مروری بر کارایی خط شناسه‌گذاری DNA در طبقه بندی حشرات

هدا زمانی[۱] و حامد غباری[۲*]

[۱] کرمانشاه، دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده کشاورزی، گروه حشره شناسی

[۲] سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

* نویسنده مسئول: h.ghobari@uok.ac.ir

چکیده

محدودیت‌های طبقه‌بندی معمول و سنتی باعث شده که هنوز تعداد زیادی از بندپایان و مخصوصا حشرات شناسایی نشوند اما از زمان لینه تا کنون (۲۵۰ سال پیش) بررسی تنوع زیستی، توصیف، نامگذاری و طبقه‌بندی جاندارانی همچون حشرات با تاکید بر صفات و ویژگی‌های ریخت‌شناختی و رفتاری موجودات زنده انجام گرفته است. در سال‌های اخیر خط شناسه‌گذاری DNA (DNA barcoding)، که بر اساس تنوع توالی کوتاهی از DNA است روش جدید جایگزینی را برای شناسایی گونه‌ها ارائه کرده است. این روش نوآورانه، سریع، دقیق، قابل اعتماد و قابل استفاده برای طیف وسیعی از جانوران پرسلولی از جمله حشرات است. روش خط شناسه گذاری شاخه مهمی از علوم تنوع زیستی است که خلاء موجود بین روش‌های مولکولی و سنتی را جهت شناسایی گونه‌ها پر کرده است. این روش چارچوب مناسبی را برای شناسایی گونه‌های بسیار ناشناخته و گونه‌های مهم و گونه‌های پنهان فراهم کرده است. به علاوه زمینه شناسایی گونه‌های مختلف حشرات را بر اساس مراحل نابالغ (شامل تخم، لارو، پوره) را که به روش‌های سنتی قابل شناسایی نیستند فراهم کرده است. با تمام این نکات مثبت که در استفاده از روش بارکدینگ وجود دارد اما باز این روش دچار برخی محدودیت‌هاست. مسائلی مانند گونه‌زائی، هیبریداسیون و آلوده بودن بیش از حد حشرات به گونه‌های همزیست همچون باکتری *Wolbachia* که نتایج این روش را با مشکل روبه‌رو می‌کند باعث ایجاد محدودیت این روش می شود. از همه مهم‌تر میزان اعتماد به روش مذکور با توجه به اینکه بیش از ۱ میلیون حشره شناسایی شده و هنوز میلیون‌ها گونه دیگر از آنها شناسایی نشده است زیر سوال رفته است. این حجم بالا از تنوع گونه حشرات باعث شده که حجم داده‌های به دست آمده از روش بارکدینگ نتواند پاسخگوی تنوع زیستی بسیار بالای حشرات باشد. با توجه به مطالب بیان شده به نظر می‌رسد که جهت شناسایی گونه‌ها باید از تلفیقی از روش‌های مولکولی مانند بارکدینگ و روش‌های معمول سنتی جهت شناسایی جانوران زنده مخصوصا حشرات استفاده شود.

واژه های کلیدی: سیستماتیک سنتی و مولکولی، خط شناسه‌گذاری DNA، حشرات

مقدمه

اصطلاح تنوع زیستی برای اولین بار توسط والتر روزن[۱] مطرح شد (Wilson, 1988). در واقع تنوع زیستی به صورت تنوع در سطح ژن، گونه و سطوح اکوسیستمی زیست کُره تعریف می‌شود (Sheth and Thaker, 2017). تنوع زیستی قلمروهای متنوعی از علوم طبیعی شامل طبقه‌بندی، زیست‌شناسی مولکولی، جغرافیای طبیعی، اکولوژی، تکامل، ژنتیک را در بر می‌گیرد (Khuroo *et al*., 2007). در این میان علم تاکسونومی که روی کشف، توصیف و طبقه‌بندی موجودات زنده تمرکز دارد شاخه‌ای اساسی از علوم طبیعی است که برای آشکار سازی تنوع زیستی جانداران به کار می‌رود. در میان جاندارن، حشرات با بیشتر از یک میلیون گونه توصیف شده و بیش از ۸۰٪ گونه‌های ناشناخته متنوع‌ترین گروه جانداران روی کره زمین به شمار می‌روند (Stork, 2018). با این حجم از تنوع زیستی مشخصاً تعیین حدود گونه‌ها در حشرات از طریق مشخصات ریخت‌شناختی بسیار پیچیده بوده، معمولا دانش تخصصی بسیار بالایی نیاز دارد. از طرفی هنوز شناسایی، توصیف و نامگذاری گونه‌های جدید بسیاری باقی مانده و تعداد گونه‌های توصیف نشده به مراتب بیشتر از تعداد موارد شناخته شده است (Grissell, 1999). بنابراین اتخاذ رویکردهای نوین برای از میان برداشتن این اشکالات تاکسونومیکی مورد نیاز است (Giangrande 2003). یکی از رویکردهای موجود برای غلبه بر مشکلات مرتبط با روش‌های سنتی بهره بردن از تغییرات ژنتیکی پدید آمده

[1] Walter Rosen

بین گروه‌های مختلف در نتیجه فرآیندهایی همچون رانش ژنتیکی یا انتخاب طبیعی است (Floyd *et al*., 2009). به هر حال، آنالیز اسیدهای نوکلئیک قابل اعتمادترین چارچوب را برای تعیین گونه‌ها فراهم می‌کنند، زیرا ویژگی‌های DNA به طور مستقیم تحت تأثیر عوامل محیطی قرار نمی‌گیرند (Cannon *et al*., 2000). در سالهای اخیر با ظهور رویکرد خط شناسه‌گذاری DNA بسیاری از مشکلات مرتبط با تاکسونومی مرتفع شده است. در واقع خط شناسه‌گذاری DNA از طریق بهره گیری از تنوع نوکلئوتیدی یک قطعه کوچک و استاندارد از ژنوم، تفکیک و تمایز گونه‌ها را ممکن می‌سازد (Bergmann *et al*., 2009). در اغلب جانداران همچون حشرات بخشی از انتهای ´۵ زیر واحد یک ژن میتوکندریایی سیتوکروم سی اکسیداز[1] (COI) به عنوان یک خط شناسه‌گذار استاندارد برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود (Kress *et al*., 2005). در مورد حشرات، این ناحیه ژنی به عنوان یک روش جایگزین سریع برای شناسایی گونه‌ها پیشنهاد شده است (Hebert *et al*., 2003b). در سال‌های اخیر جنبشی بین المللی با نام جنبش خط شناسه‌ی زندگی[2] به منظور بهره‌گیری از توالی DNA در بخش‌هایی از ژنوم به عنوان یک نشانگر مولکولی برای شناخت گونه‌های زنده‌ی کره‌ی زمین در کنار ابزارهای تاکسونومی شکل گرفته است (Ballard and Whitlock, 2004; Moore, 1995)، علاوه بر این، با توجه به پیشرفت سریع علوم زیستی، کمبود امکانات مرتبط با روش‌های تاکسونومیک سنتی همچون کمبود متخصصین، تعداد زیاد گونه‌های توصیف نشده، وقت گیر بودن و پایین بودن راندمان روش‌های سنتی، نیاز به داده‌ها و ابزارهای مولکولی همچون خط شناسه‌گذاری DNA لازم و ضروری به نظر می‌رسد. در این مقاله مروری نیز سعی بر آن شده است که کارایی خط شناسه‌گذاری DNA در طبقه‌بندی نوین مورد بحث و واکاوی قرار بگیرد.

رمزگذاری[3] DNA : رمزگذاری DNA، کاربرد قطعات ژنومی استاندارد کوتاه به عنوان مارکرهای زیستی برای تعیین گونه‌هاست. درست همانطور که گونه‌ها از نظر مورفولوژی، محیط زیست و رفتار متفاوت هستند، در توالی‌های DNAشان هم با هم فرق می‌کنند، از اینرو، یک ژن خاص یا یک قطعه ژن ویژه حداقل از نظر تئوری می‌تواند برای شناسائی یک گونه به کار برده شود. امروزه برای خط شناسه‌گذاری DNA اکثر جانداران ناحیه COI به عنوان یک ناحیه معین و استاندارد برای شناسایی و تفکیک گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Hebert *et al*., 2003a; Hebert *et al*., 2004b). ناحیه‌ای از این ژن که برای تعیین خط شناسه در نظر گرفته می‌شود، به اندازه‌ای کوتاه است که توالی جفت بازهای اسیدهای نوکلئیک آن را می‌توان با یک بار خواندن با دستگاه خط شناسه خوان رمزگشایی کرد. این منطقه بسیار کوچک در گونه‌های مختلف به اندازه‌ای متنوع است که می‌توان گونه را بر اساس آن تشخیص داد. طول خط شناسه COI فقط ۶۴۸ جفت باز است. پژوهشگران برای آن که این برچسب کوچک DNA را بیازمایند، و به قابلیت آن برای تفکیک گونه‌ها مطمئن شوند خط شناسه‌های COI متعلق به گروه‌های مختلف را آزمودند و به این نتیجه رسیدند که خط شناسه COI به تنهایی ظرفیت دارد تا در حدود ۹۸ درصد از گونه‌های جانوری را در شکل های مختلف جداسازی و شناسایی کند (Meusnier *et al*., 2008) انتخاب ناحیه ژنومی ویژه‌ای که به عنوان یک رمزینه برای شناسایی گونه‌ها به کار برود بسیار پراهمیت است. این ناحیه باید بین ارگانیسم‌های مورد مقایسه هومولوگ بوده و باید به میزانی از تکامل برخوردار باشد که بین گونه‌های خیلی نزدیک تنوع مناسب و بارزی را نشان دهد. همچنین نواحی مورد نظر به اندازه کافی دارای توالی‌های حفاظت‌شده باشد تا به یک مجموعه پرایمر PCR اجازه دهد که ناحیه ژن هدف را تکثیر کنند، علاوه بر این اطلاعات حاصله از توالی مذکور باید هم‌ردیفی قوی را ایجاد کنند تا توالی‌ها بتوانند مورد مقایسه قرار بگیرند. در سلسله جانوران، توجه به ناحیه‌ای با ۶۵۰ جفت باز معطوف شده که نزدیک انتهای ´۵ توالی ژن زیرواحد I سیتوکروم c اکسیداز (COI) میتوکندریایی است (Hebert *et al*., 2003a). قابل ذکر است که هدف راهبردی خط شناسه‌گذاری DNA، استفاده از روشی یکسان و فراگیر برای شناسایی گونه‌هاست و دست یافتن به دستور کارهای استخراج DNA و آغازگرهای یکسان برای تکثیر توالی مورد نظر در گستره بزرگی از گروه‌های جانوری، یکی از محورهای تحقیقات و مطالعات علمی است. داده‌های توالی خط شناسه معمولاً به وسیله یکی از

[1] Cytochrome oxidase subunit I
[2] Barcode of life
[3] Encoded dna

روش‌های خوشه‌بندی مانند همسایه‌بندی بر پایه فاصله[1] قابل تحلیل و تفسیراست. روش‌های پیچیده‌تری شامل انواع الگوریتم‌های آماری و هوش مصنوعی در دست آزمودن هستند و کم‌کم جای خود را باز خواهند کرد. سومین قدم پس از تعیین خط شناسه، ایجاد کتابخانه‌ای از این قطعه‌ها به عنوان مرجع است که هویت گونه‌های موجود در آن قبلا تایید شده باشند. روش ایجاد کتابخانه بسیار ساده است چنانکه بعد از استخراج DNA از هر نمونه و تکثیر ناحیه خط شناسه، اطلاعات به دست آمده در پایگاه داده‌ها با عنوان "سیستم خط شناسه داده‌های حیاتی"[2] ثبت می‌شود (Ratnasingham and Hebert, 2007). هر یک از مدخل‌های این کتابخانه شامل نام گونه، توالی خط شناسه، محل جمع‌آوری نمونه، پیوند به نمونه مستند، عکس و دیگر داده‌های زیستی است. کنسرسیوم خط شناسه زندگی در سال ۲۰۰۵ تاسیس شده تا با هماهنگ سازی و انسجام مطالعات مختلف در این زمینه به گسترش این بانک اطلاعات کمک کند (Ratnasingham and Hebert, 2007). در عمل، نباید انتظار داشت که استفاده از روش رمزینه-گذاری DNA به سادگی قادر به شناسایی گونه‌ها باشد، توالی‌های DNA در معرض انواع پیچیدگی‌های تکامل مولکولی قرار داشته و می‌توانند تنوع چشمگیری در داخل گونه‌ها نشان دهند (Mallet and Willmott, 2003). با این حال اگر رمزینه‌گذاری DNA موفقیت آمیز باشد با اطمینان این ظرفیت را دارد که از طریق توالی‌یابی صحیح ناحیه بارکد شده در شناسائی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفته و از پیچیدگی‌های موجود در شناسائی‌های مورفولوژیکی اجتناب شود و طرفداران آن را نهایتا هر چه بیشتر تشویق به استقرار سیستمی کاربردی بر پایه روش مذکور برای شناسایی موجودات زنده از جمله حشرات کند (Tautz *et al*., 2003, Blaxter, 2004, Savolainen *et al*., 2005). در حالی که در سال ۲۰۰۵ در اولین گردهمایی مربوط به خط شناسه، ۳۲۰۰۰ توالی برای ۱۲۷۰۰ گونه ثبت شده بود، در سال ۲۰۱۰، حدودا ۹۴۰۰۰۰ توالی برای ۷۷۰۰۰ گونه تعریف شد. در سال ۲۰۱۶، ۵۰۸۶۵۷۷ توالی برای نمونه‌های بندپایان ثبت شد که در این میان سهم حشرات ۴۵۷۲۷۷۷ مورد بوده است (جدول ۱). ژن COI در حشرات به دلیل نداشتن اینترون، همترازی یا همردیفی ساده‌ای ایجاد می‌کند، در معرض نوترکیبی محدودی قرار دارد و با دارا بودن جایگاه‌های قوی برای آغازگرها یک نشانگر ایده‌آل برای شناسائی گونه‌ها است. مرزبندی‌هایی که توسط این نشانگر مولکولی مشخص می‌شوند، شدیداً همسوی نتایج مطالعات ریخت‌شناسی و خصوصیات رفتاری گونه‌هاست که بر اساس آن به روش سنتی گونه‌های مزبور شناسایی شده‌اند (Hebert *et al*., 2003a, 2003b). مزایای مهم رویکرد مبتنی بر این توالی‌یابی مولکولی در تعیین گونه‌ها این است که می‌توان گونه‌ها را بر اساس DNAهای میتوکندریایی ذخیره شده در پایگاه داده NCBI تطبیق و شناسایی کرد. علاوه بر این، DNAهای استخراج شده حاصل از هر مرحله زندگی یک ارگانیسم مثل مرحلهٔ تخم، لارو، یا بلوغ حشره یا از قسمت‌های مرده، نتیجه یکسانی را در شناسائی گونه‌ها در بردارد. در حالیکه، شناسائی‌های مرسوم حشرات (حداقل برای حشرات با دگردیسی کامل) اغلب بر اساس ویژگی-های حشره بالغ است (Smith *et al*., 2005).

مزایای استفاده از خط شناسه‌گذاری: مشکلات مربوط به تحلیل و آنالیز مربوط به خط شناسه‌گذاری طی سال‌های پس از معرفی آن (۲۰۰۳ به بعد) از بین رفته است (Hebert *et al*., 2003a). همچنین استفاده از روش مذکور هزینه‌های مرتبط با آن کاهش یافته و کارایی آن در نواحی مختلف جغرافیایی و رده‌بندی موجودات زنده به اثبات رسیده است.

[1] Neighbor-joining method
[2] Barcode of Life Data

جدول۱- پیشرفت ثبت خط شناسه‌گذاری برای تاکسون‌های گوناگون حشرات اقتباس از سایت 2016 (www.boldsystems.org)

Species with Barcodes	Species	Specimens with Barcodes	Specimens with Sequences	Specimen Records	راسته‌ها Orders	رده Class	نام گروه موجودات زنده The name of living entity group	گروه Group
44	44	1924	2059	2616	Archaeognatha	Insecta	Arthropoda	Animal
160	269	5505	5997	7548	Blattodea			
18882	27642	279026	317164	430730	Coleoptera			
27	99	1281	1396	2229	Dermaptera			
24069	28746	1877257	1941421	2130383	Diptera			
63	63	267	275	317	Embioptera			
1247	1454	19654	21705	26671	Ephemeroptera			
7383	10619	199085	221154	299380	Hemiptera			
26286	36264	590550	694566	928482	Hymenoptera			
675	921	4464	4907	6790	Isoptera			
83607	102135	1109142	1167739	1493705	Lepidoptera			
273	337	1839	1930	2443	Mantodea			
148	230	1302	1478	2198	Mecoptera			
79	88	1747	1807	2045	Megaloptera			
338	445	8026	8710	10770	Neuroptera			
3	4	4	5	6	Notoptera			
2491	3069	17862	20606	25869	Odonata			
1824	2200	22296	24639	31597	Orthoptera			
86	157	545	906	1065	Phasmatodea			
809	901	11835	12358	14263	Plecoptera			
234	322	31618	33180	37546	Psocodea			
20	28	159	196	240	Rhaphidioptera			
61	146	895	958	1500	Siphonaptera			
34	80	255	292	529	Strepsiptera			
328	382	18252	19373	22477	Thysanoptera			
4595	5804	49446	55616	67473	Trichoptera			
1	1	4	4	4	Zoraptera			
11	17	68	116	153	Zygentoma			

در این رویکرد امکان انجام بهتر مطالعات در صورت استفاده از دستورالعمل‌های استاندارد، همکاری محققین مختلف به منظور شناسایی نمونه‌ها، تهیه و تحلیل توالی‌ها و نگهداری نمونه‌های بارکد شده فراهم می‌شود (Hebert *et al.*, 2003b). یک خط شناسه استاندارد قابل استفاده در شناسایی گونه‌ها همچنین می‌تواند مشکلات بالقوه طبقه بندی ناشی از وجود اسامی مترادف و گونه‌های مخفی یا هم‌زاد را در گروه های مورد مطالعه به طور چشمگیری کاهش دهد (Witt *et al*., 2006; Yassin *et al*., 2008). به‌طور مثال استفاده از روش خط شناسه‌گذاری در مورد بسیاری از گونه‌های جانوری به خصوص عقرب‌ها بسیار موثر است. زیرا بسیاری از تصمیم گیری‌ها در مورد طبقه‌بندی این بندپایان به واسطه این حقیقت که احتمالا بسیاری از اسامی گونه‌ها در برگیرنده تعداد زیادی گونه مخفی است، صورت می‌گیرد.

با توجه به این که انتظار می‌رود این روش در مقیاس وسیع برای تمام گروه‌های موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا جانوران عالی کاربرد داشته باشد. در نتیجه استفاده از ژن‌های مناسبی که امکان تکثیر و توالی‌یابی آن‌ها به سادگی ممکن باشد و دقت کافی در شناسایی طیف گسترده‌ای از موجودات زنده را داشته باشد از اهمیت بسزایی برخوردار است (Hebert *et al.*, 2003a). در ادامه این مقاله به بررسی کاربرد خط شناسه گذاری DNA در شناسایی گونه‌های برخی راسته‌های مهم حشرات پرداخته می‌شود.

کاربردهای رمزگذاری در راسته‌های مختلف حشرات

راسته بال‌پولکداران Lepidoptera : راسته بال‌پولکداران گروه متنوع و جذابی از حشرات هستند که مورد توجه ویژه تاکسونومیکی و سیستماتیکی قرار گرفته اند. تقریباً ۱۶۵۰۰۰ گونه از راسته Lepidoptera که نشاندهنده حدود ۱۰ درصد از ۱/۵ میلیون گونه جانوری شناخته شده است،

توصیف شدند (Wilson, 2003). بقیه ۱۵۰۰۰۰ تا ۱۲۵۰۰۰۰ گونه از Lepidoptera در انتظار توصیف و شناسائی هستند. کمبود تاکسونومیست‌ها، وجود مشکلات جهت شناسایی گونه‌های راسته مذکور به علت همگرایی فراوان گونه‌ها اغلب گونه‌ها توصیف نشده‌اند و تعدادی از آنها را می‌توان فقط تخمین زد. راسته Lepidoptera از زمانیکه Hebert و همکاران (۲۰۰۳) از موش‌های آمریکای شمالی برای اثبات توانایی COI در تشخیص میان نمونه-هایی از گونه‌های مختلف استفاده کردند، مدلی برای مطالعات فعلی خط شناسه گذاری DNA بوده‌اند. مطالعات نشان می‌دهد که حشرات متعلق به راسته مذکور پتانسیل این را دارند که برای تشخیص‌شان از روش های مولکولی و بارکدینگ DNA استفاده شود. رمزینه‌ها یافتن ارتباط بین مراحل گوناگون زندگی بال‌پولکداران، و همچنین گونه-هایی را که از لحاظ جنسی نر و ماده دوشکلی هستند (که در این راسته بسیار فراوان است) مقدور می‌سازد (Janzen *et al*., 2005). شب‌پره‌های بزرگ و پروانه‌ها برای نشان دادن کیفیت زیست‌محیطی (مانند تخریب زیستگاه)، تقسیم‌بندی تنوع زیستگاه‌ها، همچنین شاخص تغییر اقلیم به کار برده شدند (Scoble, 1992). اما به علت ناکافی بودن اطلاعات تاکسونومی در مورد آنها، نقششان به عنوان گروهی مهم در ارزیابی‌های زیست محیطی محدود و کمرنگ است. در چنین مواردی خط شناسه گذاری DNA می‌تواند افق جدیدی را از کارایی و قابلیت مقایسه با ارزیابی‌های اکولوژیکی ارائه دهد. با ثبت بارکدهای DNA به جای کاربرد صفات ریخت شناختی می توان بین ویژگی‌های گونه‌های مختلف بال پولک داران و خصوصیات مکانی و زمانی که حشره در آن قرار گرفته ارتباط بهتری ایجاد کرد و حتی گونه‌های پنهان موجود در جمعیت های آنها را شناسایی و معرفی کرد. به طور مثال در مورد گونه *Astraptes fulgerator* از روش خط شناسه گذاری DNA برای شناسایی گونه مورد نظر و گونه‌های پنهان در داخل جمعیت حشره مورد نظر استفاده شده است، به طوریکه رمزینه‌گذاری ۴۸۴ نمونه از منطقه ای در کشور کاستریکا نشان داد که گروه *Astraptes fulgerator* مجموعه‌ای از گونه‌های خواهری بوده و حتی مطالعات ریخت شناسی حشره بالغ و ریخت شناسی لاروهای به دست آمده نیز نتایج حاصل از روش مولکولی مورد نظر را تأیید می‌کند. Hebert و همکاران (۲۰۰۴) بر اساس شباهت‌های بین توالی‌های ژن COI و رابطهٔ بین صفات ریخت شناسی حشره مورد نظر و گیاه میزبان مورد تغذیه‌اش وجود ده گونه را در داخل گونه مورد نظر پیشنهاد کرد، همچنین Brower (۲۰۰۶) اطلاعات به دست آمده از DNA حشره مذکور را به گونه‌ای متفاوت آنالیز و مورد مطالعه قرار داد و نتیجه گرفت که نمونه *Astraptes fulgerator* چندین گونه را در برمی‌گیرد حتی برخی از پژوهشگران دیگر، با آنالیز مجدد همان داده‌های ژنتیکی، وجود ۱۰ گونه جدید را تأیید کردند (Nielsen and Matz, 2006). هر چند استفاده از روش خط شناسه گذاری DNA در تعیین گونه‌ها پژوهش‌ها و تحقیقات بیشتری را می‌طلبد، ولی مثال فوق توانمندی و کارایی خود را زمانی که به صورت یک پایگاه داده ای یکپارچه مورد استفاده قرار می گیرد، ثابت می‌کند. در مثال دیگری Hajibabaei و همکاران (۲۰۰۶) بیش از ۴۰۰۰ حشره را از ۵۲۱ گونه و متعلق به سه خانواده مهم بال‌پولکداران (شامل Hesperiidae، Saturniidae و پولک داران را مورد توالی-یابی قرار داده و دریافتند که ۹۷/۹ درصد نمونه‌ها می‌توانند بر اساس الگوهای واگرایی COI تشخیص داده شوند. راسته Lepidoptera در آینده‌ای نه‌چندان دور، به اولین راسته حشرات با بارکد کامل تبدیل خواهد شد. تحقق این هدف نه تنها پیشرفت‌های زیادی در زمینه تجزیه و تحلیل داده‌های خط شناسه گذاری DNA خواهد کرد، بلکه چارچوب کامل جدیدی را برای تعیین گونه‌های حشرات و تحقیق در تکامل مولکولی فراهم می‌کند.

راسته دوبالان Diptera : راسته دوبالان راسته‌ای فوق-العاده متنوع دیگری از حشرات را، با تقریباً ۱۵۰۰۰۰ گونه توصیف‌شده، تشکیل می‌دهند (Grimaldi and Engel, 2005; Beutel and Pohl, 2006). در بین حشرات، اعضای راسته Diptera با دارا بودن گروه‌هایی مهمی مانند پشه‌ها و مگس تسه تسه که به عنوان عوامل انتقال بیماری‌های متعدد چون مالاریا، بیماری خواب و فیلاریاز عمل می‌کنند، بیشترین تـأثیر منفی روی سلامت انسان و دام‌ها داشته‌اند. حتی پیش از ایجاد تکنولوژی رمزگذاری DNA بخودی خود ابزارهای مولکولی تشخیصی مانند روش الکتروفورز آلوزیم (Green *et al*., 1992)، هیبریداسیون DNA (Beebe *et al*., 1996)، و چندشـکلی طـولی قطعـات محـدود

(RFLP)[1] (Fanello *et al*. 2002). برای شناسائی گونه‌های پشه به کار برده شده است.

امروزه شیوه‌های مبتنی بر توالی‌یابی هم کاربرد گسترده‌ای در شناسایی گونه‌های راسته مورد نظر داشته‌اند گرچه توجه عمده این روش‌ها بیش از COI روی ژن‌های هسته‌ای و ریبوزومی است (Kent *et al*., 2004; Marrelli *et al*., 2005; Michel *et al*., 2005). هرچند تعدادی از مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نشانگر بارکد COI استاندارد هم می‌تواند به شکل موثری در ارزیابی گروه پشه‌ها برای تشخیص در سطح گونه در کشور کانادا (Cywinska *et al*., 2006) و هند (Kumar *et al*., 2007) به کار رود. در مطالعاتی دیگر همچون مطالعه Foley و همکاران (۲۰۰۷) مطالعاتی در زمینه فیلوژنی مولکولی گونه *Anopheles annulipes* در استرالیا براساس چهار مکان ژنی متفاوت هسته‌ای و میتوکندریائی (COI, COII, ITS2, EF-1α) انجام گرفته است. نتایج نشان می‌دهد که علیرغم استفاده از یک قطعه COI کوتاهتر (۲۵۸ جفت باز) در مقایسه با ناحیه بارکد استاندارد (۶۵۸ جفت‌باز) ۱۱ گونه از ۱۷ گونه خواهری توالی‌های COI منحصر به فردی دارند و بر همین اساس محققین مزبور به این نتیجه رسیدند که ممکن است رمزینه‌گذاری DNA روش نویدبخشی برای تشخیص گونه‌ها در داخل جنس *Annulipes* باشد. یکی از کاربردهای روش های مولکولی مبتنی بر DNA در شناسائی گونه‌هایی از راسته دوبالان است که در پزشکی قانونی اهمیت دارند. انواع گونه‌های متعلق به خانواده Calliphoridae و مگس‌های گوشت Sarcophagidae مدت کوتاهی پس از مرگ داخل اجساد در حال فساد تخم گذاری می‌کنند و چون هر گونه چارچوب زمانی معینی برای نمو از مرحلهٔ تخم تا حشره کامل دارد لذا وجود هر گونه‌ای در مراحل رشدی متفاوت بر روی جسدهای در حال فساد می تواند سرنخی از PMI[2] یا زمان سپری شده بعد از مرگ موجود در حال تجزیه را ارائه دهد (Smith, 1986; Catts and Haskell, 1990). ولی به دلیل اینکه گونه‌های متفاوت مگس‌ها از سرعت‌های متفاوت رشد و نمو برخوردارند برای برآورد صحیح PMI لازم است گونه های مورد نظر به دقت شناسایی شوند. با توجه به اینکه حشرات کامل یا مگس‌های مورد نظر جهت شناسایی قطعی لازم و ضروری هستند، لذا باید لاروهای این مگس‌ها از قبل از روی اجساد جمع‌آوری و تا زمان تبدیل به حشره کامل پرورش داده شوند، که این فرایند نیاز به صرف زمان زیاد و تاخیر در شناسایی گونه‌ها می‌شود (Nelson *et al*., 2007). به همین دلیل حشره‌شناسان متخصص در زمینه علم جرم-شناسی و پزشکی قانونی جهت حل این معضل به بررسی میزان کارایی روش‌های مبتنی بر DNA جهت تشخیص گونه‌ها در هر مرحلهٔ از مراحل رشد و نمو حشرات مزبور پرداخته‌اند, (Sperling *et al*., 1994, Malgorn and Coquoz, 1999; Vincent *et al*., 2000). در نتیجه تحقیقات بسیار زیادی در این زمینه وجود دارد که به مطالعه چگونگی تشخیص دقیق گونه‌های مگس مهم در زمینه پزشکی قانونی به کمک توالی‌های DNA و عمدتاً COI می‌پردازد (Wallman and Donnellan, 2001; Wells and Sperling, 2001; Wells *et al*., 2001).

از مطالعات دیگری که در زمینه استفاده از توالی‌یابی در زمینه شناسایی گونه‌ها می‌توان به آن اشاره کرد مربوط به مگس‌های مینوز از خانواده Agromyzidae است که از لحاظ اقتصادی جزء آفات مهم کشاورزی تلقی می‌شوند چرا که این حشرات در زمان طغیان دوره‌ای جمعیت‌شان توانایی از بین بردن کل محصول زراعی را دارند (Shepard *et al*., 1998). توالی‌های COI به دست آمده از ۲۵۸ حشره متعلق به سه گونه مینوزها (*Liriomyza huidobrensis*، *L. trifolii* و *L. sativae*) متعلق به راسته Diptera، خانواده Agromyzidae در فیلیپین نشان داد، که در جمعیت‌های مهاجم در مقایسه با دامنه‌های بومی این گونه‌ها، هاپلوتایپ‌های میتوکندریایی کمتری پیدا شده (Scheffer *et al*., 2006)، و آنهایی هم که، حتی در داخل یک گونه، مشاهده شدند اغلب به میزان زیادی واگرا بودند (Nei *et al*., 1975). این الگو نشان دهنده وقوع تنگناهای ژنتیکی برای جمعیت است که به یک نشانگر مولکولی مانند DNA میتوکندریایی که هم وراثت هاپلوئیدی و هم وراثت مادری دارد مربوط می‌شود. آنالیز داده‌های حاصل از توالی‌یابی نشانگرهای مورد نظر توانست همه نمونه‌های مورد بررسی را همانند روش‌های سنتی شناسایی کند. بررسی توالی ژن-های میتوکندریایی در دو گونه *L. trifolii* و *L. sativae*

[1] Restriction Fragment Length Polymorphism
[2] Post Mortem Interval

واگرایی ژنتیکی خوبی را نشان دادند که بیانگر وجود گونه‌های نهان جدیدی است. با این وجود هیچ داده‌ای غیر از واگرایی توالی COI این استنتاج و نتیجه را تـأیید نکرد که این نتیجه نشان می دهد که این گونه‌ها دارای دودمان-های میتوکندریایی با همگرایی بالایی هستند بنابراین بسته به اینکه کدام توالی مرجع به کار رود رمزگذاری ممکن است تعداد گونه‌های موجود را زیاد و یا کم برآورد کند. با این وجود بررسی بیشتر شاید روشن کند که این دودمان-های واگرا واقعا نشاندهنده گونه‌هایی مجزا هست یا خیر. به علت همین پیچیدگی‌ها و ابهامات باید از طریق ترکیب داده‌های حاصل از ژنوم COI با داده‌های حاصل از منابع دیگر مانند اطلاعات مربوط به ریخت شناسی، و دیگر نواحی DNA شناسایی‌ها انجام گیرد.

از مثال‌های دیگری که می‌توان در این زمینه بیان کرد استفاده از خط شناسه گذاری DNA در شناسایی پارازیتوئیدها است. مگس‌های خانوادهٔ Tachinidae پارازیتوئید داخلی حشرات دیگر و اغلب لاروهای راسته بال پولک داران هستند. در یک مطالعه تنوع گونه‌ای جنس *Belvosia* متعلق به خانواده مذکور از شمال‌غرب کاستاریکا که پارازیتوئید صدپایان است با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی‌سنجی ژن‌های COI مورد بررسی قرار گرفت (Smith *et al*., 2006)، در این مطالعه توالی مذکور نه تنها توانست ۱۷ گونه شناخته‌شده مختص به میزبان جنس *Belvosia* را تشخیص دهد، بلکه مجموعه‌ای از گونه‌های نهان را که بسیار از نظر میزبانی تخصصی عمل می کنند شناسایی کند. در نتیجه مطالعه و بررسی توالی مذکور تعداد گونه‌های موجود به ۳۲ گونه افزایش پیدا کرد. از طرف دیگر این مطالعه نشان داد که خط شناسه گذاری DNA، قدرت آشکارکردن تنوع‌های پنهان و ناشناخته در گروه‌های دارای تنوع ریخت شناسانه متفاوت را داراست. در مطالعه‌ای دیگر روی خانواده Chironomidae که از لاروهای آنها در زمینه بررسی آلودگی‌های زیست محیطی آب‌های شیرین استفاده می‌شود (شناسایی حشرات در مرحله لاری بسیار پر اهمیت اما دشوار است) نشان داد که استفاده از روش خط شناسه گذاری DNA می‌تواند به شناسایی گونه‌های این خانواده کمک شایانی بکند (Ekrem *et al*., 2007; Pfenninger *et al*., 2007).

راسته سخت‌بال‌پوشان Coleoptera : در راسته سخت‌بال‌پوشان با نام علمی Coleoptera تنوع گونه‌ای بسیار بالاست و تاکنون تعداد ۳۵۰۰۰۰ گونه از این راسته توصیف شده است. پژوهش‌های زیادی در زمینه به کار بردن روش خط شناسه گذاری DNA با روش‌های مبتنی بر DNA انجام گرفته است. در یک مطالعه برای شناسائی گونه‌های سوسک‌های جنس *Canthon sp.* از خانواده Scarabaiedae و برخی از افراد سوسک‌های آبی خانواده Hydrophilidae، از انتهای '۳ COI و ژن هسته‌ای 28SrRNA استفاده کردند. نتایج نشان داد که توالی COI تصویر تقریبا دقیقی از مرزبندی‌های گونه‌ها را در این دو گروه از سوسک‌ها ارائه می‌دهد و این نتیجه می تواند به کاربرد توالی مذکور در شناسایی گونه‌ها اعتبار ببخشد (Monaghan *et al*., 2005). در بررسی روش خط شناسه گذاری DNA سوسک‌های آبی متعلق به جنس *Copelatus sp.* از خانواده Dyticidae جمع‌آوری شده از جزایر Fiji، چهار نشانگر DNA (سه ناحیه میتوکندریایی: COI، سیتوکروم b و 16S rRNA ژن هیستون 3 هسته‌ای) برای ۱۱۸ نمونه از ۲۰ جزیره توالی‌سنجی شدند (Monaghan *et al*., 2006). این تلاش به ویژه به عنوان یک مورد آزمون چالش‌برانگیز برای رمزینه‌گذاری درنظر گرفته شد زیرا دودمان‌های بسیاری در جزایر اقیانوسی برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفتند که به شناسائی تعداد زیادی گونه واگرای جدید با تاریخچه‌های ژنی خیلی پیچیده منجر شد. در نهایت راسته Coleoptera با به کارگیری توام دو رویکرد توالی‌های پیوسته DNA و روش‌های مرسوم ریخت شناسی(مانند ریخت شناسی اندام تناسلی جنس نر) طبقه‌بندی شدند. با اینکه الگوهای طبقه‌بندی با به کارگیری این دو رویکرد ناهمخوان بود، نویسندگان استدلال کردند که اگر رویکرد ریخت شناختی با یک سیستم نامگذاری لینه همراه شود، درک تکاملی دودمان‌های گوناگون از اعتبار بیشتری برخوردار خواهد شد. شیوه ریخت شناختی زمانبر بوده، مستلزم دانش تخصصی از تفاوت صفات مربوط به طبقه‌بندی در سطح گونه است (Monaghan *et al*., 2006). بنابراین شناسائی بعدی گونه با استفاده از ریخت شناسی به دلیل توصیفات مبهم و وجود مشکلاتی در به دست آوردن نوع نمونه‌ها می‌تواند مشکل‌آفرین باشد، موقعیتی که Monaghan و همکاران (۲۰۰۶) با پنج گونه *Copelatus* از Fiji که قبلاً

توصیف شده بودند مواجه شدند. رویکرد توالی‌سنجی در ترکیب با آنالیز تبارزائی خلاصهٔ جامعی از تاریخچه تکاملی را فراهم می‌کند و زمانی که توالی‌ها به پایگاه داده ارسال می‌شوند (در این مورد EMBL) داده‌ها به آسانی قابل دسترس بوده و تجدید آنالیزهای بعدی می‌تواند توسط هر فردی انجام بگیرد. Monaghan و همکاران (۲۰۰۶) پیشنهاد کردند که توالی‌های DNA خود می‌توانند یک سیستم گروه‌بندی و ارتباط تاکسونومیکی را شکل دهند بدون اینکه نیاز به سیستم طبقه‌بندی رسمی لینه باشد. این مطالعه نشان می‌دهد زمانی‌که روش‌های ریخت شناسی استاندارد ناقص یا بسیار وقتی‌گیر هستند، توالی‌سنجی DNA می‌تواند کار طبقه‌بندی گونه‌های جهانی موجود را انجام دهد.

راسته بال‌غشائیان Hymenoptera : راسته بال‌غشائیان با تقریباً ۱۲۵٫۰۰۰ گونه توصیف‌شده چهارمین راسته بزرگ حشرات را پس از سخت بال پوشان Coleoptera، بال‌پولک‌داران Lepidoptera، و دوبالان Diptera تشکیل می‌دهد (Grimaldi and Engel, 2005; Beutel and Pohl, 2006). با توجه به اینکه گمان می‌رود گونه‌های نهان قابل توجهی در این راسته وجود داشته باشند ممکن است غنای واقعی گونه‌های این راسته از از حد انتظار نیز فراتر رود (Grissell 1999). مورچه‌ها در بسیاری از زیست‌بوم‌های جهان گروه عمده‌ای از بندپایان را تشکیل می‌دهند. آنها در بازچرخش مواد غذائی حائز اهمیت بوده، فعالیت‌های آنها داخل خاک موجب تولید ریززیستگاه‌های غذایی بسیار متنوعی می‌شود که توالی، رشد و توزیع گیاهان را تحت تـأثیر قرار می‌دهد. در ماداگاسکار این حشرات فون فوق‌العاده متنوعی را درا می‌باشند که در حال حاضر تخمین زده می‌شود مشتمل بر ۱۰۰۰ گونه است و گمان می‌رود ۹۶٪ آنها بومی باشند. اما تنها ۲۵ درصد از این مجموعه تخمین زده شده توصیف گردیده‌اند که این مسئله خود مانع عمده‌ای بر سر راه مطالعات بیوجغرافیایی، وضعیت حفاظت و نقش آنها در فرآیندهای اکوسیستم محسوب می‌شود. بنابراین در مطالعه این سئوال که "آیا خط شناسه‌گذاری DNA می‌تواند به عنوان جایگزین موثری برای شناسائی ریخت شناختی گونه‌ها عمل کند یا نه" مورد بررسی قرار گرفت، در این راستا ۲۸۰ نمونه از چهار مکان جمع‌آوری و بر اساس روش ریخت گونه‌ای[1] شناسائی و از نظر COI توالی‌سنجی شدند (Smith *et al*., 2005). نمونه‌ها هم بر اساس داده‌های توالی مذکور به واحدهای MOTU[2]ها طبقه‌بندی شده و هم طبق خصوصیات ریخت شناختی به ریخت‌گونه‌ها طبقه‌بندی شدند، سپس نتایج هر دو روش طبقه بندی با هم مقایسه شدند هر چند بین نتایج روش‌های مولکولی و ریخت شناختی آرایه‌ها هماهنگی بالایی وجود نداشت، ولی همبستگی‌های قوی بین این دو تا حدودی مشاهده شد. بر این اساس اینگونه می‌توان استنباط کرد، روش ریخت شناختی تمایل به این امر دارد که گونه های شناسایی شده توسط روش مولکولی را همچنان به یک یا چند گونه مشخص محدود کند. اما بررسی الگوهای غنای آرایه‌ها در سراسر این چهار مکان، اختلافات معنی‌داری بین داده‌های ارائه شده توسط MOTUها و ریخت‌گونه‌ها مشاهده نشد. بعلاوه، اینکه MOTU ها بر اساس واگرایی ۲٪ و ۳٪ تعریف شدند فقط تعداد مطلق آرایه‌های تعیین‌شده را تغییر داد و موجب ایجاد تفاوت چشمگیری از نظر الگوهای کلی تنوع مشاهده‌شده نگردید. این یافته نشان دهنده آن است که MOTUها می‌توانند جایگزین موثری برای تعیین گونه‌ها به روش‌های مرسوم و سنتی مثلا روش ریخت شناختی باشند. با اینکه MOTU ها لزوماً گروه‌بندی‌های تاکسونومی یکسانی را دقیقاً تعیین نمی‌کنند ولی همان الگوهای کلی تاکسونومی را مشخص خواهند کرد. نتایجی از این قبیل بر این نکته تاکید دارد که مطالعات مبتنی بر استفاده از آرایه‌های توالی DNA که نتیجتاً آرایه‌های طبقه‌بندی و ریخت شناختی را تعیین می‌کنند در مقایسه با روش پرزحمت و زمان بر ریخت شناختی می‌تواند بسیار مفید واقع شود. ارزیابی‌های دقیق در مورد شناسایی گونه‌ها بین مناطق جغرافیایی خیلی بزرگتر و گروه‌های تاکسونومی بیشتر با این روش ها فراهم می شود.

نتیجه گیری

در بین کاربردهای متنوع خط شناسه‌گذاری DNA، می‌توان به کارایی این روش در شناسایی در مقیاس وسیع موجودات زنده در مطالعات اکولوژیک و تنوع زیستی، امکان شناسایی و توصیف گونه‌های بالقوه جدید و

[1] Morphospecies
[2] molecular operational taxonomic units

تشخیص گونه‌های مخفی اشاره کرد. اگرچه اساسا این روش‌ها جدید محسوب نمی‌شوند با این وجود روش خط شناسه‌گذاری DNA به دلیل پیشرفت‌های تکنیکی صورت گرفته، می‌تواند روند جمع‌آوری داده‌های مولکولی را سرعت بخشیده و کارایی طبقه‌بندی گونه ها را افزایش دهد (Stoeckle, 2003; Monaghan *et al*., 2006). در واقع راهکار استفاده از خط شناسه‌گذاری نه تنها کنار زدن روش‌های سنتی طبقه‌بندی نیست بلکه جهت دادن به مطالعات مرتبط با طبقه‌بندی جانداران مختلف است که به خودی خود باعث صرفه‌جویی در وقت و افزایش کارایی شناسایی و توصیف گروه‌های مختلف جانوری و کاهش هزینه‌های مرتبط با طبقه‌بندی سنتی می‌شود. لازم به ذکر است که روش بارکدینگ جانداران کاربردهای متعددی بسیار وسیع تری نسبت به روش های سنتی دارد. از جمله این موارد می توان به شناسایی گونه های گیاهی فقط با استفاده از ذره‌ای برگ، ساقه یا بخش‌های دیگر، بی نیاز از گل یا میوه، شناسایی حشرات با استفاده از مراحل غیر بالغ و بدون نیاز به نمونه های غیر بالغ ، شناسایی رژیم غذایی جانوران با بررسی محتویات روده آن‌ها، شناسایی محصولات تجاریمانند مکمل‌های غذایی، داروهای گیاهی و غیره، سرعت بخشیدن به مطالعات تنوع زیستی و شناخت هرچه سریع‌تر میلیون‌ها گونه ناشناخته، شناسایی پشه‌های ناقل بیماری‌های عفونی، تشخیص نوع گوشت در رستوران‌ها، تشخیص نوع آفت‌های کشاورزی و باغداری، تشخیص بیماری‌های قارچی و ناشی از تک سلولی‌ها نظیر *پلاسمودیوم* که عامل بیماری مالاریا است، شناسایی نمونه‌هایی که در موزه‌ها وجود دارند، اطمینان از نوع تغذیه دام‌ها و غیره اشاره کرد. همانطور که سرعت و هزینه عکس برداری هوایی جای بررسی‌های زمینی را گرفته است، خط شناسه DNA نیز می‌تواند نخستین گام سریع و ارزان در کشف گونه‌ها باشد. گرچه ااین روش برای تکمیل شدن زمان قابل توجهی را نیاز دارد ولی می تواند نویدبخش رویکردی تازه و جدید در شناسایی و طبقه بندی جانداران از جمله حشرات باشد (Hebert *et al.*, 2004b).

منابع

Ballard J. W. O. and Whitlock, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. Molecular Ecology 13: 729-744.

Beebe, N. W., Foley, D. H., Cooper, R. D., Bryan, J. H. and Saul, A. 1996. DNA probes for the Anopheles punctulatus complex. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 54: 395–398.

Bergmann. T.. Hadrys. H.. Breves. G. and Schierwater. B.. 2009. Character-based DNA barcoding: a superior tool for species classification. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 122(11/12): 446-450.

Beutel, R. G. and Pohl, H. 2006. Endopterygote systematics where do we stand and what is the goal (Hexapoda, Arthropoda)? Systematic Entomology 31: 202–219.

Blaxter, M. L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. Philosophical Transactions of theRoyal Society. B. Biological Sciences 359: 669–679.

Brower, A. V. Z. 2006. Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astraptes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiidae). Systematics and Biodiversity 4: 127–132.

Cannon, P. F., Bridge, P. D. and Monte, E. 2000. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. Pp. 1-20. In: D. Prusky, S. Freeman and M.B. Dickman (eds.). *Colletotrichum*: Host Specificity, Pathology, and Host Pathogen Interaction. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Catts, E. P. and Haskell, N. H. 1990. Entomology and Death: A Procedural Guide. Joyce's Print Shop, Clemson, SC.

Cywinska, A., Hunter, F. F. and Hebert, P. D. N.. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Medical and Veterinary Entomology 20: 413–424.

Ekrem, T., Willassen, E. and Stur, E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. Molecular Phylogenetics and Evolution 43: 530–542.

Fanello, C., Santolamazza, F. and della Torre, A. 2002. Simultaneous identification of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex by PCR-RFLP. Medical and Veterinary Entomology 16: 461–464.

Floyd. R. M.. Wilson. J. J. and Hebert. P. D. 2009. DNA barcodes and insect biodiversitv. Insect Biodiversity: Science and Society, 417-431.

Foley, D. H., Wilkerson, R. C., Cooper, R. D., Volovsek, M. E. and Bryan, J. H. 2007. A molecular phylogeny of *Anopheles annulipes* (Diptera: Culicidae) sensu lato: the most species-rich anopheline complex. Molecular Phylogenetics and Evolution 43: 283–297.

Giangrande, A. 2003. Biodiversity, conservation, and the 'taxonomic impediment. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 13: 451–459.

Green, C. A., Munstermann, L. E., Tan, S. G., Panyim, S. and Baimai, V. 1992. Population genetic evidence for species- A, species-B, species-C and species-D of the *Anopheles dirus* complex in Thailand and enzyme electromorphs for their identification. Medical and Veterinary Entomology 6: 29–36.

Grimaldi, D. A. and Engel, M. S. 2005. Evolution of the Insects. Cambridge University Press, Cambridge.

Grissell, E. E. 1999. Hymenopteran biodiversity: some alien notions. American Entomologist 45: 235–244.

Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W. and Hebert, P. D. N. 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America 103: 968-971.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, Sh. L. and DeWaard, J. R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London 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*. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America 101: 14812-14817.

Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. and DeWaard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. Proceedings of the Royal society of London series B-(Biological Sciences), 270: 96-99 .

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., and Francis, C. M. 2004b. Identification of Birds through DNA Barcodes. Plos Biology 10: 312.

Janzen, D. H., Hajibabaei, M., Burns, J. M., Hallwachs, W., Remigio, E. and Hebert, P. D. N. 2005. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society. B. Biological Sciences 360: 1835–1845.

Kent, R. J., West, A. J. and Norris, D. E. 2004. Molecular differentiation of colonized human malaria vectors by 28S ribosomalDNApolymorphisms. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 71: 514–517.

Khuroo, A. A., Rashid, I., Reshi, Z., Dar, G. H., and Wafai, B. A. 2007. The alien flora of Kashmir Himalaya. Biolgical Invasions 9(3): 269-292.

Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A. , Weight, L. A. and Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America 102: 8369-8374.

Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R. and Jambulingam, P. 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 44: 1–7.

Malgorn, Y. and Coquoz, R. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae.An interest in forensic entomology. Forensic Science International 102: 111–119.

Mallet, J. and Willmott, K. 2003. Taxonomy: renaissance or Tower of Babel?. Trends in Ecology and Evolution 18: 57–59.

Meusnier, I., Singer, G. A. C., Landry, J., Hickey, D. A., Hebert, P. D. N., and Hajibabaei, M. 2008. A universal DNA mini-barcode for biodiversity. Bio Med Central Genomics 9:. 214.

Michel, A. P., Guelbeogo, W. M., Grushko, O. Schemerhorn,, B. J., Kern, M., Willard, M. B., Sagnon, N., Costantini, C. and Besansky, N. J. 2005. Molecular differentiation between chromosomally defined incipient species of *Anopheles funestus*. Insect Molecular Biology 14: 375–387.

Monaghan, M. T., Balke, M., Gregory, T. R. and Vogler, A. P. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. Philosophical Transactions of the Royal Society. B. Biological Sciences 360: 1925–1933.

Monaghan, M. T., Balke, M., Pons, J. and Volger, A. P. 2006. Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific Island radiation. Proceedings of the royal society of London, series B: Biological Sciences 273: 887-893.

Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variationmitochondrial- gene trees versus nuclear-gene trees. Evolution 49: 718-726.

Nei, M., Maruyama, T. and Chakraborty, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution 29: 1–10.

Nelson, L. A., Wallman, J. F. and Dowton, M. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. Medical and Veterinary Entomology 21: 44–52.

Pfenninger, M., Nowak, C., Kley, C., Steinke, D. and Streit, B. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval

community structure inmorphologically cryptic *Chironomus* (Diptera) species. Molecular Ecology 16: 1957–1968.

Ratnasingham, S., and Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Molecular Ecology Notes 7: 355-364.

Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. and Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society. B. Biological Sciences 360: 1805–1811.

Scheffer, S. J., Lewis, M. L. and Joshi, R. C. 2006. DNA barcoding applied to invasive leafminers (Diptera: Agromyzidae) in the Philippines. Annals of the Entomological Society of America 99: 204–210.

Scoble, M. J. 1992. Lepidoptera: Form, Function, and Diversity. Oxford University Press, Oxford.

Shepard, B., Samsudin, M., and Braun, A. R. 1998. Seasonal incidence of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera : Agromyzidae) and its parasitoids on vegetables in Indonesia. International Journal of Pest Management 44: 43–47.

Sheth, B. P. and Thaker, V. S., 2017. DNA barcoding and traditional taxonomy: An integrated approach for biodiversity conservation. Genome 60(7):618-628.

Smith, K. G. V. 1986. Manual of Forensic Entomology. British Museum (Natural History), London.

Smith, M. A., Fisher, B. L., and Hebert, P. D. N. 2005."DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse ar thropod group: the ants of Madagascar. Philosophical Transactions of the Royal Society-Biological Sciences 360 (2005): 1825-1834.

Smith, M. A., Woodley, N. E., Janzen, D. H., Hallwachs, W. and Hebert, P. D. N. 2006. DNA barcodes reveal cryptic hostspecificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103: 3657–3662.

Sperling, F. A., Anderson, G. S. and Hickey, D. A. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences* 39: 418–427.

Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and Bar Code of Life. Biological Sciences 53(9): 2-3.

Stork, N. E. 2018. How many species of insects and other Terrestrial arthropods are there on earth?. The Annual Review of Entomology 63:31–45

Tautz, D., Arctander, P., Minelli , A., Thomas, R. H., and Vogler, A. P. 2003. A plea for DNA taxonomy. Trends in Ecology and Evolution 18: 70–74.

Vincent, S., Vian, J. M. and Carlotti, M. P. 2000. Partial sequencing of the cytochrome oxydase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. Journal of Forensic Sciences 45: 820–823.

Wallman, J. F. and Donnellan, S. C. 2001. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. Forensic Science International 120: 60–67.

Wells, J. D. and Sperling, F. A. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). Forensic Science International 120:110–115.

Wells, J. D., Pape, T. and Sperling, F. A. 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). Journal of Forensic Sciences 46: 1098–1102.

Wilson, E. O. 1988. The current state of biological diversity. Pp. 3-18. In: Wilson EO, Peter FM (eds) Biodiversity. National Academy Press, Washington.

Wilson, E. O. 2003. The encyclopedia of life. Trends in Ecology and Evolution 18: 77–80.

Witt, J. D. S., Threloff, D. L. and Hebert, P. D. N. 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. Molecular Ecology 15: 3073-3082.

Yassin, A., Capy, P., Madi-Ravazzi, L., Ogereau, D. and David, J. R. 2008. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid Zaprionus indianus. Molecular Ecology Resources 8: 491-501.

A review on DNA barcoding for identification of insects

Zamani H.[1] and Ghobari H.[2]

[1] **Plant protection Dept., Faculty of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, I.R. of Iran**

[2] **Plant protection Dept., Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. of Iran**

Abstract

Despite the limitations of classical classification causes many Arthropods especially insect are not identified yet, Investigation of Biodiversity, Description, taxonomy and systematic of different living organisms like insects have been done with emphasis on morphological and behavioral characters since the time of Karl Linneaus about 250 years ago. In recent years DNA barcoding provides an alternative tool for species identification based on a short DNA sequence diversity.DNA barcoding is generally considered as a novel, rapid, accurate, reliable, cost-effective and easy molecular identification tool with a wide applicability across metazoan taxa especially insect. DNA barcoding has established as a mature field of biodiversity sciences filing the conceptual gap between traditional taxonomy and different fields of molecular systematics and have recently been proposed as solutions to the crisis of taxonomy. The method provide a framework for the taxonomy of poorly known groups and comprise large numbers of notorious pest species whose identification often requires highly specialized taxonomic skills and evenly determine cryptic species. As well as it could be very useful to routinely identify difficult taxa of economic and medical importance. In addition, DNA barcoding could be pivotal for the identification of certain life stages (*e.g.* eggs, larvae, nymphs or pupae), which are often impossible to identify otherwise. However, despite these highly positive claims, DNA barcoding also seems to suffer from a number of potential limitations when used for the identification of insects. The recent speciation, the prevalence of paraphyly and the regular interspecific hybridisation in many insect taxa, as well as their often poorly-established taxonomy and their high degree of infection by endosymbiotic bacteria such as Wolbachia may all negatively affect the performance of insect DNA barcoding. Even more importantly, the reliability of insect DNA barcoding may be questioned because insects include >1,000,000 described species and probably millions of still undescribed taxa. This exuberant species richness may, indeed, severely constrain the ability of the DNA barcode reference databases to adequately represent the overwhelming insect taxonomic diversity. According to mentioned stated content, Integration of Molecular methods like DNA barcoding is suitable to identify living organism especially insect

Key words: Classical and molecular systematics, DNAbarcoding studying, insects