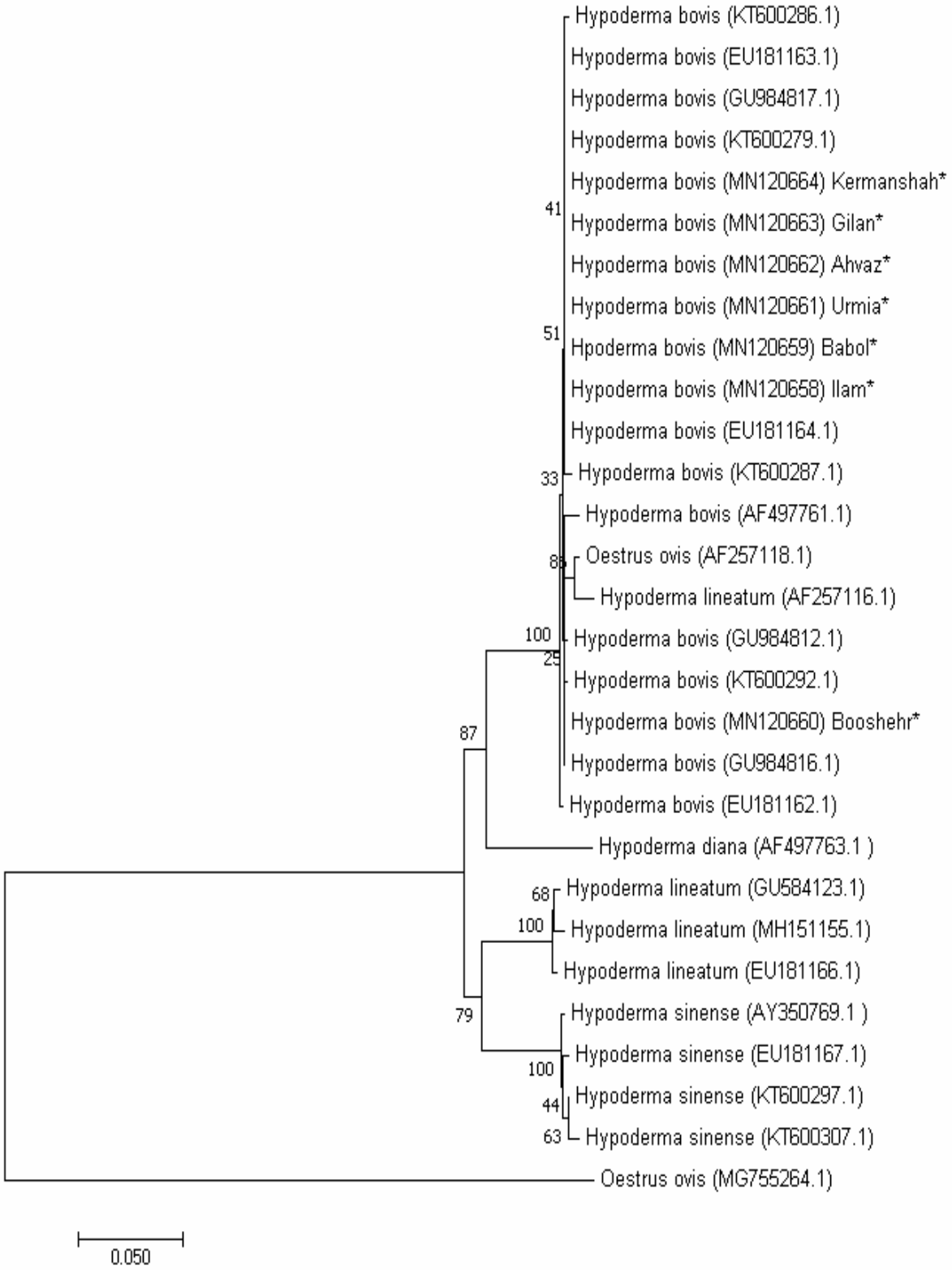
بر اساس این ویژگی‌های ریخت‌شناسی از مجموع ۴۱۶ عدد لارو مرحله سوم هیپودرمای جمع‌آوری شده، ۲۶۸ عدد (۶۴/۴ درصد) لاروهیپودرما *بویس* و ۱۴۸ عدد (۳۵/۶ درصد) لارو هیپودرما *لینه‌آتوم* بودند. در منطقه سرد و کوهستانی، لارو ۱۹۳ لارو هیپودرما به دست آمد که ۱۱۵ عدد (۵۹/۶ درصد) لارو هیپودرما *بویس* و ۷۸ عدد (۴۰/۴ درصد) لارو هیپودرما *لینه‌آتوم* تشخیص داده شد. در منطقه گرم و مرطوب جنوب از ۱۱۸ عدد لارو هیپودرما، ۸۲ عدد (۶۹/۵ درصد) لارو هیپودرما *بویس* و ۳۶ عدد (۳۰/۵ درصد) لارو هیپودرما *لینه‌آتوم* بودند. درآب و هوای معتدل و مرطوب، از ۱۰۵ عدد لارو، ۷۱ عدد (۶۷/۷ درصد) لارو هیپودرما *بویس* و ۳۴ عدد (۳۲/۴ درصد) لارو هیپودرما *لینه‌آتوم* تشخیص داده شد.

در پژوهش حاضر پس از استخراج DNA اندازه قطعه مورد نظر حدود ۷۰۰ جفت باز برای تمام نمونه‌ها تکثیر شد (شکل ۳). توالی‌های حاصل هم‌تراز و شماره‌های دسترسی MN120658 تا MN120664 به آن‌ها تعلق گرفت. مقایسه تک به تک (دوتایی) توالی‌های مربوط به شهرهای مختلف ایران با همدیگر، علی‌رغم تفاوت در تنها چند نوکلئوتید درصد تشابهی بین ۹۹/۸ تا ۱۰۰ درصد در بین نمونه‌ها را نشان داد، همچنین در بررسی توالی قطعه-های ژنی پژوهش حاضر با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن مربوط به گونه‌های هیپودرما میزان تشابه بالای ۸۸/۲ درصد مشاهده شد (جدول ۱).



شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز محصولات مربوط به تکثیر قطعه‌ی ژن *CO1* هیپودرما *بویس* جدا شده از مناطق مختلف ایران متعاقب انجام PCR. چاهک N: کنترل منفی، چاهک M: مارکر مولکولی DNA فرمنتاز ۱۰۰ جفت بازی

توالی‌های به دست آمده از پژوهش حاضر با توالی‌های مربوط به هیپودرما *بویس و* سایر گونه‌های هیپودرما از مناطق مختلف دنیا مقایسه گردید. بر اساس آن‌چه که درخت فیلوژنتیک نشان داد نمونه‌ها در ۳ خوشه (cluster) بزرگ طبقه‌بندی شدند که تنوع ژنتیکی در میان گونه‌های مختلف هیپودرما را تأیید می‌کرد (شکل ۴).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک به دست آمده از توالی‌های میتوکندریایی ژن *CO1* مرتبط به ۷ هیپودرما *بویس* جمع‌آوری شده از ایران به روش Neighbor_ Joining و یک گونه خارج گروهی *(استروس اویس* با شماره دسترسی MG755264).

جدول۱- درصد شباهت بین توالی‌های ژن *CO1* هیپودرما بویس، آنالیز با استفاده از مدل P distance انجام شده است.

1	Hypoderma_bovis_(MN120658)_Ilam*																											
2	Hpoderma_bovis_(MN120659)_Babol*	100																										
3	Hypoderma_bovis_(MN120660)_Booshehr*	99.8	99.8																									
4	Hypoderma_bovis_(MN120661)_Urmia*	100	100	99.8																								
5	Hypoderma_bovis_(MN120662)_Ahvaz*	100	100	99.8	100																							
6	Hypoderma_bovis_(MN120663)_Gilan*	100	100	99.8	100	100																						
7	Hypoderma_bovis_(MN120664)_Kermanshah*	100	100	99.8	100	100	100																					
8	Hypoderma_bovis_(KT600279.1)	100	100	99.8	100	1000	100	100																				
9	Hypoderma_bovis_(GU984817.1)	100	100	99.8	100	100	100	100	100																			
10	Hypoderma_bovis_(EU181164.1)	100	100	99.8	100	100	100	100	100	100																		
11	Hypoderma_bovis_(KT600286.1)	99.8	99.8	99.6	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8																	
12	Hypoderma_bovis_(GU984816.1)	99.8	99.8	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6																
13	Hypoderma_bovis_(EU181163.1)	100	100	99.8	100	100	100	100	100	100	100	99.8	99.8															
14	Hypoderma_bovis_(KT600287.1)	99.6	99.6	99.5	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.5	99.6														
15	Hypoderma_bovis_(GU984812.1)	99.6	99.6	99.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.8	99.6	99.3													
16	Hypoderma_bovis_(EU181162.1)	99.6	99.6	99.5	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.5	99.6	99.3	99.3												
17	Hypoderma_bovis_(KT600292.1)	99.6	99.6	99.8	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.5	99.8	99.6	99.3	99.6	99.3											
18	Hypoderma_bovis_(AF497761.1)	99.1	99.1	99.3	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	99.3	99.1	98.7	99.1	98.7	99.1										
19	Hypoderma_diana_(AF497763.1_)	91.1	91.1	90.9	91.1	91.1	91.1	91.1	91.1	91.1	91.1	91	91	91.1	0.09	91.1	91.2	90.9	90.5									
20	Hypoderma_lineatum_(EU181166.1)	90.7	90.7	90.5	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.7	90.5	90.5	90.7	90.5	90.4	90.9	90.5	90.4	89.6								
21	Oestrus_ovis_(AF257118.1)	99.1	99.1	99.3	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.9	99.3	99.1	98.7	91.1	98.7	99.1	98.6	90.2	90.2							
22	Hypoderma_lineatum_(GU584123.1)	90.5	90.5	90.4	90.5	90.5	90.5	90.5	90.5	90.5	90.5	90.4	90.4	90.5	90.4	90.2	90.7	90.4	90.2	89.5	99.5	90						
23	Hypoderma_sinense_(EU181167.1)	90	90	90.2	90	90	90	90	90	90	90	89.8	90.2	90	89.8	90	90.2	90.2	90	88.7	92.1	89.5	92					
24	Hypoderma_sinense_(KT600297.1)	90	90	90.2	90	90	90	90	90	90	90	89.8	90.2	90	89.8	90	90.2	90.2	90	88.7	92.1	89.5	92.3	99.3				
25	Hypoderma_sinense_(AY350769.1_)	90.2	90.2	90.4	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90	90.4	90.2	90	90.2	90.4	90.4	90.2	88.9	92.3	89.6	92.5	99.5	99.5			
26	Hypoderma_sinense_(KT600307.1)	89.5	89.5	89.6	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.5	89.3	89.4	89.5	89.3	89.5	89.6	89.6	89.5	88.6	91.6	88.9	91.8	99.1	99.5	99.3		
27	Hypoderma_lineatum_(MH151155.1)	90.4	90.4	90.2	90.4	90.4	90.4	90.4	90.4	90.4	90.4	90.2	90.2	90.4	90.2	90	90.5	90.2	90	89.3	99.1	89.8	99.3	91.6	92	92.1	91.4	
28	Hypoderma_lineatum_(AF257116.1)	98.4	98.4	98.6	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	88.2	88.6	98.4	98	98.4	98	98.4	97.9	90	89.5	98.9	89.3	89.3	89.3	89.5	88.7	89.1
29	Oestrus_ovis_(MG755264.1)	44.6	45	44.6	44.6	44.6	44.6	44.6	44.6	44.6	44.6	45	44.6	44.6	44.6	45	44.6	44.6	45	44.4	44.8	44.3	44.8	44.8	44.8	45.2	44.6	44.3	45

بحث

در این پژوهش رویکرد ریخت‌شناسی برای شناسایی لارو مرحله سوم *هیپودرما بویس*، به عنوان یک روش ساده، عملی و ارزان به منظور پژوهش پراکندگی این گونه‌ها در سه منطقه آب وهوایی ایران (سواحل دریای خزر، سرد و کوهستانی، گرم و مرطوب) استفاده شد. Bagherzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۶، توزیع گونه-های هیپودرما را بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی با استریومیکروسکوپ بررسی کردند که در پژوهش خود تنها از اسپیراکل‌های خلفی لارو مرحله سوم هیپودرما برای تشخیص گونه‌ها استفاده کرده بودند (۱)؛ با این حال در این پژوهش علاوه بر ریخت‌شناسی اسپیراکل خلفی ویژگی دیگر این لارو مانند حضور یا عدم حضور خار روی سطح شکمی بند ۱۰ لارو مرحله سوم برای توزیع این گونه‌ها استفاده شد.

Tavassoli و همکاران در سال ۲۰۱۰ در یک بررسی در شمال ایران، بیشتر گونه هیپودرما را *هیپودرما بویس* تشخیص دادند که با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد (۱۵). Dehghani و همکاران در سال ۲۰۱۲ درکاشان *هیپودرما لینه‌اتوم* را به عنوان گونه غالب در گاو گزارش کردند (۲) که نتایج آن‌ها با یافته‌های این پژوهش مطابقت ندارد. لازم به ذکر است که منطقه مورد پژوهش آن‌ها در این پژوهش بررسی نشده است. Bagherzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۶ در شمال غربی ایران، در منطقه کوهستانی اردبیل، *هیپودرما بویس* را به عنوان گونه غالب در گاو معرفی کردند (۱) که نتایج آن با یافته‌های این پژوهش هم‌خوانی دارد.

با توجه به اهمیت جنس هیپودرما در نشخوارکنندگان و اثرات مخرب آن در صنایع چرم و همچنین حضور هر دو گونه‌ی این انگل در نشخوارکنندگان ایران، نیاز به اقدامات کنترلی برای کاهش شیوع هیپودرما ضروری است.

روی‌کرد زیست‌شناسی مولکولی با استفاده از ژن DNA میتوکندریایی به عنوان یک نشانگر برای مطالعات ژنتیکی تاکسونومیک و جمعیتی در حشرات مورد توجه قرار گرفته است (۷و ۱۶). نواحی محافظت شده، نواحی بسیار متغیر، نرخ وسیع جهش‌ها و اندازه بزرگ ژن *CO1* آن را به عنوان یک هدف مناسب برای روی‌کردهای مولکولی قرار داده است (۷ و ۱۸). بر اساس اطلاعات موجود در بانک ژن هیچ گزارش مولکولی از مراحل لاروی *هیپودرما بویس* از ایران وجود نداشت و بنابراین این اولین کار مولکولی مربوط به این گونه در ایران است و تمامی اطلاعات موجود مربوط به هیپودرما بویس مربوط به پژوهش‌های انجام شده در کشورهای چین، ترکیه، ایتالیا و اسپانیاست (۳، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۷). در پژوهش حاضر درخت فیلوژنتیک تأیید کرد که گونه‌های موجود ارتباط نزدیکی با گزارش‌های قبلی *هیپودرما بویس* داشتند، به علاوه ما دریافتیم که گونه‌های موجود با تعدادی از گونه‌های دیگر هیپودرما مانند *هیپودرما دیانا* و *هیپودرما بویس*جدایه‌های خارج از ایران و *استروس اویس*رابطه خواهری دارند؛ در مقابل برخی دیگر از گونه‌های جنس هیپودرما در یک گروه جداگانه دسته‌بندی شده‌اند. با این حال گونه‌های حاضر همچنین رابطه ژنتیکی نسبتاً نزدیک و فاصله ژنتیکی نسبتاً بالا با گزارش‌هایی از گونه‌های هیپودرما داشتند(جدول۱). این یافته‌های متضاد را می‌توان این‌گونه توضیح داد که ناحیه CO1 در میان حشرات بسیار متغیر است (۱۸). تنوع درون گونه‌ای معنی‌دار درمیان تعدادی از ۱۸ گونه مولد میاز استریده گزارش شده‌است (۹) و این تنوع بین گونه‌ای به میزبان انگل، محل عفونت و ویژگی-های بیولوژیکی و جغرافیایی وابسته است؛ بنابراین پژوهش حاضر نشان داد که ژن *CO1* میتوکندریایی می‌تواند برای تشخیص‌های مولکولی هدف قرار بگیرد و راه حل‌های بیشتری به منظورحل مسائل تاکسونومیکی مگس‌های استریده داشته باشد، همچنین از نتایج مذکور می‌توان چنین استنباط کرد که گونه *هیپودرما بویس* موجود در مناطق مختلف آب و هوایی ایران قرابت ژنتیکی زیادی با همدیگر و سایر گونه‌های ثبت شده در کشورهای دیگر دارند.

اگر چه این نتایج یک رابطه نسبتاً نزدیک ژنتیکی در میان گونه‌های ایرانی موجود با دیگر گونه‌های گزارش شده را نشان می‌دهد، اما پیشنهاد می‌شود مطالعات اپیدمیولوژیکی بیشتری برای ارزیابی روابط فیلوژنتیک با دیگر عوامل مولد میاز در خانواده استریده انجام شود.

منابع

1- Bagherzadeh, NM; Behniafar, H; Rahbari, S. and Valizadeh, S; Prevalence of hypodermosis in cattle slaughtered in industrial slaughtered-house of Ardebil, Iran. J Parasit Dis.; 2016; DOI 10.1007
2- Dehghani, R; Sedaghat, MM; Esmaeli, N. and Ghasemi, A; Myiasis among slaughtered animals in Kashan, Iran: descriptive a veterinary entomological problem in the tropics. Iran J Vet Sci Techno.; 2012; l4(1): 19-28
3- Duygu, N; molecular characterization and chronobiology of Hypodermosis in cattle slaughtered in Diyarbakir Province in Turkey.Turkiye Parazitol Derg.; 2016; 40: 86-9
4- Gaunt, MW. and Miles, MA; An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks.Mol Biol Evol;2002; 19(5):748-61
5- Hall, MJR. and Wall, R; Myiasis of humans and domestic animals. AdvancParasitol.; 1995; 35:257–334
6- James, MT; The flies that cause myiasis in man. USDA Miscellaneous Publication.; 1947; 631: 106–112
7- Lunt, DH; Zhang, DX; Szymura, JM and Hewltt OM; The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. Insect Mol Biol.; 1996; 5:153–165
8- Otranto, D. and Puccini, V; Further evidence on the internal life cycle of *Przhevalskianasilenus* (Diptera, Oestridae). Vet Parasitol.; 2000; 88: 321-328
9- Otranto, D; Traversa, D; Tarsitano, E. and Stevens, J; Molecular differentiation of *Hypodermabovis* and *Hypodermalineatum* (Diptera, Oestridae) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Vet Parasitol.; 2003; 112: 197–201
10- Otranto, D; Traversa, D; Colwell, D.D; Guan, G; Giangasper, A; Boulard, C. and Yin, H A third spesies of Hypoderma (Diptera: Oestridae) affecting cattle and yaks in China: molecular and morphological evidence. J. Parasitol.; 2004; 90(5): 958–965
11- Otranto, D; Colwell, D. D; Traversa, D. and Stevens, J. R; Species identification of Hypoderma affecting domesticand wild ruminants by morphological and molecular characterization. Med Vet Entomol.; 2003; 17: 316–325
12- Saraste, M. Structural features of cytochrome oxidase. Q. Rev. Biophys.; 1990; 23: 331–366.
13- Simon, C; Frati, F; Beckenbach, A; Crespi, B; Liu, H. and Flook, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann Entomol Soc Am.; 1994; 87: 651–701.
14- Skerman, K. and Hillard, J; A handbook for studies of helminth parasites of ruminants.1967; Near East Animal Health Institutes, Iran Unit, United Nations Development Programme/Special fund.
15- Tavassoli, M; Imani, A; Yousefnia Pasha, M; Tukmechi, A. and Tajik, H; Bacteria Associated Subcutaneous Abscesses of Cattle Caused by *Hypoderma*spp Larvae in North of Iran. Vet Res Forum1.; 2010;(2): 123 - 127
16- Xiong, B. and Kochner, TD; Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). Genome.; 1991; 34:306–311
17- Yong, Fu; Wei, Li; Hong, Duo; Zhi-Hong, Guo; Ying, Li. and Yan-Ming Zhang; Genetic diversity and population genetics of the warble flies Hypodermabovis and H. sinense in

Qinghai Province, China. Parasite Vector.; 2016; 9:145-153

18-Zhang, DX. and Hewitt GM; Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. Insect Mol Biol; 1997; 6:143–150

19-Zhang, DX; Szymura, J. and Hewitt GM; Evolution and structural conservation of the control region of insect mitochondrial DNA. J Mol Evol.; 1995; 40:382–391

20-Zumpt, F. Myiasis in Man and Animals in the Old World. 1965; pp 141–229. Butterworths, London, U.K

Vol.14/No.1
Spring-Summer 2020

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2020; 14(1): 23-31.

Distribution, morpholy and Phylogenetic Study of *Hypoderma bovis* by PCR and *CO1* gene sequence analysisin in three climate regions in Iran

Gholizadeh, M.[1]; Tavassoli, M.[2*]; Mahmoudian, A.R.[3]

1. PhD Student of parasitology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.
2. Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.
3. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia- Iran.

Received: 10 July 2019 ***Accepted:*** 10 November 2019

Summary

Hypoderma bovis (Diptera: Oestridae) is an important parasite in cattle that is pathogenic and cause serious economic losses and reduce livestock products, including milk, meat and hide quality.In this study, samples from slaughtered cattle were collected from three climate of Iran. Extraction of DNA and PCR test was performed on the samples, then the purified PCR product was sequenced. Sequence response was reviewed and corrected. Finally, the distribution of this species was investigated according to morphological characteristics in three climate zones of Iran. The *CO1* gene of third stage larvae of *H. bovis* was investigated in the collected larvae. Data showed interspecies correlation. Based on morphological observations, from total of 416 third stage larvae obtained from slaughtered cattle in three regions, 268 (64.4%) were *H. bovis*. Based on phylogenetic analysis of the present isolates, these isolates are located in a cluster with a number of Hypoderma species of studied in other countries, while some other species are isolated in the other cluster. The COl region seems to be very variable among the miyasis caused flies. The findings also suggest that *CO1* gene can be used as an appropriate molecular marker for identification and diagnosis of Hypoderma species.

Keywords: *Hypoderm abovis*, distribution, phylogenetic, *CO1* gene, morphology, Iran.

* Corresponding Author E-mail: mtavassoli2000@yahoo.com