

<https://tbj.ui.ac.ir/?lang=en>

Taxonomy and Biosystematics

E-ISSN: 2322-2190

Document Type: Research Paper

Vol. 17, Issue 2, No.63, (2025), P: 17-28

Received: 27/11/2024 Accepted: 06/05/2025

Molecular identification of some Onychiuridae (Collembola: Poduromorpha) species from Iran

Maryam Salimi

MSc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources (SANRU), Sari, Iran
salami.5134@gmail.com

Masoumeh Shayanmehr * 

Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources (SANRU), Sari, Iran
m.shayanmehr@sanru.ac.ir

Mahmoud Mohammadi Sharif

Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources (SANRU), Sari, Iran
msharif1353@sanru.ac.ir

Elham Yoosefi Lafooraki

Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources (SANRU), Sari, Iran
eyoosefi@ymail.com

Abstract

The Onychiuridae family, belonging to the order Poduromorpha within the class Collembola, consists of soil-dwelling species characterized by the absence of pigmentation, ommatidia, and furca. These traits make them challenging for morphological identification. Utilizing molecular markers as a complementary approach can facilitate species identification. To date, 34 species from 14 genera have been reported from this family, with no molecular data available for the country. The present study was conducted to perform a molecular analysis of several species collected from Gilan and Isfahan provinces, using a segment of the mitochondrial gene (COI). As a result, four genera and six species from the subfamily Onychiurinae were identified based on molecular data, and the species' gene sequences were registered in NCBI. The results demonstrated that this gene was highly effective in identifying species within the Onychiuridae family. The monophyletic status of the studied genera was confirmed through molecular data. Additionally, the morphological features used to differentiate the studied genera within this family were validated by the gene.

Keywords: COI gene, DNA barcoding, Onychiurinae.

Introduction

The order Poduromorpha, comprising eight families, represents the most diverse and abundant group of arthropods within the class Collembola (Bellinger et al., 2025). Among these, the family Onychiuridae with 53 genera and 765 species worldwide ranks as the second-largest. The first record of Onychiuridae in Iran dates back to the work of Cox (1982). Subsequent studies, including a checklist by Shayanmehr et al. (2013), added only two species to Cox's initial findings. However, recent years have seen increased research interest, leading to the discovery of several new species (Arbea & Kahrarian, 2017; Kaprus' et al., 2017; Yahyapour et al., 2020; Ahmadi et al., 2023). According to the latest checklist of

*Corresponding author

Salimi, M., Shayanmehr, M., Mohammadi Sharif, M. and Yoosefi Lafooraki, E. (2025). Molecular identification and taxonomic key for Onychiuridae (Collembola: Poduromorpha) of Iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 17(2), 17-28.

2322-2190 © The Author(s).

Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC BY-NC 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>).



<http://dx.doi.org/10.22108/tbj.2025.143520.1288>

Poduromorpha in Iran, the family Onychiuridae now includes 34 species from 14 genera (Shayanmehr et al., 2023). Accurate species identification within Onychiuridae remains challenging due to incomplete taxonomic keys, a shortage of specialists, and logistical difficulties in sending samples abroad. To overcome these limitations, DNA barcoding can serve as a valuable complement to traditional morphological methods. Recent advances in molecular biology have greatly enhanced Collembola systematics, with mitochondrial and nuclear genomes providing key insights into evolutionary relationships (Carapelli et al., 2005; Porco et al., 2010; Pan, 2015; Zhang et al., 2017; Mateos et al., 2018; Potapov et al., 2018; Winkler et al., 2020). Given the scarcity of molecular data on Onychiuridae in Iran, this study aims to contribute molecular identifications of some species from this family.

Material and Methods

Springtail specimens were collected from soil and leaf litter across multiple sites in Guilan and Isfahan Provinces between 2017 and 2021. Arthropods were extracted using Berlese funnels, and Onychiuridae specimens were isolated and preserved in 70% ethanol at -20°C . For microscopic examination, specimens were cleared in 10% KOH for 2–3 minutes and mounted in Hoyer's medium (Christiansen, 1957). Species identification was performed using established taxonomic keys (Fjellberg, 1998; Yahyapour et al., 2020). Genomic DNA was extracted using the SinaClon extraction kit, following the manufacturer's instructions. The mitochondrial COI gene was amplified via PCR using primers described by Folmer et al., (1994), in a 25 μL reaction mixture consisting of 15.6 μL ddH₂O, 3 μL template DNA, 2.5 μL PCR buffer, 0.5 μL dNTPs (15 mM), 1 μL MgCl₂ (25 mM), 1 μL of each primer (10 μM), and 0.4 μL Taq polymerase (5 U/ μL , SinaClon). The thermal cycling protocol included an initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 5 cycles at 96°C for 30 seconds, 48°C for 35 seconds, and 72°C for 40 seconds, then 30 cycles at 96°C for 30 seconds, 51°C for 35 seconds, and 72°C for 40 seconds, with a final extension at 72°C for 6 minutes. Forward strand Sanger sequencing was performed by Microsynth (Switzerland). The obtained sequences were aligned in MEGA version 6 (Tamura et al., 2013), and genetic divergence was calculated. A Neighbor-Joining phylogenetic tree with 10,000 bootstrap replicates was constructed using IQ-TREE version 1.6.12, incorporating both newly obtained sequences and GenBank references (Nguyen et al., 2015).

Research findings

In this study, four genera and six species belonging to the subfamily Onychiurinae were collected and identified as follows: *Heteraphorura iranica* Kaprus' et al., 2017, *Orthonychiurus stachianus* (Bagnall, 1939), *Protaphorura fimata* (Gisin, 1952), *P. levantina* (Christiansen, 1956), *P. sakatoi* (Yosii, 1966), and *Thalassaphorura encarpata* (Denis, 1931). The species *T. encarpata*, *H. iranica*, and *P. levantina* represent new records for Gilan Province, while *P. sakatoi* is reported from Isfahan Province for the first time. Eight COI gene sequences from the family Onychiuridae were obtained, corresponding to *H. kaprusi*, *H. cf. iranica*, and *P. cf. sakatoi*. These sequences were deposited in GenBank under accession numbers OR887479–OR887484 and OR887488–OR887489, marking the first submissions for these species. A phylogenetic tree was reconstructed using the Neighbor-Joining method with 10,000 bootstrap replicates, combining the eight new sequences with 17 reference sequences from GenBank (Figure 1). The analysis included representatives of *Heteraphorura*, *Thalassaphorura*, *Protaphorura*, and *Deuteraphorura*, all of which formed well-supported monophyletic clades. *Deuteraphorura* species were placed as a sister group to the other genera, distinguished by the absence of a terminal spine on abdominal segment VI. The COI gene provided strong species-level resolution, with 100% bootstrap support for all Onychiuridae lineages, including *Heteraphorura* sp., *H. cf. iranica*, *Thalassaphorura biquatemata*, and *Protaphorura* spp.

Discussion of Results & Conclusion

Our investigation of the Onychiuridae springtail fauna in Guilan and Isfahan provinces yielded four genera and six species. We obtained eight COI sequences representing two genera (*Heteraphorura* and *Protaphorura*), including the first submissions to GenBank for *Heteraphorura kaprusi*, *H. cf. iranica*, and *Protaphorura cf. sakatoi*. The COI-based phylogenetic tree strongly supported the monophyly of the four examined genera (*Heteraphorura*, *Thalassaphorura*, *Protaphorura*, and *Deuteraphorura*), and key morphological diagnostic characters were confirmed by molecular data. The COI marker proved effective for species-level identification within Onychiuridae. This study represents the first molecular investigation of this family in Iran. Given the current scarcity of molecular data on Iranian Onychiuridae, it is necessary to conduct further studies using COI gene sequences for other species of this family, as well as additional molecular markers. These efforts will help clarify interspecific relationships and enhance our understanding of the diversity of this family in Iran.

Acknowledgment

This study presents a part of the first author's M.Sc. thesis conducted at Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The authors gratefully acknowledge the financial and institutional support that made this research possible.

شناسایی مولکولی برخی از گونه‌های پادمان خانواده Onychiuridae (Collembola: Poduromorpha) در ایران

مریم سلیمی، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
salami.5134@gmail.com

معصومه شایان‌مهر* ، دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
m.shayanmehr@sanru.ac.ir

محمود محمدی‌شریف، دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
msharif1353@sanru.ac.ir

الهام یوسفی‌لفورکی، استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
eyoosefi@ymail.com

چکیده

خانواده Onychiuridae (Poduromorpha) شامل گونه‌های سفید رنگ، بدون چشم و فورکا است که بیشتر ساکن لاشبرگ و خاک هستند. این ویژگی‌ها شناسایی گونه‌ها را براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشکل می‌کند. استفاده از مارکرهای مولکولی به عنوان روش مکمل، شناسایی گونه‌ها را می‌تواند ساده‌تر کند. از این خانواده تاکنون ۳۴ گونه متعلق به ۱۴ جنس از ایران معرفی شده و تاکنون هیچ داده مولکولی در کشور ثبت نشده است. به همین منظور در این مطالعه، بررسی مولکولی برخی گونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های گیلان و اصفهان، با استفاده از بخشی از ژن میتوکندریایی (COI) انجام شد. در این مطالعه تعداد ۸ توالی از دو جنس و سه گونه متعلق به زیرخانواده Onychiurinae به دست آمد و برای اولین بار در بانک ژن ثبت شد. نتایج نشان دادند این ژن به خوبی قادر به شناسایی گونه‌های خانواده Onychiuridae بود. وضعیت تک تباری جنس‌های مورد مطالعه توسط داده‌های مولکولی تأیید شد. همچنین ویژگی‌های شکل‌شناسی استفاده شده در تفکیک جنس‌های مورد مطالعه این خانواده توسط این ژن تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: ژن COI، DNA بارکدینگ، Onychiurinae

* مسئول مکاتبات

سلیمی، مریم، شایان‌مهر، معصومه، محمدی‌شریف، محمود و یوسفی‌لفورکی، الهام. (۱۴۰۴). شناسایی مولکولی و ارائه کلید شناسایی برای گونه‌های پادمان خانواده Onychiuridae (Collembola: Poduromorpha) در ایران. تاکسونومی و بیوسیستماتیک، ۱۷ (۲)، ۱۷-۲۸.



۱- مقدمه

راسته Poduromorpha با داشتن ۸ خانواده، متنوع‌ترین و فراوان‌ترین بندپایان در رده پادمان هستند (Bellinger et al., 2025). از این راسته تاکنون، ۱۳۸ گونه متعلق به ۴۸ جنس و ۷ خانواده گزارش شده است که خانواده Hypogastruridae با بیش از ۳۷ گونه فراوان‌ترین خانواده است (Yoosefi Lafooraki & Shayanmehr, 2015b; Salimi et al., 2022; Shayanmehr et al., 2023). از خانواده Tullbergidae که شباهت نزدیکی به خانواده Onychiuridae دارد نیز تنها ۱۴ گونه از ایران گزارش شده است (Shayanmehr & Yoosefi Lafooraki, 2024). خانواده Onychiuridae با ۵۳ جنس و ۷۶۵ گونه، دومین خانواده بزرگ در راسته Poduromorpha است و شامل سه زیرخانواده Onychiurinae با ۴۸ جنس و ۷۵۹ گونه، Tetrodontophorinae با ۳ جنس و ۴ گونه و Lophognathellinae با ۲ جنس و ۲ گونه است (Bellinger et al., 2025). زیرخانواده Onychiurinae با ۱۳ جنس و ۳۳ گونه، تاکنون دارای بیشترین فراوانی در بین گونه‌های شناسایی شده در کشور است (Shayanmehr et al., 2023). فقدان رنگ‌دانه، چشم و فورکا از مهم‌ترین ویژگی‌های این خانواده است. همچنین دیگر ویژگی‌های این خانواده وجود حفره‌های جلدی به نام چشم‌های دروغین است که درواقع بخش‌های کوچکی از کوتیکول نازک‌شده برای خروج مایع دفاعی هستند. اعضای این خانواده معمولاً در عمق‌های مختلف خاک و خاک‌برگ فعالیت دارند؛ اما در مکان‌های دیگر از جمله زیر سنگ‌ها یا چوب‌های درحال پوسیدن نیز یافت می‌شوند (Hopkin, 1997).

اولین گزارش از خانواده Onychiuridae در ایران مربوط به مطالعه‌ای است که توسط Cox (1982) در تعدادی از استان‌های کشور در زمینه شناسایی فون پادمان انجام شد و ۷ گونه از این خانواده گزارش شد. در فهرستی که Shayanmehr et al. (2013) از گونه‌های پادمان ایران ارائه کردند، تنها دو گونه به گونه‌های گزارش شده توسط کاکس اضافه شد. در سال‌های بعد خانواده Onychiuridae بیشتر درخور توجه پژوهشگران قرار گرفت؛ به‌طوری که در سال‌های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۷ چهار گونه جدید از این خانواده برای اولین بار از ایران توصیف شد (Ghazi & Shayanmehr, 2016; Kahrarian et al., 2016; Arbea & Kahrarian, 2017; Kaprus et al., 2017). در سال ۲۰۱۹ تعداد ۸ جنس و ۱۴ گونه از غرب ایران گزارش شد (Kahrarian, 2019) و در سال ۲۰۲۰ فهرستی که توسط شایانمهر و همکاران برای گونه‌های پادمان ایران ارائه شد، خانواده Onychiuridae شامل ۱۴ جنس و ۲۸ گونه بود. در همین سال ۵ گونه متعلق به ۴ جنس از این خانواده از جنگل‌های استان مازندران جمع‌آوری و توصیف شدند (Yahyapour et al., 2020). مطالعه‌ای نیز برای بررسی فون پادمان جنگل‌های بلوط و توده‌های سوزنی برگ شهرستان مریوان واقع در غرب استان کردستان انجام شد که یک گونه دیگر به فون خانواده Onychiuridae در ایران اضافه کرد (Ahmadi et al., 2023). طبق آخرین فهرستی که برای پادمان راسته Poduromorpha در ایران ارائه شد، از خانواده Onychiuridae ۳۴ گونه متعلق به ۱۴ جنس معرفی شد (Shayanmehr et al., 2023). با توجه به نقش و اهمیت پادمان در چرخه زیستی طبیعت (Chahartaghi et al., 2005) لازم است از فون آنها اطلاعات دقیقی داشته باشیم؛ بنابراین، شناسایی و معرفی این رده از بندپایان در نواحی مختلف کشور الزامی است. شناسایی دقیق گونه‌های خانواده Onychiuridae به دلیل عدم دسترسی به کلید شناسایی کامل و معتبر، کمبود متخصص‌های مجرب و مشکلات موجود در رابطه با ارسال نمونه‌ها به خارج از

کشور، با مشکلات متعددی روبرو است؛ بنابراین، در کنار بررسی‌های شکل‌شناسی مطالعات مولکولی با استفاده از تکنیک بارکدینگ می‌تواند به حل مشکلات مربوط به شناسایی نمونه‌ها کمک کند. با ظهور تکنیک‌های جدید در علم زیست‌شناسی مولکولی، سیستماتیک مولکولی پادمان طی سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است. ژنوم میتوکندری و هسته بارها برای تعیین روابط فرگشتی بین گروه‌های مختلف پادمان استفاده شدند و اطلاعات ارزشمندی در این زمینه ارائه شده است. بارکد گذاری DNA برای کامل کردن تاکسونومی شکل‌شناسی در چندین جنس از جمله *Isotomurus*, *Tomocerus*, *Protaphorura*, *Lepidobrya*, *Homidia*, *Heteromurus*, *Deutonura* و *Thalassaphorura* استفاده شده است (Carapelli et al., 1995, 2001b; 2005; Porco et al., 2010; Lukić et al., 2015; Pan, 2015; Sun et al., 2017; Yu et al., 2017; Zhang et al., 2017; Mateos et al., 2018; Potapov et al., 2018; Sun et al., 2018; Winkler et al., 2020). از آنجا که اطلاعات مولکولی چندانی از خانواده Onychiuridae در ایران در دسترس نیست، در پژوهش حاضر، شناسایی مولکولی چند گونه از پادمان این خانواده در ایران ارائه شده است.

۲- مواد و روش

جمع‌آوری و شناسایی گونه‌ها براساس صفات شکل‌شناسی

به‌منظور شناسایی گونه‌های پادمان خانواده Onychiuridae، از مناطق مختلف در استان گیلان و فضا‌هایی سبز داخل شهر اصفهان (استان اصفهان)، نمونه‌برداری‌هایی از خاک و لاش‌برگ در سال‌های ۱۳۹۶ (گیلان) و ۱۴۰۰ (اصفهان) انجام شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفتند و به هر نمونه یک کد اختصاص داده شد که نشان‌دهنده اطلاعات مربوط به جمع‌آوری نمونه شامل محل نمونه‌برداری، تاریخ و زیستگاه بود. این اطلاعات به همراه کد مربوطه در یک دفترچه یادداشت شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و در قیف برلیز قرار گرفتند. بعد از گذشت ۳ تا ۴ روز، بندپایان موجود در نمونه‌ها، استخراج و از بین آنها پادمان جداسازی شد. در مرحله بعد نمونه‌های متعلق به خانواده Onychiuridae با مشاهده زیر دستگاه استریومیکروسکوپ از سایر پادمان تفکیک شدند. نمونه‌ها در میکروتیوب‌های حاوی الکل ۷۰ درصد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای شناسایی و تشخیص نمونه‌های این خانواده در سطح جنس و گونه اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شد. برای دیدن بهتر موها و چشم‌های کاذب روی سر و بدن، نمونه‌ها به مدت ۲-۳ دقیقه در محلول پتاس ۱۰ درصد قرار گرفتند (Christiansen, 1957). شناسایی نمونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد (Fjellberg, 1998; Yahyapour et al., 2020).

شناسایی مولکولی

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج سیناکلون و براساس دستورالعمل موجود در کیت انجام شد. از نشانگر میتوکندریایی COI برای شناسایی مولکولی گونه‌ها استفاده شد. برای تکثیر این قطعه از ژنوم میتوکندریایی از جفت آغازگرهای (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' LCO1490 به‌عنوان آغازگر مستقیم و (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAATCA-3' HCO2198 به‌عنوان آغازگر معکوس استفاده شد

(Folmer et al., 1994). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش شامل ۱۵/۶ میکرولیتر ddH₂O، ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۵ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر MgCl₂ (۲۵ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار) و ۰/۴ میکرولیتر آنزیم TaqPolymerase (۵ واحد بر میکرولیتر، شرکت سیناکلون) بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه COI در دستگاه ترموسایکلر در شرایط زیر انجام شد: ۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه انجام شد. توالی‌یابی با استفاده از آغازگر مستقیم، توسط شرکت میکروسینس سوئیس و به روش سنگر انجام شد. به منظور همتراز کردن توالی‌ها و محاسبه میزان اختلاف ژنتیکی بین ژن‌ها از نرم‌افزار MEGA v.6 استفاده شد (Tamura et al., 2013). همترازی توالی‌ها با الگوریتم ماسل انجام شد. درخت فیلوژنی به روش اتصال همسایه با ۱۰۰۰۰ بار تکرار با استفاده از نرم‌افزار iqtree (version 1,6,12) ترسیم شد (Nguyen et al., 2015). در ترسیم درخت فیلوژنی علاوه بر توالی‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش، از توالی‌های بانک ژن نیز استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

در این پژوهش ۴ جنس و ۶ گونه متعلق به زیرخانواده Onychiurinae جمع‌آوری و شناسایی شدند. گونه‌های *Heteraphorura iranica* Kaprus' et al., 2017، *Thalassaphorura encarpata* (Denis, 1931) و *Protaphorura sakatoi* (Christiansen, 1956) برای اولین بار از استان گیلان و گونه *Protaphorura levantina* (Yosii, 1966) برای اولین بار از اصفهان گزارش شدند. در ادامه، اطلاعات جمع‌آوری و مناطق انتشار گونه‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق و بررسی مولکولی گونه‌ها و روابط فیلوژنی ارائه می‌شود.

جنس *Heteraphorura* Bagnall, 1948

گونه *Heteraphorura iranica* Kaprus' et al., 2017

اطلاعات جمع‌آوری: ۱۰ نمونه از این گونه از سلانسر واقع در شهرستان رودبار استان گیلان (طول جغرافیایی ۷° ۴۹° ۲۲' شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷° ۰۱' ۴۷" شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۳، دو گونه از روستای امامزاده ابراهیم واقع در شهرستان شفت استان گیلان (طول جغرافیایی ۳۱° ۱۹' ۴۹° شرقی، عرض جغرافیایی ۳۶° ۵۹' ۴۷" شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۳ و ۱۰ گونه از جنگل کاج روستای اسکولک واقع در شهرستان رودبار استان گیلان (طول جغرافیایی ۳۴° ۳۴' ۵۸" شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷° ۰۰' ۴۵" شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۳ جمع‌آوری شدند.

مناطق انتشار: این گونه اولین بار از استان کرمانشاه گزارش شده بود و برای اولین بار از استان گیلان گزارش

می‌شود (Kaprus et al., 2017; Shayanmehr et al., 2023).

جنس *Orthonychiurus* Stach, 1954**گونه *Orthonychiurus stachianus* (Bagnall, 1939)**

اطلاعات جمع‌آوری: ۱۰ نمونه از این گونه از پارک جنگلی ناژوان واقع در استان اصفهان (طول جغرافیایی ۳۷° ۳' ۵۱° شرقی، عرض جغرافیایی ۳۸° ۳۸' ۱۴" شمالی) در تاریخ ۱۴۰۰/۹/۲۵ و ۸ گونه از سلانسر واقع در شهرستان رودبار استان گیلان (طول جغرافیایی ۲۲° ۲۲' ۷" شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷° ۱' ۴۷" شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۳ جمع‌آوری شدند.

مناطق انتشار: گونه *Orthonychiurus stachianus* (Bagnall, 1939) قبلاً از استان‌های کرمانشاه، مازندران (بابل) و تهران گزارش شده بود و برای اولین بار از استان اصفهان و گیلان گزارش می‌شود (Shayanmehr et al., 2023).

جنس *Protaphorura* Absolon, 1901**گونه *Protaphorura fimata* (Gisin, 1952)**

اطلاعات جمع‌آوری: ۱۰ نمونه از این گونه از پارک جنگلی ناژوان واقع در استان اصفهان (طول جغرافیایی ۳۷° ۳' ۵۱° شرقی، عرض جغرافیایی ۳۸° ۳۸' ۱۴" شمالی) در تاریخ ۱۴۰۰/۹/۲۵ جمع‌آوری شدند.

مناطق انتشار: گونه *Protaphorura fimata* (Gisin, 1952) قبلاً از استان‌های مرکزی، گیلان، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، زنجان، اصفهان، مازندران، تهران، کرمانشاه و لرستان گزارش شده بود (Shayanmehr et al., 2023).

گونه *Protaphorura levantina* (Christiansen, 1956)

اطلاعات جمع‌آوری: ۱۰ نمونه از این گونه از جنگل کاج روستای اسکولک واقع در شهرستان رودبار استان گیلان (طول جغرافیایی ۳۴° ۳۴' ۵۸" شرقی، عرض جغرافیایی ۳۷° ۰' ۴۵" شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۳ و ۱۱ گونه از جنگل کاج واقع در شهرستان رودبار استان گیلان (طول جغرافیایی ۲۵° ۲۵' ۵۹" شرقی، عرض جغرافیایی ۴۹° ۱۰' ۳۶" شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۳ جمع‌آوری شدند.

مناطق انتشار: این گونه اولین بار از استان کرمانشاه گزارش شده بود و برای اولین بار از استان گیلان گزارش می‌شود (Kahrarian et al., 2016; Shayanmehr et al., 2023).

گونه *Protaphorura sakatoi* (Yosii, 1966)

اطلاعات جمع‌آوری: ۱۰ نمونه از این گونه از پارک جنگلی ناژوان واقع در استان اصفهان (طول جغرافیایی ۳۷° ۳' ۵۱° شرقی، عرض جغرافیایی ۳۸° ۳۸' ۱۴" شمالی) در تاریخ ۱۴۰۰/۹/۲۵ جمع‌آوری شدند.

مناطق انتشار: این گونه قبلاً از استان مازندران گزارش شده بود و برای اولین بار از استان اصفهان گزارش می‌شود (Yoosefi Lafooraki & Shayanmehr, 2015a; Shayanmehr et al., 2023).

جنس *Thalassaphorura* Bagnall, 1949گونه *Thalassaphorura encarpata* (Denis, 1931)

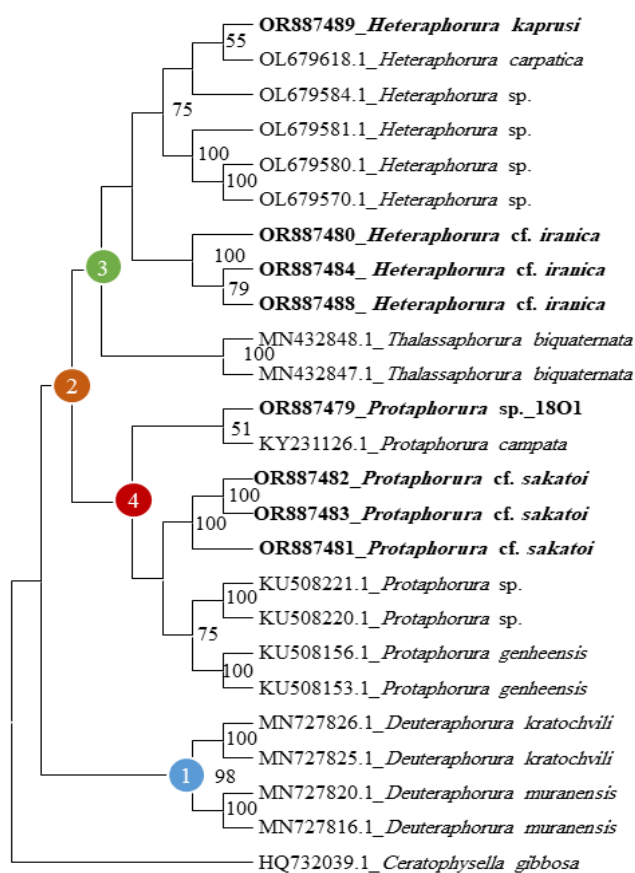
اطلاعات جمع‌آوری: تنها یک نمونه از این گونه از شهر چوبر واقع در استان گیلان (طول جغرافیایی $49^{\circ} 22' 49''$ شرقی، عرض جغرافیایی $37^{\circ} 7' 0''$ شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۴، گونه از امامزاده ابراهیم واقع در شهرستان شفت استان گیلان (طول جغرافیایی $49^{\circ} 19' 31''$ شرقی، عرض جغرافیایی $36^{\circ} 59' 47''$ شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۴ و ۵ گونه از جاده ماسوله واقع در فومن استان گیلان (طول جغرافیایی $49^{\circ} 9' 23''$ شرقی، عرض جغرافیایی $37^{\circ} 10' 51''$ شمالی) در تاریخ ۱۳۹۶/۱۲/۱۵ جمع‌آوری شد.

مناطق انتشار: این گونه قبلاً از استان مازندران گزارش شده بود و برای اولین بار از استان گیلان گزارش می‌شود (Yoosefi Lafooraki & Shayanmehr, 2015a; Shayanmehr et al., 2023).

شناسایی مولکولی و فیلوژنی

در این پژوهش ۸ توالی از ژن COI متعلق به خانواده Onychiuridae به دست آمد. این توالی‌ها مربوط به گونه‌های *Heteraphorura kaprusi* H. cf. *iranica* و *Protaphorura* cf. *sakatoi* هستند که برای اولین بار و با شماره دسترسی‌های OR887479-OR887484 و OR887488-OR887489 در بانک ژن ثبت شدند.

درخت فیلوژنی خانواده Onychiuridae با استفاده از ۸ توالی به دست آمده در پژوهش حاضر و ۱۷ توالی استخراج شده از بانک ژن به روش اتصال همسایه با تکرار ۱۰۰۰۰ بوت استرپ رسم شد (شکل ۱). در این درخت، گونه *Ceratophysella gibbosa* به عنوان برون گروه تعیین شد. توالی‌های استفاده شده از خانواده Onychiuridae در این مطالعه از جنس‌های *Heteraphorura*، *Thalassaphorura*، *Proaphorura* و *Deuteraphorura* هستند که وضعیت تک تباری این جنس‌ها در درخت فیلوژنی رسم شده براساس ژن COI مورد حمایت است. این درخت فیلوژنی به دو کلاد اصلی تقسیم شده است. کلاد شماره ۱، شامل گونه‌های جنس *Deuteraphorura* است که به شکل خاوه‌ری نسبت به سایر جنس‌های این خانواده قرار گرفته است. مهم‌ترین تفاوت این جنس با جنس‌های دیگر این درخت فیلوژنی، عدم وجود خار انتهایی روی بند ششم شکم در این جنس است. در کلاد شماره ۲، توالی‌های مربوط به جنس *Protaphorura* (کلاد ۴) به شکل خاوه‌ری نسبت به توالی‌های مربوط به دو جنس *Thalassaphorura* و *Heteraphorura* (کلاد ۳) قرار گرفته است. ویژگی مهمی که جنس *Protaphorura* را از دو جنس دیگر متمایز می‌کند، تبدیل شدن فورکا به یک تاخوردگی کوچک و منفرد است که در دو جنس دیگر دیده نمی‌شود. همچنین در این درخت فیلوژنی، ژن COI با بالاترین بوت استرپ (۱۰۰ درصد) گونه‌های خانواده Onychiuridae را شناسایی کرد (*Protaphorura* sp.)، *Heteraphorura*، *H. cf. iranica*، *Thalassaphorura biquatemata*، *Protaphorura* cf. *sakatoi*، *Deuteraphorura gibbosa*، *P. genheensis*، *Protaphorura* sp.).



شکل ۱- درخت فیلوژنی Neighbour Joining پادمان خانواده Onychiuridae از ایران و چند کشور دیگر مربوط به ژن COI؛ اعداد مشکی نشان‌دهنده میزان بوت‌استرپ (اعداد کمتر از ۵۰ حذف شدند) است. نمونه‌های مربوط به ایران با فونت پررنگ مشخص شدند و سایر نمونه‌ها مربوط به بانک ژن هستند.

Figure 1- Neighbor Joining consensus tree generated from the COI gene. Bootstrap values more than 50% are given for appropriate clades; newly obtained sequences are in bold letters, others are from GenBank (NCBI).

۴- جمع‌بندی

در نتیجه بررسی فون پادمان خانواده Onychiuridae در استان‌های گیلان و اصفهان ۴ جنس و ۶ گونه جمع‌آوری شدند. گونه‌های *Heteraphorura iranica* Kaprus' et al., 2017، *Thalassaphorura encarpata* (Denis, 1931)، *Protaphorura levantina* (Christiansen, 1956) و *P. sakatoï* (Yosii, 1966) برای اولین بار از استان اصفهان گزارش می‌شوند. در این پژوهش ۸ توالی از خانواده Onychiuridae مربوط به ژن COI به دست آمد که متعلق به دو جنس *Heteraphorura* و *Protaphorura* هستند. توالی‌ها مربوط به گونه‌های *Heteraphorura kaprusi*، *H. cf. iranica* و *Protaphorura cf. sakatoï* برای اولین بار در بانک ژن ثبت شدند. در درخت فیلوژنی رسم‌شده براساس ژن COI برای خانواده Onychiuridae، وضعیت تک‌تباری جنس‌های *Heteraphorura*، *Thalassaphorura*، *Proaphorura* و *Deuteraphorura* حمایت شده است. همچنین ویژگی‌های شکل‌شناسی که در تمایز جنس‌های این خانواده استفاده می‌شود، از جمله وجود یا عدم وجود خار انتهایی و تبدیل شدن فورکا به یک تاخوردگی کوچک و منفرد یا عدم وجود اثری از فورکا، براساس داده‌های مولکولی حاصل از ژن COI

تأیید شده است. ژن COI به عنوان یک مارکر مولکولی به خوبی قادر به شناسایی گونه‌های خانواده Onychiuridae بوده است. پژوهش حاضر اولین مطالعه مولکولی خانواده Onychiuridae در ایران است. با توجه به اینکه از لحاظ مولکولی این خانواده در ایران شناخته شده نیست، لازم است در آینده مطالعات بیشتری با استفاده از توالی‌های ژن COI مربوط به گونه‌های دیگر این خانواده و همچنین ژن‌های دیگری انجام شود تا به درک بهتری از روابط بین گونه‌های این خانواده دست یابیم.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری است؛ بنابراین، نویسندگان مقاله به دلیل تأمین اعتبار انجام این پایان‌نامه سپاسگزاری و قدردانی می‌نمایند.

References

- Ahmadi, S., Ghojari, H., Shayanmehr, M., Mohammadi Samani, K., & Kaprus, K. (2023). Addition to Iranian springtails fauna and a checklist of the Collembola from Kurdistan province, Iran. *Journal of Insect Biodiversity and Systematics*, 19(1), 1-16. <https://doi.org/10.52547/jibs.9.1.1>
- Arbea, J. I., & Kahrarian, M. (2017). New data on the Onychiurinae (Collembola: Poduromorpha) of Iran, with description of one new species. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 60, 141-151.
- Bellinger, P.F., Christiansen, K.A., & Janssens, F. (2025). *Checklist of the Collembola of the World*. Available at: <http://www.collembola.org> On 28 November 2024.
- Carapelli, A., Fanciulli, P.P., Frati, F., & Dallai, R. (1995). The use of genetic markers for the diagnosis of sibling species in the genus *Isotomurus* (Insecta, Collembola). *Bolletino de Zoologia*, 62(1), 71-76. <https://doi.org/10.1080/11250009509356053>
- Carapelli, A., Frati, F., Fanciulli P.P., & Dallai, R. (2001). Taxonomic revision of 14 south-western European species of *Isotomurus* (Collembola, Isotomidae), with description of four new species and the designation of the neotype for *I. palustris*. *Zoologica Scripta*, 30(2), 115-143. <https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.2001.00055.x>
- Carapelli, A., Frati, F., Fanciulli, P.F., Nardi F., & Dallai, R. (2005). Assessing species boundaries and evolutionary relationships in a group of south-western European species of *Isotomurus* (Collembola, Isotomidae) using allozyme data. *Zoologica Scripta*, 34(1), 71-79. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00174.x>
- Chahartaghi, M., Langel, R., Scheu, S., & Ruess, L. (2005). Feeding guilds in Collembola based on nitrogen stable isotope ratios. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(9), 1718-1725. <http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.006>
- Christiansen, K. (1957). The Collembola of Lebanon and western Syria. Part II. *Psyche*, 64(3), 77-89. <http://doi.org/10.1155/1956/62859>
- Cox, P. (1982). The Collembola fauna of north and north western Iran. *Entomologist's Monthly Magazine*, 118, 39-43.
- Fjellberg, A. (1998). *The Collembola of Fennoscandia and Denmark*, Part I: Poduromorpha. Brill.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Ghazi, F., & Shayanmehr, M. (2016). New records of Onychiuridae for Collembola fauna from Tehran city. *Taxonomy and Biosystematics*, 8(28), 101-116. <https://doi.org/10.22108/tbj.2016.21306> [In Persian].

- Hopkin, P.S. (1997). *Biology of Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University press Inc.
- Kahrarian, M. (2019). The checklist of Collembola (Hexapoda, Arthropoda) from the west part of Iran. *Journal of Insect Biodiversity and Systematics*, 5(1), 33-47. <http://dx.doi.org/10.52547/jibs.5.1.33>
- Kahrarian, M., Karpus, I., Vafaei Shoshtar, Reza., & Shayanmehr, M. (2016). New records of Onychiurinae (Collembola: Onychiuridae) for the Iranian Springtail fauna. *Journal of Insect Biodiversity and Systematics*, 2(2), 219-228. <https://jibs.modares.ac.ir/article-36-8630-en.html>
- Karpus, I., Shayanmehr, M., Kahrarian, M., & Yoosefi Lafooraki, E. (2017). Three new species of Onychiuridae Lubbock, 1871 (Collembola, Poduromorpha) from Iran. *Zootaxa*, 4291(2), 335-346. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4291.2.6>
- Lukić, M., Porco, D., Bedos, A., & Deharveng, L. (2015). The puzzling distribution of *Heteromurus* (Verhoeffiella) absoloni Kseneman, 1938 (Collembola: Entomobryidae: Heteromurinae) resolved: Detailed redescription of the nominal species and description of a new species from Catalonia (Spain). *Zootaxa*, 4039(2), 249-275. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4039.2.3>
- Mateos, E., Escuer, P., Buşmachi, G., Riutort, M. & Álvarez-Presas, M. (2018). Untangling *Lepidocyrtus* (Collembola, Entomobryidae): new molecular data shed light on the relationships of the European groups. *Invertebrate Systematics*, 32, 639-65. <https://doi.org/10.1071/IS17056>
- Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A. & Minh, B.Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Pan, Z. X. (2015). Two closely related *Homidia* species (Entomobryidae, Collembola) revealed by morphological and molecular evidence. *Zootaxa*, 3918(2), 285-294. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3918.2.9>
- Porco, D., Rougerie, R., Deharveng, L., & Hebert, P.D.N. (2010). Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied Arthropods in a highthroughput context: the example of Collembola. *Molecular Ecology Resources*, 10(6), 942-945. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.2839.x>
- Potapov, M., Porco, D., & Deharveng, L. (2018). A new member of the genus *Isotomurus* from the Kuril Islands (Collembola: Isotomidae): returning to the problem of “colour pattern species”. *Zootaxa*, 4394(3), 383-394. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4394.3.4hal-01835310>
- Salimi, M., Shayanmehr, M., Mohammadi Sharif, M., & Yoosefi Lafooraki, E. (2022). Identification key for the hypogastruridae family (Hexapoda: Collembola) in iran. *Taxonomy and Biosystematics*, 14(52), 107-126. <https://doi.org/10.22108/tbj.2023.135818.1217> [In Persian].
- Shayanmehr, M., Yahyapour, E., Kahrarian, M., & Yoosefi Lafooraki, E. (2013). An introduction to Iranian Collembola (Hexapoda): an update to the species list. *Zookeys*, 335, 69-83. <https://doi.org/10.3897/zookeys.335.5491>
- Shayanmehr, M., & Yoosefi Lafooraki, E. (2024). First report of the genus *Neonaphorura* Bagnall (Collembola: Tullbergiidae) for Iran with an identification key for Tullbergiidae. *Taxonomy and Biosystematics*, 16(58), 33-46. <https://doi.org/10.22108/tbj.2024.141383.1261> [In Persian].
- Shayanmehr, M., Karpus, I., Yahyapour, E., Yossefi Lafooraki, E., & Ghajar Sepanlou, M. (2023). Checklist of Collembola (Hexapoda) from Iran, Part I: Poduromorpha. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 16(2023), 184-196. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2023.02.003>
- Sun, X., Bedos, A., & Deharveng, L. (2018). Unusually low genetic divergence at COI barcode locus between two species of intertidal *Thalassaphorura* (Collembola: Onychiuridae). *PeerJ*, 6, e5021; <https://doi.org/10.7717/peerj.5021>.
- Sun, X., Zhang, F., Ding, Y., Davies, T.W., Li, Y., & Wu, D. (2017). Delimiting species of *Protaphorura* (Collembola: Onychiuridae): integrative evidence based on morphology, DNA sequences and geography. *Scientific Reports*, 7(1), 8261. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08381-4>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA 6: molecular

- evolutionary genetics analysis, version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Winkler, D., Mateos, E., Traser, G., Lakatos, F., & Tóth, V. (2020). New Insight into the Systematics of European *Lepidocyrtus* (Collembola: Entomobryidae) Using Molecular and Morphological Data. *Insects*, 11(5), 302. <https://doi.org/10.3390/insects11050302>
- Yahyapour, E., Shayanmehr, M., Vafaei Shoushtari, R. & Arbea, J. (2020). A review of the Iranian species of the family Onychiuridae (Collembola, Poduromorpha), with description of five new species from Hyrcanian Forests in Iran. *Zootaxa*, 4861(1), 1-22. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4861.1.1>
- Yoosefi Lafooraki, E., & Shayanmehr, M. (2015a). New addition to fauna and a checklist of the order Poduromorpha (Collembola) of Mazandaran province, Iran. *Far Eastern Entomologist*, 298, 1-10. <https://www.researchgate.net/publication/283819309>
- Yoosefi Lafooraki, E., & Shayanmehr, M. (2015b). First record of the genus *Schoettella* and three new records of the family Hypogastruridae (Collembola, Hexapoda) for fauna of Iran with an identification key for Mazandaran province. *Taxonomy and Biosystematics*, 7(23), 1-23. https://tbj.ui.ac.ir/article_17558.html [In Persian].
- Yu, D., Ding, Y., & Ma, Y. (2017). Revision of *Tomocerus similis* Chen and Ma, with discussion of the kinoshitai complex and the distal tibiotarsal chaetae in Tomocerinae (Collembola, Tomoceridae). *Zootaxa*, 4268(3), 395-410. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4268.3.5>
- Zhang, F., Greenslade, P., & Stevens, M.I. (2017). A revision of the genus *Lepidobrya* Womersley (Collembola: Entomobryidae) based on morphology and sequence data of the genotype. *Zootaxa*, 4221(5), 523-536. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4221.5.2>