دوره پانزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۳۹۸
DOI: 10.22055/ivj.2018.105207.1980

شناسایی مورفومتریک و مولکولی انگل *Gyrodactylus sprostonae* در ماهیان گرم آبی استان گیلان با نگرشی بر شدت و شیوع آن در مزارع منتخب

جواد دقیق‌روحی[۱]، عبدالحسین دلیمی‌اصل[۲*]، محمد پورکاظمی[۳]، محدث قاسمی[۴] و شکوفه شمسی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۴

چکیده

انگل ژیروداکتیلوس از شاخه‌ی کرم‌های پهن و یکی از انگل‌های خارجی شایع در ماهیان آب شیرین و دریایی است. این انگل اغلب بر روی پوست و باله‌ی ماهیان و به ندرت در آبشش آن‌ها مشاهده می‌شود. انگل ژیروداکتیلوس می‌تواند سبب ایجاد بیماری و بروز تلفات در جمعیت ماهیان پرورشی و وحشی گردد. در این مطالعه ابتدا انگل ژیروداکتیلوس با استفاده از گسترش مرطوب از پوست، باله و آبشش ماهی کپور معمولی، کپور نقره‌ای و سرگنده در مزارع پرورش ماهی استان گیلان جدا و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد. شناسایی مورفومتریک انگل‌ها با اندازه‌گیری و ترسیم بخش‌های سخت اپیستهاپتور از قبیل قلاب مرکزی، قلابک‌های حاشیه‌ای، میله‌ی پشتی و میله‌ی شکمی صورت گرفت. برای بررسی مولکولی گونه‌ی انگل ژیروداکتیلوس، پرایمر فوروارد، در ناحیه‌ی ۵/۸s ژن RNA ریبوزومی و پرایمر ریورس در ناحیه‌ی ITS2 ژن ریبوزومی برای تکثیر DNA گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس به روش PCR استفاده شد. سپس توالی به دست آمده از محصول PCR با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI مقایسه شد. در نتیجه گونه‌ی انگل ژیروداکتیلوس با هر دو روش مورفومتریک و مولکولی *Gyrodactylus sprostonae* شناسایی گردید. شیوع آلودگی به این انگل در مزارع مورد بررسی در استان گیلان برای گونه‌های کپور معمولی، کپور نقره‌ای، سرگنده و کپور علفخوار به ترتیب ۲۱/۴۲٪، ۶/۱۷٪، ۲۱/۹۵٪ و ۰٪ تعیین شد.

کلمات کلیدی: مولکولی، انگل، ژیروداکتیلوس، ماهیان گرم آبی، گیلان

مقدمه

ژیروداکتیلیدها، گروهی از مونوژن‌های زنده‌زا هستند که اغلب انگل پوست و باله‌های ماهیان آب شیرین و دریایی می‌باشند. تا کنون بالغ بر ۴۰۰ گونه از جنس *Gyrodactylus* از حدود ۴۰۰ میزبان از راسته‌ها و خانواده‌های مختلف ماهیان شناسایی شده، اما تعداد واقعی انگل‌های این جنس در دنیا بالغ بر ۲۰۰۰۰ گونه تخمین زده می‌شود (Rokicka et al. 2007). این انگل‌ها می‌توانند موجب بروز تلفات و خسارات شدید در ماهیان پرورشی و همچنین ماهیان وحشی شوند. برای مثال می‌توان به خسارات اقتصادی وارد شده به ماهی تیلاپیای نیل توسط انگل *Gyrodactylus cichlidarum* در مزارع پرورشی برخی از کشورها اشاره نمود.

ابتدایی‌ترین روش برای شناسایی گونه‌ای انگل ژیروداکتیلوس استفاده از روش ریخت‌شناسی بخش‌های

[۱] مربی پژوهشی گروه انگل‌شناسی، پژوهشکده‌ی آبزی پروری آب‌های داخلی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بندر انزلی، ایران
[۲*] استاد گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
E-mail: dalimi_a@modares.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۳] استاد گروه ژنتیک و اصلاح نژاد آبزیان، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تهران، ایران
[۴] استادیار گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده‌ی آبزی پروری آب‌های داخلی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بندر انزلی، ایران
[۵] دانشیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم جانوری و دامپزشکی، دانشگاه چارلز استارت، نیو سالت ولز، استرالیا

سخت اپیستهاپتور است (Malmberg 1970) . در این راستا شکل قلابک‌های کوچک حاشیه‌ای اهمیت زیادی در تشخیص گونه‌ای انگل ژیروداکتیلوس دارد، اما نکته‌ی مهم این است که متأسفانه شکل اندام اتصال در ژیروداکتیلوس ثابت نمی‌باشد. عواملی نظیر درجه‌ی حرارت، سن انگل، گونه‌ی میزبان و مکان جغرافیایی از جمله عوامل تأثیرگذار بر تغییرات فنوتیپیک هاپتورها هستند (Malmberg 1970, Ergens 1976, Mo 1991, 1993, Matejusova et al. 2001, Rokicka et al. 2007). به علاوه تعداد زیاد گونه‌های ژیروداکتیلوس و سایز کوچک این انگل‌ها شناسایی آن‌ها را بسیار دشوار و غیرقابل اطمینان می‌سازند.

برای رفع مشکل شناسایی نمونه‌های ژیروداکتیلوس، روش مولکولی به عنوان جایگزینی مناسب برای روش مورفومتریک معرفی شد (Cunningham 1995). جامع‌ترین مطالعه‌ی انجام شده برای شناسایی مورفولوژیکی انگل ژیروداکتیلوس در ماهیان وحشی و پرورشی آب شیرین ایران نشان داد، که ۳۳ گونه‌ی مختلف از این انگل در ماهیان مذکور حضور دارند، لیکن تا کنون تنها ۹ گونه از این انگل‌ها با اطمینان تا حد گونه شناسایی شده و شناسایی سایر گونه‌ها به ویژه گونه‌های جدا شده از ماهیان اندمیک وحشی آب‌های شیرین کشور نیاز به مطالعه‌ی دقیق‌تری دارد. محققین در آن بررسی پیشنهاد نمودند که حتماً از روش توالی‌یابی DNA برای شناسایی دقیق گونه‌ها استفاده شود (Jalali et al. 2005). تا کنون اغلب مطالعات منتشر شده در زمینه‌ی شناسایی مونوژن‌ها با استفاده از مارکرهای مولکولی ناحیه‌های 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S از DNA ریبوزومی انجام شده است. متأسفانه در کشور ما مطالعات انجام شده در مورد شناسایی مولکولی مونوژن‌ها بسیار محدود و اغلب در مورد ماهیان زینتی بوده است. از جمله مطالعات انجام شده در کشور می‌توان به شناسایی گونه‌های مختلف انگل *Dactylogyrus* spp. با استفاده از روش PCR بر روی DNA استخراجی از بافت آبشش آلوده‌ی ماهی طلایی به انگل اشاره نمود (Mozhdeganlou et al. 2011). شناسایی انگل *Gyrodactylus gurleyi* در ماهی طلایی با استفاده از خصوصیات مورفومتریک و مولکولی (Omidzahir et al. 2012)، بررسی مورفومتریک و مولکولی انگل *Gyrodactylus cichlidarum* در ماهی آکواریومی *Astronotus ocellatus* (Ebrahimzade Mousavi et al. 2013) و همچنین بررسی مولکولی انگل *Gyrodactylus kobayashi* در ماهی طلایی (Omidzahir et al. 2015) از جمله مطالعات محدود انجام شده در این زمینه‌اند.

استان گیلان با داشتن حدود ۳۳۱۶۶ مزرعه‌ی گرم آبی و تولید سالانه بالغ بر ۴۶ هزار تن پس از استان‌های خوزستان و مازندران رتبه‌ی سوم تولید ماهیان گرمابی کشور را به خود اختصاص داده است. همچنین به دلیل وجود کارگاه‌های متعدد تکثیر ماهی، بسیاری از استان‌های دیگر نیز بچه ماهیان مورد نیاز خود را از استان گیلان تهیه می‌کنند. از این روی بررسی و شناسایی دقیق انگل‌های این ماهی از یک سو به منظور کنترل و پیشگیری از شیوع آن و از سوی دیگر به جهت شناسایی دقیق فون انگلی کشور حائز اهمیت است.

بر اساس مرور پیشینه‌ی تحقیق تا کنون بررسی مولکولی انگل ژیروداکتیلوس در گونه‌های اصلی کپور ماهیان پرورشی ایران (کپور معمولی، کپور نقره‌ای، کپور سرگنده و کپور علفخوار) صورت نگرفته است. بخشی از تلفات بچه ماهیان تولیدی در مراکز تکثیر و پرورش کشور ناشی از آلودگی با انگل‌های مونوژن و به ویژه جنس *Gyrodactylus* بوده و شناسایی این گروه از انگل‌ها طبعاً به منظور مبارزه با آن‌ها لازم است. این تحقیق با هدف شناسایی دقیق گونه‌های ژیروداکتیلوس در بچه ماهیان گرم آبی استان گیلان و با فرضیه‌ی شناسایی گونه‌های جدید در این ماهیان در مقایسه با آخرین مطالعات انجام شده توسط Jalali و همکاران در سال ۲۰۰۵ با تلفیقی از روش‌های مورفومتریک و مولکولی انجام گرفت.

مواد و روش کار

این بررسی از شهریور ۹۴ تا آبان ۹۵ انجام گرفت. در مجموع ۳۵۵ عدد ماهی شامل ۱۱۲ عدد کپور معمولی، ۸۱ عدد کپور نقره‌ای، ۸۲ عدد کپور سرگنده و ۸۰ عدد آمور یک تابستانه از ۱۰ مزرعه پرورش ماهی گرم آبی در کانون‌های اصلی پرورش ماهی استان گیلان در شهرهای رشت، بندر انزلی، فومن، سنگر، شفت، صومعه‌سرا با استفاده از تور محاصره‌ای و یا تور پرتابی (ماشک) صید و همراه با آب همان مزرعه به همراه دبه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه انگل‌شناسی بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده‌ی آبزی‌پروری آب‌های داخلی بندر انزلی منتقل و در تعدادی آکواریوم مجهز به هواده نگهداری شدند (تصویر ۱).

تصویر ۱: نقشه پراکنش مزارع مورد بررسی در استان گیلان

برای بررسی نمونه‌ها ابتدا آن‌ها را زیست‌سنجی نموده و سپس از اندام‌های پوست، باله و آبشش گسترش مرطوب تهیه و توسط میکروسکوپ نوری با لنزهای 4X و 10X از نظر آلودگی به ژیروداکتیلوس بررسی گردید. در صورت مشاهده‌ی انگل ژیروداکتیلوس ابتدا نمونه توسط سوزن انسولین برداشته و روی یک لام با استفاده از محلول آمونیوم پیکرات گلیسرین (APG) تثبیت شد. به منظور ریخت‌سنجی نمونه‌ها از اپیستهاپتور انگل‌های مونته شده با استفاده از یک دستگاه میکروسکوپ مدل Nikon Eclipse 50i مجهز به دوربین دیجیتال Nikon Digital Sight DS-SM تصویر برداری شد. به منظور ریخت-سنجی نمونه‌ها از نرم‌افزار Image J برای ۱۶ اندازه‌گیری نقطه به نقطه بر روی تصاویر به دست آمده استفاده شد. داده‌های به دست آمده از اندازه‌گیری‌ها با کلیدهای شناسایی (Bykhovskaya-Pavlovskaya et al. 1962, Gussev 1985) مقایسه و شناسایی انگل انجام گرفت.

جهت بررسی مولکولی از هر نمونه ماهی آلوده یک عدد انگل ژیروداکتیلوس در یک میکروتیوب ۰/۵ ml محتوی الکل ۷۵ درصد قرار داده و تا زمان استخراج DNA در یخچال ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج شرکت یکتا تجهیز آزما (YTA Genomic DNA Extraction Mini Kit, Iran) استفاده شد. پرایمر فوروارد در ناحیه‌ی ۵/۸S ژن RNA ریبوزومی (5’-CGATCATCGGTCTCTCGAAC-3’) (Ebrahimzadeh Mousavi et al. 2013) و پرایمر ریورس اصلاح شده در ناحیه‌ی ITS2 ژن RNA ریبوزومی AD.Gy (5’-TAAAGGAAGAACCACTAGAG-3’) استفاده شد. سپس محلول‌ها در حجم نهایی ۲۵ µL آماده شد که شامل ۱۲/۵µL مسترمیکس، ۱ µL از هر پرایمر۲۰ پیکومول (Macrogen , South Korea) و ۲µL (۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) از DNA الگو بود. واکنش زنجیره-ای پلی‌مراز در ترموسایکلر (BIO-RAD, USA) و بر اساس برنامه‌ی ذیل انجام شد دناتوره شدن اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و متعاقب آن ۳۵ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سانتی-گراد و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. جهت بررسی محصول روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و سپس توسط یک دستگاه UV– الومیناتور بررسی، عکس‌برداری و ثبت گردید.

به منظور توالی‌یابی از هر یک از محصولات PCR مقدار ۲۵ µL در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و

به همراه µL ۲۰ از هر یک از پرایمرهای بالا دست و پائین دست با غلظت ۲۰ پیکومول که در تیوب‌های مجزا ریخته شده برای شرکت Macrogen, Korea ارسال گردید. نتایج دریافتی از توالی‌یابی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و پس از BLAST در بانک ژن NCBI گونه-های جداسازی شده شناسایی و ثبت ژن انجام شد.

در این مطالعه محاسبات مربوط به بررسی شیوع و شدت آلودگی انگلی به روش Bush و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام گرفت. بررسی داده‌های به دست آمده با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری SPSS (18.0) انجام پذیرفت. میانگین شدت آلودگی انگلی در فصول مختلف با استفاده از آزمون Kruskal-Wallis بررسی و از آزمون Mann-Whitney برای مقایسه جفتی تیمارها استفاده شد.

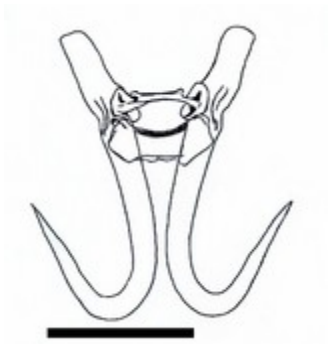
نتایج

در این بررسی از ۸۲ عدد ماهی سرگنده ۳۶۹ عدد انگل ژیروداکتیلوس جدا شد. از ۱۱۲ عدد کپور معمولی ۱۷۶ عدد و از ۸۱ عدد کپور نقره‌ای نیز ۱۹ عدد انگل ژیروداکتیلوس جدا شد. از مجموع ۸۰ عدد آمور بررسی شده در این تحقیق هیچ یک به انگل ژیروداکتیلوس آلوده نبودند. زیست‌سنجی تصاویر تهیه شده از نمونه‌های مونته شده، با استفاده از نرم‌افزار Image J و مقایسه‌ی آن با کلید شناسایی Bykhovskaya-Pavlovskaya و همکاران در سال ۱۹۶۲، گونه‌ی *Gyrodactylus sprostonae* را تأیید نمود (جدول ۱ و تصاویر ۲، ۳ و ۴).

جدول ۱: مقایسه خصوصیات مورفومتریک انگل *Gyrodactylus sprostonae* جدا شده در این بررسی (میانگین ± انحراف معیار) با نتایج Bykhovskaya-Pavlovskaya et al. 1962 (اندازه‌گیری برحسب µm)

ارگان	شاخص ها	مطالعه حاضر	Bykhovskaya Pavlovskaya (1962)
انگل	طول بدن	۲۷۷/۴۳±۷۳/۲۴ (۳۴۶/۳۲–۱۷۳/۸۵)	تا ۴۲۰
	عرض بدن	۸۵/۱۱±۸/۵۵ (۹۷/۳۳–۷۷/۶۱)	تا ۱۰۰
قلاب مرکزی	طول کل	۵۱/۰۱±۲/۱۰ (۵۴/۲۳–۴۸/۴۷)	۴۰ -۵۱
	طول ریشه	۱۶/۵۶±۱/۸۹ (۱۹/۳۲–۱۵/۵۱)	-
	طول بدنه	۳۹/۷۷±۱/۷۲ (۴۱/۷۶–۳۷/۳۳)	-
	طول راس	۲۲/۷۶±۰/۹۰ (۲۴/۰۸–۲۱/۷۰)	-
قلابک حاشیه‌ای	طول کل	۲۳/۱۲±۱/۶۵ (۲۴/۷۷–۲۰/۵۶)	۲۰ -۲۵
	طول قسمت داسی شکل	۴/۵۳±۰/۲۹ (۴/۸۸ -۴/۱۱)	-
	طول دسته قسمت داسی شکل	۱۹/۳۹±۰/۹۲ (۲۰/۶۷–۱۸/۱۲)	-
	عرض راسی قسمت داسی شکل	۳/۰۹±۰/۴۶ (۳/۷۶ -۲/۵۰)	-
	عرض قاعده‌ای قسمت داسی شکل	۳/۱۹±۰/۲۶ (۳/۴۳ -۲/۹۳)	-
میله شکمی	طول	۱۹/۷۴±۱/۲۶ (۱۸/۰۳–۲۱/۲۵)	۱۳ -۲۰
	عرض	۳/۴۲±۰/۳۸ (۳/۰۴±۳/۸۳)	۳–۴
	طول غشاء	۱۳/۳۲±۱/۰۹ (۱۲/۲۶–۱۴/۸۱)	-
میله پشتی	طول کل	۱۸/۲۳±۱/۲۱ (۱۷/۳۵–۱۹/۹۶)	۱۳ -۲۰
	عرض	۰/۹۹±۰/۱۳ (۰/۸۳۳ -۱/۱۷)	تا ۱

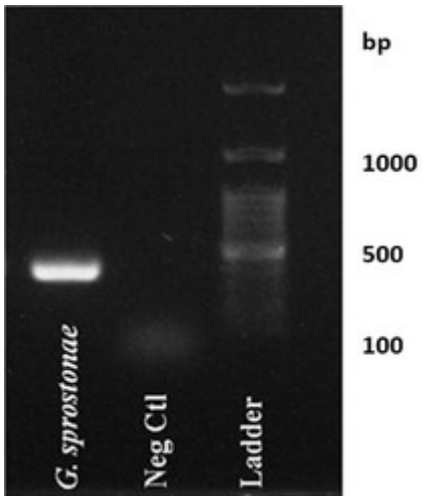
تصویر ۲: نمونه انگل *Gyrodactylus sprostonae* جداسازی شده در این بررسی (نوار مقیاس ۲۵µm)



تصویر ۳: ترسیم قلاب مرکزی انگل *Gyrodactylus sprostonae* جداسازی شده از ماهیان مورد بررسی (نوار مقیاس ۲۵µm)

تصویر ۴: ترسیم قلابک حاشیه‌ای انگل *Gyrodactylus sprostonae* جداسازی شده از ماهیان مورد بررسی (نوار مقیاس ۵µm)

پس از استخراج DNA و انجام PCR بر اساس پروتکل مذکور، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد (تصویر ۵).



تصویر ۵: الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر در ناحیه 5.8S و ITS2 ژن RNA ریبوزومی انگل *Gyrodactylus sprostonae*

با توجه به نتایج مطلوب به دست آمده نمونه‌ها جهت توالی‌یابی ارسال و نتایج دریافتی از توالی‌یابی پس از پردازش اولیه در بانک ژن NCBI مورد BLAST قرار گرفت. مقایسه‌ی نتایج توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده از انگل‌های هر سه گونه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) با سایر توالی‌های ثبت شده انگل ژیروداکتیلوس در بانک ژن NCBI مقایسه شد و با تشابه ۱۰۰ درصد گونه *Gyrodactylus sprostonae* شناسایی گردید. توالی نوکلئوتیدی به دست آمده از انگل‌های جدا شده از این ماهیان با شماره‌های Accession number MF480475.1 برای ماهی کپور معمولی، Accession number MG210580.1 برای ماهی کپور نقره‌ای و Accession number MG238547.1 برای کپور سرگنده در بانک ژن NCBI ثبت شدند.

در جدول ۲ خصوصیات زیست‌سنجی ماهیان بررسی شده به همراه میزان شیوع، میانگین شدت آلودگی و همچنین محدوده‌ی تعداد انگل *G. sprostonae* در ماهیان بررسی شده ارائه شده است.

جدول ۲: توزیع میزان شیوع، میانگین شدت آلودگی± انحراف معیار و محدوده تعداد انگل *Gyrodactylus sprostonae* در این بررسی

گونه ماهی	تعداد ماهیان	میانگین و محدوده وزن (gr)	میانگین و محدوده طول (mm)	میزان شیوع (٪)	میانگین±SE شدت آلودگی	محدوده تعداد انگل
کپور معمولی	۱۱۲	۱۹/۷ (۲ -۵۵)	۱۰۹ (۵/۷–۱۵/۸)	۲۱/۴۲	۷/۳±۳/۶	۱ -۸۶
کپور نقره‌ای	۸۱	۲۴/۵ (۵ -۴۷)	۱۴۱ (۹–۱۶/۵)	۶/۱۷	۳/۸±۲/۸	۱ -۱۵
کپور سرگنده	۸۲	۲۶/۷ (۹–۱۰۱)	۳۶ (۱۰–۲۱/۵)	۲۱/۹۵	۲۰/۵±۹/۳	۱–۱۷۷
کپور علفخوار	۸۰	۱۵/۹ (۳ -۵۹)	۱۱۴ (۶/۶ -۱۸)	–	–	–

جدول ۳: توزیع میزان شیوع ، میانگین شدت آلودگی± انحراف معیار و محدوده تعداد انگل *Gyrodactylus sprostonae* در فصول مختلف این بررسی

فصل / گونه ماهی	بهار شیوع (٪) SE±میانگین شدت دامنه	تابستان شیوع (٪) SE ±میانگین شدت دامنه	پائیز شیوع (٪) SE ±میانگین شدت دامنه	زمستان شیوع (٪) SE ±میانگین شدت دامنه
کپور معمولی	۳۱/۵۷ ^{Aa}۳±۰/۹۳ ۱–۷	۱۱/۱۱ ^{A}۱±۰ ۱	۲۲/۸۵ ^{Aa}۹/۷۵±۵/۳۴ ۱ -۸۶	–
کپور نقره‌ای	۸/۸۲ ^{Aa}۵/۶۶±۴/۶۷ ۱ -۱۵	–	۷/۱۴ ^{Aa}۱±۰ ۱	–
کپور سرگنده	۵/۲۶ ^{Aa}۱±۰ ۱	–	۴۷/۰۵ ^{Bb}۲۲/۹۳±۱۰/۴ ۳–۱۷۷	–
کپور علفخوار	–	–	–	–

* داده‌های مشخص شده با حروف متفاوت بزرگ نشانه اختلاف معنی‌دار آماری در هر ردیف است (p<۰/۰۵)

** داده‌های مشخص شده با حروف متفاوت کوچک نشانه اختلاف معنی‌دار آماری در هر ستون است (p<۰/۰۵)

بحث

جمعیت انگل ژیروداکتیلوس به دلیل قابلیت زنده‌زایی و همچنین چرخه‌ی زندگی مستقیم‌شان قادر است به ویژه در سیستم‌های پرورش متراکم ماهی به سرعت رشد نماید . تا کنون گزارشات متعددی از بروز تلفات در جمعیت بچه ماهیان پرورشی در ایران و سایر کشورها ارائه شده است. اهمیت شناسایی گونه‌ای انگل‌های ژیروداکتیلوس جهت کنترل و مقابله با آن‌ها بر کسی پوشیده نیست. پیش‌تر از حوزه‌ی رودخانه‌ی سفیدرود ژیروداکتیلوس‌های *G. cyprini* ، *G. elegans*، *G. shulmani*، *G. sprostonae* از کپور معمولی گزارش شده بود (Jalali 1995, Jalali et al. 2005). از حوزه‌ی رود دز و دریاچه زریوار *G. stankovici* و از حوزه‌ی رود کارون

و دریاچه‌ی کفتار نیز دو گونه‌ی ناشناس *Gyrodactylus* sp. از کپور معمولی گزارش گردید (Jalali et al. 2005, Jalali and Barzegar 2006). گونه‌های ژیروداکتیلوس در حوزه‌ی دریای خزر مشابه گونه‌های آسیای مرکزی و روسیه هستند و لذا شناسایی آن‌ها بر مبنای خصوصیات مورفومتریک سهل‌تر از گونه‌های موجود در سایر نواحی کشور است (Jalali et al. 2005). تا کنون از مجموع ۳۳ گونه ژیروداکتیلوس معرفی شده در آب‌های شیرین ایران تنها ۹ گونه شناسایی و ۲۴ گونه دیگر تنها در حد جنس شناسایی شده‌اند. لذا توصیه گردیده برای شناسایی دقیق گونه‌های ژیروداکتیلوس در ایران حتماً از روش مولکولی استفاده شود. در آب‌های شیرین و دریایی جهان نیز تا کنون حدود ۴۰۰ گونه ژیروداکتیلوس شناسایی شده، در صورتی که پیش‌بینی می‌شود حدود ۲۰۰۰۰ گونه ژیروداکتیلوس در جهان وجود داشته باشد. در شرایط کنونی و استفاده از روش مورفومتریک روند شناسایی گونه‌های جدید ژیروداکتیلوس بسیار کند بوده به طوری که در طی هر دهه تنها ۲۰-۳۰ گونه جدید شناسایی می‌گردد. استفاده از روش مولکولی قادر است علاوه بر ایجاد قطعیت در شناسایی ژیروداکتیلوس‌ها موجب سرعت بخشیدن به روند شناسایی گونه‌های جدید گردد (Hansen et al. 2007). در این بررسی بر اساس جدول ۱ شاخص‌های اندازه‌گیری شده، با نتایج Bykhovskaya-Pavlovskaya و همکاران در سال ۱۹۶۲ مطابقت داشته و ژیروداکتیلوس جداسازی شده از ماهی کپور معمولی، کپور نقره‌ای و کپور سرگنده گونه‌ی *G.sprostonae* شناسایی گردید. پیش‌تر انگل *Gyrodactylus sprostonae* از همین سه گونه ماهی پرورشی رایج در سیستم پلی‌کالچر کشور گزارش شده بود (Jalali et al. 2005). انگل *Gyrodactylus sprostonae* دارای وسیع‌ترین دامنه‌ی میزبانی در بین انگل‌های گروه ژیروداکتیلید در ماهیان آب شیرین ایران است (Jalali et al. 2005). در کشور همسایه، عراق نیز این انگل تا کنون از ۷ میزبان متفاوت و از جمله کپور معمولی گزارش شده که مجدداً گستردگی دامنه‌ی میزبانی این انگل را تأیید می‌کند (Mhaisen et al. 2016). این مطالعه نشان داد که تنها گونه‌ی ژیروداکتیلوس موجود در کپور معمولی، کپور نقره‌ای و کپور سرگنده مزارع پرورش ماهی استان گیلان گونه‌ی *G. sprostonae* است. توالی‌یابی انجام شده بر روی *Gyrodactylus* در این بررسی نیز تشابه ۱۰۰ درصد با گونه‌ی *G. sprostonae* را نشان می‌دهد و در واقع تأیید کننده‌ی نتایج بررسی ریخت‌شناسی انگل مزبور می‌باشد. نکته‌ی جالب این که از هیچ کدام از کپورهای علفخوار بررسی شده انگل *Gyrodactylus* جداسازی نشد، این در حالی است که هر چهار گونه ماهیان گرم آبی در سیستم پلی‌کالچر در مجاور هم و توأمان پرورش داده می‌شوند. از آن جائی که مونوژن‌ها در زمینه‌ی انتخاب میزبان خود بسیار اختصاصی عمل می‌کنند و دامنه‌ی میزبانی محدودی دارند بنابراین می‌توان نتیجه گرفت کپور علفخوار میزبان انگل *G. sprostonae* نمی‌باشد. در گذشته نیز تنها سه گونه کپور معمولی، کپور نقره‌ای و سرگنده به عنوان میزبانان *G. sprostonae* معرفی شده بودند (Jalali et al. 2005). در مجموع بر اساس جدول ۲ می‌توان عنوان نمود شیوع و شدت آلودگی به انگل *G. sprostonae* در بین ماهیان بررسی شده نگران کننده نمی‌باشد. جدول ۳ نیز نشان می‌دهد که شیوع آلودگی به *G. sprostonae* اغلب در دو فصل معتدله‌ی بهار و پائیز بوده است. در این دو فصل شدت آلودگی به این انگل در ماهی کپور معمولی و کپور نقره‌ای تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در فصل پائیز شدت آلودگی به انگل *G. sprostonae* در ماهی کپور سرگنده نسبت به فصل بهار در همین ماهی و همچنین در مقایسه با سایر گونه‌های بررسی شده در پائیز به طور معنی‌داری بیش‌تر بود ($p<۰/۰۵$). در استخرهای پرورش کپور در آلمان شرقی از سال ۱۹۶۷ شیوع انگل *G. sprostonae* به یک معضل جدی تبدیل شد در آن زمان رکورد ۴۳۵۰۰۰ انگل از یک ماهی نیز ثبت گردید که سال‌ها موجب بروز تلفات در مزارع پرورش کپور می‌شد (Mattheis and Glaser 1970). در این بررسی با

توجه به جداول ۲ و ۳، شدت و شیوع آلودگی به این انگل در ماهیان بررسی شده نگران کننده به نظر نمی‌رسد. در این تحقیق برای نخستین بار ثبت ژن انگل *Gyrodactylus sprostonae* از ۳ گونه ماهی گرم آبی کپور معمولی، کپور نقره‌ای و کپور سرگنده در بانک ژن NCBI انجام گرفت. نتایج این بررسی تأیید می‌کند که استفاده از روش توالی‌یابی در کنار روش ریخت‌شناسی می‌تواند به شناسایی اطمینان بخش گونه‌های ژیروداکتیلوس بیانجامد و با استفاده از این روش می‌توان به شناسایی گونه‌های ناشناخته و مجهول ایران پرداخت و چه بسا گونه‌های جدیدی را از کشور معرفی نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای تخصصی بوده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مدیریت محترم گروه انگل‌شناسی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

Bush, A.O.; Lafferty, K.D.; Lotz, J.M. and Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms. Journal of Parasitology, 83, 575-583.

Bykhovskaya-Pavlovskaya, I.E.; Gusev, A.V.; Dubinina, M.N.; Izyumova, N.A.; Smirnova, T.S.; Sokolovskaya, A.L. et. al. (1962). Key to parasites of freshwater fishes of the USSR. Academy of Science of the USSR, Zoological Institute. P: 919.

Cunningham, C.O; McGillivray, D.M; Mackenzie, K. and Melvin, W.T. (1995). Discrimination between *Gyrodactylus salaris*, *G. derjavini*, and *G. trutta* (Platyhelminthes: Monogenea) using restriction fragment length polymorphisms and an oligonucleotide probe within the small subunit ribosomal RNA gene. Parasitology. 111:87-94.

Ebrahimzade Mousavi, H.; Omidzahir, Sh.; Soltani, M.; Shayan, P.; Ebrahimzadeh, E.; Mousavi, Sh. and Hoseini, M. (2013). Morphometrical and molecular characterization of *Gyrodactylus cichlidarum* (Gyrodactylidae) from *Astronotus ocelllatus* (Cichlidae) in Iran. Comparative Clinical Pathology, 22: 1093-1097.

Ergens, R. (1976). Variability of hard parts of opisthaptor of two species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenoidea) from *Phoxinus phoxinus* (L.). Folia Parasitologica, 23, 111-126.

Gussev, AV (1985). Metazoan parasites. Part 1. In: ON Bauer (ed) Identification key to parasites of freshwater fish, Vol. 2. Nauka, Leningrad, (In Russian).

Hansen, H.; Bakke, T.A. and Bachmann, L. (2007). DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: Lessons from Gyrodactylus.TRENDS in parasitology, 23(8):363-367.

Jalali, B. and Barzegar, M. (2006). Fish parasites in Zarivar Lake. Journal of Agricultural Science and Technology, 8: 47-58.

Jalali, B; Shamsi, SH. and Barzegar, M. (2005). Occurrence of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from Iranian freshwater fishes. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 4(2):19-30.

Malmberg, G. (1970). The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematics of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). Arkiv for Zoologi, 23, 1.235.

Matejusova, I; Gelnar, M. and McBeath, A.J.A. (2001). Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from fve families (Teleostei). International Journal of Parasitology. 31: 738-745.

Mattheis, T. and Glaser, H.J. (1970). *Gyrodactylus sprostonae* Ling Mo-En as a cause of disease in carp (*Cyprinus carpio*). Deutsche Fischerei Zeitung, 17(8): 256-264.

Mhaisen, F.T. and Al-Rubaie, A.R.L. (2016). Checklists of Parasites of Farm Fishes of Babylon Province, Iraq. Journal of Parasitology Research. Article ID 7170534, 15 pages http://dx.doi.org/10.1155/2016/7170534

Mo, T.A. (1991). Seasonal variation of opisthaptoral hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in the River Batnfjordselva, Norway. Systematic Parasitology, 19,231-240. DOI: 10.1007/BF00009707.

Mo, T.A. (1993). Seasonal variation of opisthaptoral hard parts of *Gyrodactylus derjavini* Mikailov, 1975 (Monogenea: Gyrodactylidae) on brown trout *Salmo salar* L. parr in the River Sandviksela, Norway. Systematic Parasitology, 26, 225.231.DOI: 10.1007/BF00009730.

Mozhdeganlou, Z; Ebrahimzadeh Mousavi, H; Shayan, P; Soltani, M; Ebrahimzadeh, E. and Rostami, M. (2011). Detection of single *Dactylogyrus* spp. in DNA extracted from infected gill tissue of fishes using polymerase chain reaction. International Journal of Veterinary Research, 5(2): 77-80.

Omidzahir, Sh.; Ebrahimzadeh Mousavi, H.A.; Soltani, M.; Shayan, P.; Ebrahimzadeh, E. and Hoseini, M. (2012). Identification of *Gyrodactylus gurleyi* in *Carassius auratus* using morphometric and molecular characterization. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 6(1): 41-46.

Omidzahir, Sh.; Ebrahimzadeh Mousavi, Shayan, P.; Ebrahimzadeh Abkooh, E. and Mahnoodzadeh, H. (2015). Morphometric and molecular analysis of Gyrodactylus kobayashi in Carassius auratus (Linnaeus, 1758). Journal of Veterinary Research, 70(4): 425-432. (In Persian).

Rokicka, M.; Lumme, J. and Zietara, M. (2007). Identification of *Gyrodactylus* ectoparasites in Polish salmonid farms by PCR-RFLP of the nuclear ITS segment of ribosomal DNA (Monogenea, Gyrodactylidae). Acta Parasitologica, 52(3): 185-195.

Morphometric and Molecular identification of *Gyrodactylus sprostonae* in Guilan Province warm water fishes with an attitude of intensity and prevalence in selected farms

Daghigh Roohi, J.[1]; Dalimi Asl, A.H.[2]; Pourkazemi, M.[3]; Ghasemi, M.[4] and Shamsi, Sh.[5]

Received: 10.11.2017 Accepted: 15.07.2018

Abstract

Gyrodactylus, a member of Platyhelminthes, is one of the most common external parasites on freshwater and marine fish. This parasite mostly appears on skin and fins but rarely on gills of fish. *Gyrodactylus* can cause disease and mortality in wild and domestic populations of fish. In this study *Gyrodactylus* specimens removed by wet mounts of skin and fins of *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* and *Hypophthalmichthys nobilis* in Guilan Province fish ponds and analyzed by a light microscope. The morphometrical identification of *Gyrodactylus* specimens was performed using the measurements and drawing of opisthaptoral hard parts like as anchor, marginal hook, ventral bar and dorsal bar. The molecular species description was based on polymerase chain reaction (PCR) of a partial sequence of the 5.8S region of ribosomal RNA, and a partial sequence of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of ribosomal RNA. The nucleotide sequences of the PCR products were compared with other sequences registered in GenBank. Based on the morphometric analysis and sequencing, the *Gyrodactylus* specimens were identified as *Gyrodactylus sprostonae*. The abundance of this parasite in investigated fish ponds of Guilan Province were 21.42, 6.17, 21.95 and zero for *C. carpio*, *H. molitrix*, *H. nobilis* and *Ctenopharyngodon idella* respectively.

Key words: *Gyrodactylus sprostonae*, molecular, warm water fish, Morphometrical, Guilan, parasitic

1- Research Instructor, Department of Parasitology, Inland water Aquaculture Research Center, Iranian fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Anzali, Iran
2- Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Genetic and Breeding of Aquatic animals, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Health and Disease of Aquatic Animals, Inland water Aquaculture Research Center, Iranian fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Anzali, Iran
5- Associate Professor, Department of Parasitology , Faculty of Animal and Veterinary Sciences, Charles Sturt University, NSW, Australia
Corresponding Author: Dalimi Asl, A.H., E-mail: dalimi_a@modares.ac.ir