

**PENGEMBANGAN PCR-RFLP BERDASARKAN ITS2 rDNA UNTUK IDENTIFIKASI SPESIES SIBLING ANGGOTA *Anopheles punctulatus* GROUP DARI PAPUA**

I.J. Suyono<sup>1</sup>, Rarastoeti<sup>2</sup>, R.C. Hidayat<sup>2</sup> dan J. Situmorang<sup>2</sup>  
Program Pascasarjana Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

**PCR-RFLP DEVELOPMENT BASED ON ITS2 rDNA FOR IDENTIFICATION OF SIBLING SPECIES OF *Anopheles punctulatus* GROUP FROM PAPUA**

**ABSTRACT**

This study is the first step in conducting molecular identification of sibling species of *Anopheles punctulatus* group of Papua. Research objectives were to develop molecular identification of sibling species of *An. punctulatus* group of Papuans by using PCR-RFLP based on rDNA ITS2. The samples used were mosquitoes caught by the bait of people in East Koya and Arso II and *An. farauti* derived from a laboratory colony in BATAN Jakarta. Include the isolation of DNA molecular identification of mosquito and ITS2 rDNA amplification using primer ITS2A and ITS2B by using PCR machine. ITS2 PCR results electrophoresed on 1.5% agarose gel containing 0.5 ug / ml ethidium bromide and observed using a UV transilluminator and photographed using a digital camera. Further amplification of ITS2 cut with MSP I restriction enzyme to produce a specific pattern of fragments that can be used for species identification. ITS2 amplification results for all samples of mosquitoes indicates the size of 750 bp. The results of identification by PCR-RFLP for the mosquito *An. farauti* from laboratory colonies showed that laboratory colonies of mosquitoes were *An. farauti* ss formerly known as *An. farauti* 1. PCR-RFLP method developed in this study are expected to be cheaper and faster to use in species identification.

**Key words :** *Anopheles punctulatus* group, molecular identification, ITS2 rDNA, sibling species, Papua.

## ABSTRAK

Penelitian ini merupakan langkah awal dalam melakukan identifikasi molekular spesies sibling anggota *Anopheles punctulatus* group dari Papua. Tujuan penelitian untuk mengembangkan identifikasi molekular spesies sibling anggota *An. punctulatus* group dari Papua dengan menggunakan PCR-RFLP berdasarkan ITS2 rDNA. Sampel yang digunakan adalah nyamuk yang ditangkap dengan umpan orang di Koya Timur dan Arso II serta *An. farauti* berasal dari koloni laboratorium di BATAN Jakarta. Identifikasi molekular meliputi isolasi DNA nyamuk dan amplifikasi ITS2 rDNA dengan menggunakan primer ITS2A dan ITS2B dengan menggunakan mesin PCR. Hasil PCR ITS2 dielektroforesis pada gel agarosa 1,5 % yang mengandung 0,5 ug/ml etidium bromida dan diamati dengan menggunakan UV transilluminator dan difoto dengan menggunakan kamera digital. Selanjutnya hasil amplifikasi ITS2 dipotong dengan enzim restriksi *Msp* I untuk menghasilkan pola fragmen spesifik yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies. Hasil amplifikasi ITS2 untuk semua sampel nyamuk menunjukkan ukuran sebesar 750 bp. Hasil identifikasi dengan PCR-RFLP untuk nyamuk *An. farauti* dari koloni laboratorium menunjukkan bahwa nyamuk koloni laboratorium tersebut adalah *An. farauti* s.s yang sebelumnya dikenal dengan nama *An. farauti* 1. Metode PCR-RFLP yang dikembangkan dalam penelitian ini diharapkan lebih murah dan cepat digunakan dalam identifikasi spesies.

**Kata kunci :** *Anopheles punctulatus* group, identifikasi molekular, ITS2 rDNA, spesies sibling, Papua.

## PENDAHULUAN

Di dunia terdapat 422 spesies nyamuk *Anopheles* dan ada sekitar 67 spesies yang telah dikonfirmasi memiliki kemampuan untuk menularkan penyakit malaria. Di Indonesia telah diidentifikasi ada 90 spesies nyamuk *Anopheles*, dan ada 16 spesies di antaranya telah dikonfirmasi sebagai vektor malaria. Mereka memiliki habitat, mulai dari rawa-rawa, pegunungan, sawah, pantai dan lain-lain (Ahmadi 2005). Sebagian besar vektor malaria merupakan spesies sibling yang secara morfologi tidak dapat dibedakan tetapi berbeda dalam genetik, ekologi, biologi, kapasitas vektorial (*vectorial capacity*), pemilihan inang, perilaku menghisap darah, distribusi geografis dan resistensi terhadap insektisida (Oshaghi *et al.*, 2005).

Vektor utama malaria di Papua, Papua New Guenia, Kepulauan Salomon, dan Vanuatu adalah anggota *Anopheles punctulatus* group, dan beberapa spesies lainnya seperti *An. bancrofti*, *An. karwari* dan *An. longirostris* tetapi mempunyai peranan yang kecil dalam menularkan malaria. Upaya untuk mengidentifikasi jumlah spesies dalam *Anopheles punctulatus* group telah dilakukan oleh berbagai peneliti. Berdasarkan kajian morfologi pada awalnya anggota *An. punctulatus* group terdiri atas empat spesies yang berkerabat dekat yaitu : *An. farauti* Laveran, *An. punctulatus* Donitz, *An. koliensis* Owen dan *An. clowi* Rozeboom & Knight. Dari eksperimen kawin silang, analisis allozyme dan DNA probe, sekarang telah diketahui sedikitnya ada 12 spesies sibling dalam *Anopheles punctulatus* group yaitu : *An. punctulatus*,

*An. sp* near *punctulatus*, *An. clowi*, *An. rennellensis*, *An. koliensis*, dan *An. farauti* nomor 1 hingga 7. *An. clowi* dan *An. rennellensis* jarang ditemukan dan distribusinya sangat terbatas (Beebe dan Saul, 1995; Benet *et al.*, 2004).

Sejauh ini secara morfologi anggota *Anopheles punctulatus* group di Papua yang dikenal adalah *An. farauti*, *An. koliensis* dan *An. punctulatus*. Namun identifikasi berdasarkan morfologi tidak mudah dilakukan karena terdapat kesamaan morfologi antar anggota spesies group tersebut sehingga sering terjadi kesalahan dalam mengidentifikasi spesies. Hal ini ditunjukkan oleh Benet *et al.*, (2004) dalam melakukan identifikasi anggota *An. punctulatus* group di PNG dengan menggunakan PCR-RFLP dari ITS2 rDNA, hanya *An. punctulatus* yang diidentifikasi secara morfologi sama dengan hasil yang diperoleh dengan menggunakan PCR-RFLP, sedangkan untuk morfotipe *An. farauti* dan *An. koliensis* diperoleh beberapa spesies. Lima spesies untuk morfotipe *An. farauti* yaitu : *An. farauti* s.s, *An. farauti* 4, *An. farauti* 2, *An. koliensis* dan *An. punctulatus* dan tiga spesies untuk morfotipe *An. koliensis* yaitu : *An. farauti* 4, *An. koliensis* dan *An. punctulatus*.

Pada nyamuk setiap unit transkripsional dari rDNA terdiri dari satu *external transcribed spacer* (ETS), satu sub unit 18S, satu *internal transcribed spacer* 1 (ITS1), satu sub unit 5.8S, satu *internal transcribed spacer* 2 (ITS2) dan satu sub unit 28S. Unit-unit rDNA dalam

suatu susunan yang satu sama lainnya dihubungkan oleh satu *intergenic spacer* (IGS). *Transcribed spacer* diperkirakan mengandung struktur terkonservasi yang penting dalam proses pematangan ribosom. Sekuens rDNA merupakan sumber informasi yang penting karena daerah fungsional yang menghasilkan ribosom sangat terkonservasi, tetapi *transcribed* dan *nontranscribed spacer* mempunyai variasi interspesifik tinggi dan variasi intraspesifik yang rendah sehingga dapat digunakan untuk menjelaskan hubungan spesies yang baru terpisah dan juga berguna sebagai dasar PCR dalam identifikasi spesies yang secara morfologi sama. ITS2 telah banyak digunakan dalam menyusun filogenetik spesies yang berhubungan dekat maupun spesies sibling, maupun untuk pengembangan diagnosis spesies berdasarkan PCR atau menghasilkan *species-specific restriction fragment length polymorphism* (RFLP) untuk identifikasi spesies, khususnya untuk spesies yang mempunyai morfologi yang sama atau spesies yang identik (Oshagi *et al.*, 2005; Li dan Wilkerson, 2006; Dabert, 2006).

Beberapa anggota dari *Anopheles punctulatus* group sangat mirip secara morfologi sehingga sulit untuk dibedakan dengan kajian morfologi. Analisis PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) dari DNA ribosom (rDNA) *internal transcribed spacer* 2 (ITS2) pada saat ini dapat digunakan untuk membedakan anggota *Anopheles punctulatus* group

(Beebe *et al.*, 2000). Metode ini perlu dikembangkan agar dapat digunakan untuk identifikasi spesies sibling anggota *An. punctulatus* group dari Papua juga metode yang dikembangkan lebih murah dan cepat digunakan. Identifikasi spesies secara akurat memberikan landasan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui berbagai karakter biologi dari masing-masing spesies sibling anggota *An. punctulatus*

## BAHAN DAN METODE

### Sampel Penelitian

Sampel nyamuk yang termasuk *Anopheles punctulatus* group diperoleh dengan penangkapan umpan manusia dari Kampung Arso II Kabupaten Keerom dan Kampung Koya Timur Kotamadya Jayapura dengan kode sampel PG1 hingga PG9. Selain itu juga digunakan nyamuk *An. farauti* dari koloni laboratorium yang diperoleh dari BATAN Jakarta.

### Isolasi DNA nyamuk

Metode Isolasi DNA nyamuk yang digunakan adalah dengan menggunakan metode Collins *et al.*, (1987) dan metode Li *et al.*, (2005). Metode Collins *et al.*, (1987) adalah sebagai berikut : satu individu nyamuk digerus dalam 40 ml TE (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8), kemudian ditambahkan 5 ul proteinase K (20mg/mL) dan diinkubasi selama semalam pada suhu 50°C. Aktivitas proteinase dihentikan pada suhu 95°C selama 15 menit dan disentrifugasi selama 30 detik, selanjutnya disimpan pada suhu - 20°C. Sedangkan metode Li *et al* (2005) adalah sebagai berikut : satu ekor nyamuk

group seperti : ekologi, genetika, resistensi terhadap insektisida, kesukaan terhadap inang dan kerentanan terhadap *Plasmodium* serta distribusi geografis.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan identifikasi molekular spesies sibling anggota *Anopheles punctulatus* group dengan menggunakan PCR-RFLP berdasarkan ITS2 rDNA.

dimasukkan ke dalam larutan TE dan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 9.500 rpm selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung ependorf baru.

### Karakterisasi DNA

Karakterisasi DNA secara kuantitatif dilakukan dengan menetapkan konsentrasi total DNA secara spektrofotometri dengan menggunakan spektrofotometer sinar ultraviolet Ultraspec 2000 Pharmacia Biotech. DNA diencerkan 100 kali kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Tingkat kemurnian DNA dapat diketahui dari rasio  $A_{260/280}$ . Menurut Sambrook *et al.*, (1989) tingkat kemurnian DNA antara 1,8 – 2.

Amplifikasi ITS2 rDNA untuk identifikasi spesies

DNA yang digunakan adalah hasil isolasi DNA nyamuk yang telah dilakukan sebelumnya. Reaksi PCR dengan volume akhir 25 ul yang mengandung 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 , 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 2 unit Tag

Polymerase (Fermentas) , 6 % dimethylsulfoxide dan 0,6 uM masing-masing primer: ITS2A, 5'-TGTGAACTGCAGG-ACACAT-3' dan ITS2B, 5'-TATAGCTTAAATTCAGGGGGT-3'.

Siklus denaturasi awal pada suhu 94° C selama 5 menit, kemudian 35 siklus untuk 94° C selama satu menit, 53°C selama 1 menit, dan 72° C selama 2 menit dan siklus akhir 72° C selama 7 menit. Hasil PCR ITS2 dielektroforesis pada gel agarosa 1,5 % yang mengandung 0,5 ug/ml etidium bromida dan diamati dengan menggunakan ultraviolet UV transilluminator dan difoto dengan menggunakan kamera digital.

Pemotongan hasil PCR dan visualisasi

Hasil PCR dipotong dengan 5 unit enzim *Msp* I (5'-CCGG-3') dengan volume akhir 20 ul. Kemudian diinkubasi

pada suhu 37° C selama 60 menit. Hasil pemotongan dielektroforesis pada gel agarosa 2,5 % yang mengandung 0,5 ug/ml etidium bromida dan diamati dengan ultraviolet transilluminator selanjutnya difoto dengan menggunakan kamera digital. Pada penelitian ini digunakan enzim *Msp* I dari Fermentas untuk memotong hasil amplifikasi ITS2 nyamuk dari Koya Timur dan Arso II dan *Msp* I dari Sigma untuk memotong hasil amplifikasi ITS2 nyamuk dari koloni laboratorium di BATAN.

### Analisis Data

Untuk melihat perbedaan antara spesies yang satu dengan yang lainnya dengan cara melihat pola fragmen yang dihasilkan pada foto hasil penelitian dibandingkan standar dari penelitian Beebe dan Saul (1995).

## HASIL

### 1. Isolasi DNA

Hasil isolasi DNA dengan menggunakan metode Collins *et al.*, (1987) dan Li *et al.*, (2005) dapat dilihat pada Tabel 1. Pemilihan kedua metode tersebut didasarkan pada efisiensi pekerjaan dan biaya. Hasil isolasi DNA dari kedua metode tersebut di atas menunjukkan bahwa nilai kemurnian DNA masih di bawah yang disyaratkan oleh Sambrook *et al.*, (1989) yaitu antara 1,8 – 2. Namun hasil isolasi DNA dengan menggunakan metode Li *et al.*, (2005) dapat digunakan untuk analisis PCR

ITS2 rDNA meskipun nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,4 – 1,5. Penggunaan badan secara utuh dari nyamuk sebagai sumber DNA dengan pertimbangan bahwa penelitian ini hanya untuk mendapatkan marker DNA untuk identifikasi spesies sehingga tidak harus melakukan isolasi DNA dari kaki nyamuk. Namun jika akan dilakukan analisis lainnya seperti identifikasi sporozoit pada nyamuk, analisis parity maupun kesukaan nyamuk terhadap inang tertentu maka sebaiknya untuk identifikasi spesies sumber DNA diambil dari kaki nyamuk.

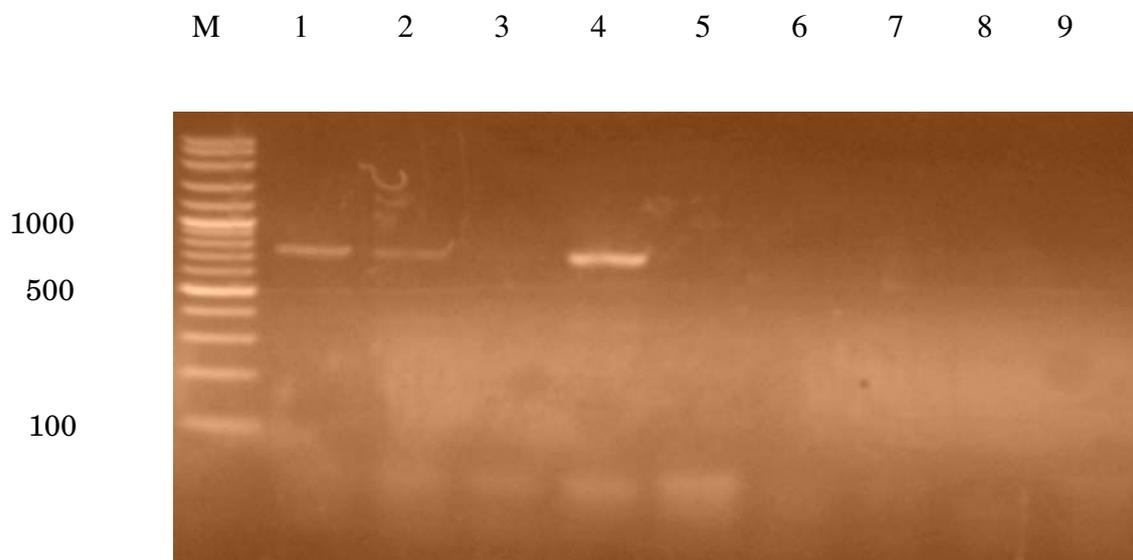
Tabel 1. Hasil isolasi DNA nyamuk dari Koya Timur dan Arso II dengan menggunakan metoda Collins *et al.*, (1987) dan metode Li *et al.*, (2005)

Kode Sampel	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	R <sub>260/280</sub>	Konsentrasi (ng/ul)	Sumber DNA	Metode
PG1	0,210	0,154	1,4	525	Badan utuh	Li <i>et al.</i> , (2005)
PG2	0,201	0,138	1,5	502,5	Badan utuh	Collins <i>et al.</i> , (1987)
PG3	0,177	0,114	1,6	442,5	Badan utuh	Li <i>et al.</i> , (2005)
PG4	0,230	0,154	1,5	575	Badan utuh	Li <i>et al.</i> , (2005)
PG5	0,153	0,119	1,3	382,5	Badan utuh	Collins <i>et al.</i> , (1987)
PG6	0,191	0,168	1,2	477,5	Badan utuh	Collins <i>et al.</i> , (1987)
PG7	0,238	0,198	1,2	595	Badan utuh	Collins <i>et al.</i> , (1987)
PG8	0,235	0,203	1,2	587,5	Badan utuh	Collins <i>et al.</i> , (1987)
PG9	0,153	0,125	1,2	382,5	Badan utuh	Collins <i>et al.</i> , (1987)

## 2. Amplifikasi PCR ITS2 rDNA

Setelah dilakukan PCR dengan 35 siklus, setiap hasil amplifikasi PCR divisualisasi dengan menggunakan gel agarosa 1,5 %. Dari sembilan sampel DNA nyamuk yang diduga *Anopheles*

*punctulatus* group hanya sampel PG1, PG2 dan PG4 yang dapat teramplifikasi dengan ukuran 750 basepair dengan baik sedangkan sampel lainnya tidak dapat diamplifikasi (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil amplifikasi ITS2 rDNA nyamuk yang tergolong *An. punctulatus* group. (M) Ladder 100 bp. (lane 1 s/d 9) sampel PG1 hingga PG9.

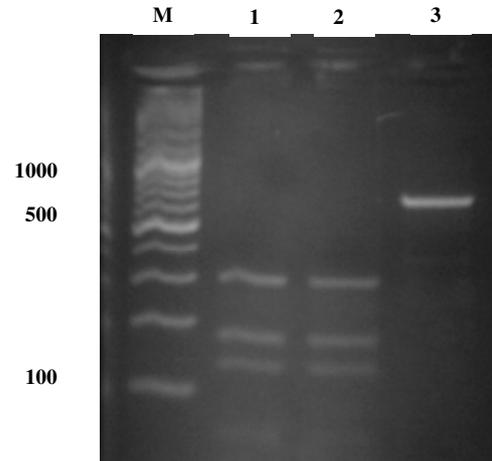
Berdasarkan hasil PCR dari ITS2 rDNA yang telah dilakukan hanya sampel yang diisolasi dengan menggunakan metode isolasi DNA dari Li *et al.*, (2005) dapat teramplifikasi dengan ukuran 750 basepair. Sedangkan sampel lainnya yang diisolasi dengan menggunakan metode isolasi DNA dari Collins *et al.*, (1987) tidak dapat teramplifikasi.

Dalam upaya untuk dapat mengamplifikasi ITS2 rDNA dengan ukuran 750 basepair telah dilakukan optimasi PCR terutama pada suhu annealing dan volume DNA templete yang digunakan. Range suhu annealing yang digunakan mulai dari 51 C - 53 C sedangkan volume DNA yang digunakan dari 1 ul – 5 ul. Mengingat metode isolasi DNA Li *et al.*, (2005) merupakan metode yang sederhana sehingga dalam PCR tidak perlu diencerkan, sehingga volume DNA templete sangat menentukan dalam memperoleh hasil amplifikasi. Peningkatan volume DNA templete menjadi 1,5 ul dengan suhu annealing 53 C dihasilkan band spesifik untuk sampel PG1 dan PG4 tetapi sampel lainnya masih belum diperoleh band namun dengan dinaikkannya volume DNA templete menjadi 3 – 5 ul dihasilkan band spesifik pada sampel PG1, PG2 dan PG4. Dalam reaksi PCR

ditambahkan DMSO yang berfungsi untuk menstabilkan struktur sekunder ITS2.

### 3. Pemotongan hasil amplifikasi ITS2 dengan enzim restriksi *Msp* I

Pemotongan hasil amplifikasi ITS2 nyamuk dari Koya Timur dan Arso II dengan menggunakan enzim restriksi *Msp* I dari Fermentas tidak diperoleh hasil pemotongan walaupun sudah dicoba dengan berbagai kombinasi komposisi reaksi. Selanjutnya pemotongan hasil amplifikasi ITS2 nyamuk dari koloni laboratorium dengan menggunakan enzim restriksi *Msp* I dari Sigma dapat diperoleh hasil pemotongan berupa pola fragmen tertentu (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil amplifikasi ITS2 *An. farauti*. M: 100 bp marker; Lane 1-2 : ITS2 dipotong dengan enzim restriksi *Msp* I; Lane 3 : Hasil amplifikasi ITS2.

## PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan telah berhasil dikembangkan identifikasi spesies sibling anggota *An. punctulatus* group dengan menggunakan PCR RFLP berdasarkan ITS2 rDNA. Pola fragmen yang dihasilkan dari pemotongan hasil amplifikasi ITS2 spesifik untuk spesies sibling tertentu. Hasil identifikasi morfospesies *An. farauti* dengan menggunakan PCR RFLP pada penelitian ini menunjukkan bahwa spesies tersebut merupakan *An. farauti* s.s yang sebelumnya dikenal sebagai *An. farauti* 1.

ITS2 dari *An. punctulatus* group mempunyai laju evolusi lebih cepat dari bagian lain rDNA yang mengkode gen. ITS2 merupakan sekuens yang terkonservasi sehingga dapat membentuk *stem loops* yang stabil. Dikarenakan merupakan struktur sekunder yang kuat, dalam reaksi PCR dibutuhkan DMSO untuk mengurangi stabilitas dari struktur sekunder DNA tersebut. Dari hasil penelitian yang kami lakukan (belum dipublikasikan) untuk melihat pengaruh konsentrasi DMSO terhadap hasil amplifikasi ITS2 dari *An. farauti* diperoleh fakta bahwa ITS2 dapat teramplifikasi dengan baik pada konsentrasi DMSO 6 % dan 7 %, sedangkan untuk konsentrasi di bawah 6% dan di atas 7 % ITS2 tidak dapat teramplifikasi. Pada penelitian ini konsentrasi DMSO yang digunakan adalah 6 %.

Berdasarkan literatur ukuran panjang sekuens ITS2 rDNA pada *An. punctulatus* group lebih besar

dibandingkan dengan nyamuk lainnya : *An. maculipennis* kompleks berukuran 440 bp, *An. gambiae* kompleks sebesar 426 bp, *An. nuneztovari* spesies sibling di Amerika Utara antara 363 hingga 369 bp, *An. dirus* spesies A dan spesies D dari Cina dengan ukuran 549 hingga 656 bp (Beebe dan Saul, 1995), *An. fluviatilis* kompleks di Iran dengan ukuran 450 bp (Nadaaf *et al.*, 2003) dan *An. minimus* kompleks dengan ukuran antara 512 hingga 552 bp (Van Bortel *et al.*, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa *spacer sequence* ITS2 sangat bervariasi dalam ukuran maupun panjang sekuens, meskipun di antara spesies yang sangat berhubungan sangat dekat, sehingga ITS2 dapat digunakan dalam identifikasi spesies (Nadaaf *et al.*, 2003).

Beberapa hal pokok yang menyebabkan ITS2 dari spesies *Anopheles* sering digunakan untuk identifikasi spesies : (1) ukuran ITS2 relatif pendek yaitu kurang dari 1 kilobasepairs (kbp), sehingga untuk mengamplifikasi ITS2 dengan primer yang dibuat dari daerah yang terkonservasi di *flanking coding region* relatif mudah dilakukan. (2) level variasi intraspesies ITS2 lebih rendah dari variasi interspesifik (Collins dan Paskewits, 1996) dan (3) ITS2 mempunyai laju evolusi lebih cepat dibandingkan dengan *coding region* (Beebe & Saul, 1995). Karakter tersebut telah dieksploitasi oleh beberapa peneliti untuk mengembangkan diagnosis spesies berbasis PCR.

Metode PCR RFLP yang dikembangkan dalam penelitian ini

diharapkan lebih murah dikarenakan untuk isolasi DNA dengan metode Li *et al.*, (2005) hanya digunakan buffer ekstraksi TE (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA) dan tidak diperlukan bahan-bahan kimia lainnya. Demikian juga bahan kimia PCR dari Fermentas lebih murah jika dibandingkan dengan produk lain seperti Promega dan Invitrogen. Metode ini dapat digunakan secara cepat dikarenakan dalam proses isolasi DNA dapat dilakukan relatif

mudah dan hanya memerlukan waktu sekitar 30 menit. Pertimbangan ini penting mengingat dalam melakukan identifikasi spesies pada umumnya menggunakan sampel nyamuk dalam jumlah besar.

### Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih ditujukan kepada DIKTI melalui dana hibah penelitian mahasiswa program doktor sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi U. F. 2005. *Manajemen Penyakit Berbasis Wilayah*. Penerbit Buku Kompas Jakarta.
- Beebe N. W and A. Saul. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 53:478-481.
- Beebe N.W., D. Cooper, D.A. Morrison and J.T Ellis. 2000. A phylogenetic study of *Anopheles punctulatus* group of malaria vectors comparing rDNA sequence alignments derived from mitochondrial and nuclear small ribosomal subunits. *Mol Phylogenet Evol.* 17:430-436.
- Benet A., A. Mai, F. Bockarie, M. Lagog, P. Zimmerman, M.P. Alpers, J.C. Reeder, and M.J. Bockarie. 2004. Polymerase Chain Reaction Diagnosis and the Changing Pattern of Vector Ecology and Malaria Transmission Dynamic in Papua New Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71(3) : 277-284.
- Collins, F.H., M.A., Mendez, M.O. Rasmussen, P.C. Mehhaffey, N.J. Bensansky and Finnerty. 1987. A ribosomal gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Parasitol.* 81:151-161.
- Collins, F.H., and S.M. Paskewits. 1996. A review of the use ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect molecular biology.* 5(1): 1-9.
- Dabert M. 2006. DNA Marker in the phylogenetics of Acari. *Biological Lett.* 43(2):97-107.
- Li C, J.S. Lee, J.L. Groebner, H.C. Kim, T.A. Klein, M.L, O'Guinn and R.C. Wilkerson. 2005. A newly recognized in *Anopheles hyrcanus* group and molecular identification of the related spesies from the Republic South Korea (Diptera: Culicidae). *Zootaxa.* 939:1-8.
- Li C. and R.C. Wilkerson. 2006. Intragenomic rDNA ITS2 Variation in the Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Heredity*, doi:10.1093/jhered/esl037.
- Naddaf S.R. M.A. Oshaghi, H. Vatandoost, and M. Assmar. 2003. Molecular characterization of *Anopheles fluviatis* species

- complex in the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 9(3):257-265.
- Oshaghi M.A., Shemshad K., Yaghobi-Ershadi M.R., Vatandosst H., Abaie M.R. and Amani H., 2005, Ribosomal DNA-ITS2 Genotypes of the Malaria vector *Anopheles superpictus* (Diptera : Culicidae) from Iran, *Acta Medica Iranica*. 45(4) :257-263.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T.E. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup>. Cold Spring Harbon Laboratory Press New York.
- Van Bortel W., H.D.Trung, P.Roelants, R.E.Harbach, T.Backeljau, and Cososemans M., 2000. Molecular identification of *Anopheles minimus s.l.* beyond distinguishing the members of the species complex, *Insect Molecular Biology*, 9(3):335-340.