مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۴، ۴۳۲-۴۲۵
Journal of Veterinary Research. 70,4: 425-432, 2015
Original Article

بررسی مورفومتریک و مولکولی انگل ژیرودکتیلوس کوباياشی در ماهی طلایی *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)

شیلا امیدظهیر[۱] حسینعلی ابراهیم زاده موسوی[۲*] پرویز شایان[۳] الهه ابراهیم زاده آبکوه[۳] همایون محمود زاده[۴]

۱) گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی دانشگاه مازندران، بابلسر- ایران
۲) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۳) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۴) گروه بهداشت و تغذیه دام وطیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۱۵ شهریور ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۳ آبان ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: ماهی‌ها همواره در معرض عوامل بیماریزای مختلف هستند که در این میان انگل‌ها نقش مهمی دارند. انگل ژیرودکتیلوس از شاخه کرم‌های پهن و از جمله انگل‌های خارجی تک میزبانه مهم ماهی‌های پرورشی و آزاد آب‌های شیرین، شور و ماهی‌های زینتی محسوب می‌شود که می‌تواند سبب ایجاد بیماری و خسارات اقتصادی قابل توجهی گردد. انگل ژیرودکتیلوس در بین ماهی‌های زینتی به ویژه در خانواده کپورماهیان بسیار شایع است. **هدف:** در این مطالعه انگل ژیرودکتیلوس بر اساس ویژگی‌های مورفومتریک و مولکولی در ماهی طلایی مورد بررسی قرار گرفت. **روش کار:** انگل ژیرودکتیلوس از سطح بدن، پوست، باله‌ها و آبشش نمونه‌های ماهی طلایی پس از انتقال به آزمایشگاه توسط گسترش مرطوب جداسازی گردید و توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی‌های ریخت شناسی هریک از انگل‌ها با اندازه‌گیری قسمت‌های مختلف اپیستهاپتور انگل (قلاب مرکزی، قلابک حاشیه‌ای، میله پشتی و میله شکمی) انجام شد. جهت بررسی مولکولی گونه انگل ژیرودکتیلوس، پرایمر بالادست، در ناحیه ۵/۸ ژن RNA ریبوزومی (۵'CGATCATCGGTCTCTCGAAC ۳') و پرایمر پایین دست، در ناحیه ITS۲ ژن RNA ریبوزومی (۵'TTAAGGAAGAACCACTAGAG ۳') برای تکثیر DNA گونه‌های انگل ژیرودکتیلوس به روش PCR، طراحی گردید. **نتایج:** ویژگی‌های ریختی گونه انگل ژیرودکتیلوس با استفاده از کلیدهای تشخیصی Yamaguti در سال ۱۹۶۱ بررسی گردید، سپس توالی به دست آمده از انگل مورد نظر با توالی‌های ثبت شده انگل ژیرودکتیلوس در ژن بانک مورد مقایسه قرار گرفت و نهایتاً انگل ژیرودکتیلوس کوباياشی شناسایی گردید. **نتیجه گیری نهایی:** استفاده از نتایج بررسی مورفومتریک همراه با نتایج مولکولی، بهترین روش دستیابی به شناسایی صحیح گونه‌های جدید این انگل می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ماهی طلایی، ژیرودکتیلوس کوباياشی، ریخت شناسی مولکولی

مقدمه

انگل ژیرودکتیلوس از شاخه کرم‌های پهن، رده مونوژنه آ، زیر رده مونو اپیستوکوتیله آ، خانواده ژیرودکتیلیده و جنس ژیرودکتیلوس می‌باشد. انگل ژیرودکتیلوس اولین بار توسط Nordmann در سال ۱۸۳۲ از ماهی سیم گزارش شد (۲،۱۷). انگل ژیرودکتیلوس در صنعت آبزی پروری دارای اهمیت بالایی است. این انگل در بین ماهی‌های زینتی بسیار شایع است. تعداد واقعی گونه‌های انگل ژیرودکتیلوس بیشتر از ۲۰۰۰۰ گونه پیش بینی می‌شود، ولی تنها حدود ۴۰۰ نام از گونه‌های این انگل موجود و قابل دسترس است (۱،۱۱). انگل ژیرودکتیلوس دارای ارگان اتصالی اپیستهاپتور است که متشکل از ۱۶ قلابک حاشیه‌ای و یک جفت قلاب مرکزی می‌باشد، کمتر از ۱mm، ۸۰۰µm - ۳۰۰ طول دارد و فاقد لکه‌های چشمی می‌باشد و هرمافرودیت و زنده زا است (۲،۳). روش ریخت شناسی انگل ژیرودکتیلوس توسط Malmberg در سال ۱۹۷۰ بر اساس نواحی سخت ارگان اتصالی تحتانی (اپیستهاپتور) توسعه یافت. قسمت‌هایی از اپیستهاپتور که در تشخیص گونه‌های انگل ژیرودکتیلوس به کار می‌رود، شامل قلاب‌های مرکزی، قلابک‌های حاشیه‌ای، میله‌های شکمی و پشتی می‌باشند.

Jalali و همکاران در سال ۲۰۰۵، بیش از سی و سه گونه انگل ژیرودکتیلوس را از آبشش و سطح بدن ماهیان وحشی و پرورشی در ایران گزارش کردند، که از این میان می‌توان به *Gyrodactylus derjavini* از آبشش‌ها و باله‌های پشتی و مخرجی ماهی *Salmo trutta caspius* اشاره کرد (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر به دنبال بررسی فون انگلی رودخانه چالوس و دریاچه ولشت، از ماهی *Onchorinchos mikiss* انگل *Gyrodactylus derjavini*، از ماهی *Chalcalburnus chalcoide* انگل *Gyrodactylus* sp۱، از ماهی *Barbus capito*، انگل *Gyrodactylus* sp۲ و از ماهی *Capoeta capoeta gracilis*، انگل *Gyrodactylus* sp۳ را گزارش کردند (۱۴).

بررسی دقیق ریخت شناسی گونه‌های مختلف انگل ژیرودکتیلوس مشکل و غیر قطعی است، زیرا انگل ژیرودکتیلوس کمتر از ۱ mm طول دارد و اپیستهاپتور این انگل که مهمترین وجه مشخصه انگل ژیرودکتیلوس می‌باشد، تحت تأثیر درجه حرارت‌های مختلف، سن انگل، گونه ماهی میزبان، مکان جایگزینی انگل بروی بدن میزبان و موقعیت‌های

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۷۲، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: hmosavi@ut.ac.ir

جغرافیایی مختلف دچار تغییر می‌گردد، همچنین گونه‌هایی از جنس انگل ژیروداکتیلوس وجود دارد که از نظر ریخت شناسی بسیار شبیه همدیگر هستند ولی از نظر مولکولی کاملاً با یکدیگر تفاوت دارند (۱،۲،۳).

Cunningham و همکاران در سال ۱۹۹۵ کاربرد روش‌های مولکولی را به عنوان روشی نوین برای تشخیص گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس معرفی کردند. از زمان معرفی روش مولکولی وجود گونه‌هایی از جنس انگل ژیروداکتیلوس که از نظر ریخت شناسی بسیار مشابه همدیگر بودند، ولی از نظر مولکولی کاملاً با یکدیگر تفاوت داشتند، ثابت شد (۱۲،۱۵).

ازجمله روش‌های مولکولی که برای تشخیص انگل ژیروداکتیلوس صورت می‌گیرد، استفاده از نواحی ژن RNA ریبوزومی است. این ناحیه شامل زیرواحد بزرگ ۲۸S، زیرواحد کوچک ۱۸S، ۵/۸S و interspersed with spacers (ITS۱ و ITS۲) می‌باشد (۳). در سال‌های اخیر استفاده از نواحی ITS۱ و ITS۲ برای تفکیک گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس کاربرد زیادی داشته است (۱۱).

Malmberg و همکاران در سال ۲۰۰۷، انگل *Gyrodactylus derjavinoides* را از ماهی *Salmo trutta trutta* و انگل *Gyrodactylus derjavini* را از ماهی *Salmo trutta caspius* Kessler که از لحاظ ریخت شناسی بسیار شبیه هم بودند، از نظر ملکولی با استفاده از تکنیک PCR، مورد مطالعه قرار دادند. با بررسی توام ریخت‌شناسی و ملکولی دریافتند که با وجود اینکه این دو گونه انگل به لحاظ ریخت شناسی بسیار شبیه هم هستند، ولی از نظر ملکولی با یکدیگر متفاوتند (۱۵).

Matejusova و همکاران در سال ۲۰۰۱، ۳۱ گونه انگل ژیروداکتیلوس را در ۵ خانواده از ماهیان آب شیرین شامل Cobitidae، Percidae Balitoridae، Cyprinidae و Salmonidae به روش مولکولی مورد مطالعه قرار داردند. مطالعه مولکولی نشان‌دهنده تنوع گونه‌ای بود و تشخیص واضحی را در سطح گونه‌ها میسر ساخت (۱۶).

از زمان معرفی روش مولکولی به عنوان روشی نوین برای تشخیص گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس بسیاری از مشکلات در زمینه شناسایی دقیق گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس برطرف شده است. کاربرد توام روش ریخت شناسی و تشخیص مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و جامع برای انگل ژیروداکتیلوس و تعیین توالی گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس جداسازی شده، می‌تواند روشی مناسب در جهت شناسایی دقیق و بررسی اپیدمیولوژیک گونه‌های مختلف انگل ژیروداکتیلوس محسوب شود.

در مورد بررسی دقیق گونه انگل ژیروداکتیلوس در ماهیان زینتی در ایران تحقیقات اندکی صورت گرفته است، بنابراین در این مطالعه سعی شده است با استفاده از تلفیق روش‌های ریخت شناسی و تکنیک‌های ملکولی، گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس جداسازی شده از ماهی *Carassius auratus* (Linnaeus,۱۷۵۸) مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

در این مطالعه ۵۰ عدد ماهی گلدفیش *Carassius auratus* از مراکز مختلف فروش ماهی زینتی در شهر تهران تهیه شدند و در آزمایشگاه بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران از نظر آلودگی به انگل ژیروداکتیلوس مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه از نظر رفتار، وضعیت ظاهری و علائم بالینی مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از سطح بدن، پوست و باله‌ها و آبشش هر ماهی گسترش مرطوب تهیه گردید و از نظر آلودگی به انگل ژیروداکتیلوس توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده انگل ژیروداکتیلوس ابتدا به کمک سمپلر انگل به لام منتقل شد و توسط محلول مالمبرگ (ترکیب آمونیوم پیکرات و گلیسیرین) تثبیت شد و جهت ریخت شناسی گونه انگل، از ساختار و شکل اپیستهاپتور هر انگل توسط دوربین (Sony,SSC−DC ۸۰P−microscope digital camera Sony,SSC−DC) نصب شده بر روی میکروسکوپ نوری فیلم و عکس‌هایی با بزرگنمایی‌های مختلف ۴، ۱۰، ۴۰ و ۱۰۰ تهیه گردید. با استفاده از پارامترهای اندازه‌گیری Malmberg (۱۹۷۰) نمونه‌های جداسازی شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

جهت تشخیص گونه، انگل‌های ژیروداکتیلوس با کمک کلید تشخیصی Yamaguti (۱۹۶۱) مورد شناسایی قرار گرفتند. نواحی مختلف اپیستهاپتور انگل شامل قلاب مرکزی، قلابک‌های حاشیه‌ای، میله‌های شکمی و پشتی با استفاده از نرم افزار (Carl Zeiss Axio Vision LE Rel.۴/۵) اندازه‌گیری گردید.

برای آماده سازی انگل جهت تشخیص مولکولی، به کمک سمپلر یک عدد انگل در داخل میکروتیوب اپندورف‌های ۱/۵mL استریل حاوی اتانول ۷۰٪ قرار گرفت. همچنین بافت عاری از انگل، به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در درجه حرارت ۲۰°C- نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه ژیروداکتیلوس، با استفاده از (DNA extraction kit, MBST, Iran) بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت. در این تحقیق دو پرایمر الیگونوکلئوتیدی با توجه به توالی ژن ژیروداکتیلوس ثبت شده در بانک ژن NCBI طراحی گردید.

پرایمر بالادست در ناحیه ۵/۸S ژن RNA ریبوزومی (۵'CGATCATCGGTCTCTCGAAC۳') و پرایمر پایین دست در ناحیه ITS۲ ژن RNA ریبوزومی (۵'TTAAGGAAGAACCACTAGAG۳') طراحی گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای انگل ژیروداکتیلوس بر روی هر یک از نمونه‌های DNA استخراج شده صورت گرفت. بعد از آماده سازی محلول‌ها در حجم نهایی ۱۰۰ µL، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در دستگاه

ترموسایکلر (MWG, Germany) انجام شد. جهت بررسی محصول PCR، ژل آگارز ۱/۵٪ تهیه شد و بر روی تانک الکتروفورز (Cell GT Biorad Mini – Sub) با ولتاژ ۱۰۰ قرار داده شد. برای ارزیابی باندهای به دست آمده، مارکر (۱۰۰ bp plus DNA Ladder) ساخت شرکت Fermentas در ژل مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت با استفاده از اشعه UV باندهای جدا شده قابل رویت گردید و عکس‌برداری شد. خالص سازی محصول PCRتوسط کیت (PCR purification kit, MBST,Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای هر یک از نمونه‌ها مقدار ۳۰µL محصول PCR خالص سازی شده به همراه پرایمرهای بالادست و پایین دست، هر کدام به مقدار ۲۰µL و غلظت ۲۰µmol در تیوب‌های جداگانه برای تعیین توالی آماده سازی شد. پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی، توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Chromas مورد بررسی قرار گرفت و پس از BLAST در ژن بانک NCBI گونه‌های جداسازی شده شناسایی شدند.

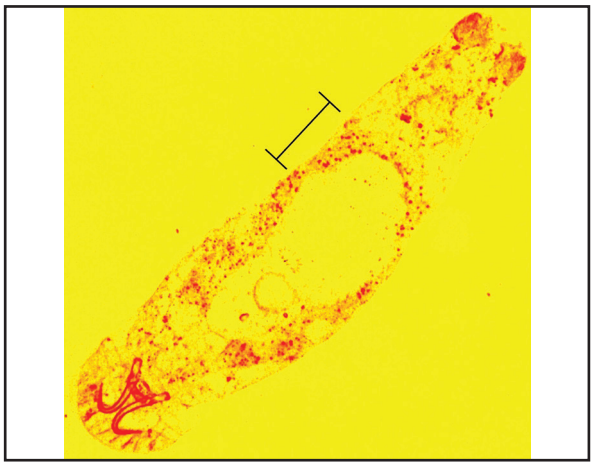
نتایج

در این مطالعه، انگل‌های ژیروداکتیلوس جداسازی شده ابتدا از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. قلاب مرکزی در انگل‌های مورد مطالعه باریک و رأس قلاب مرکزی به صورت باریک و تیز در آمده است. قلابک حاشیه‌ای باریک و بلند و قسمت داسی شکل قلابک حاشیه‌ای دارای قوس منظمی است (تصویر ۱،۲). نتایج حاصل از اندازه گیری قسمت‌های مختلف اپیستهاپتور انگل بر حسب میکرو متر عبارتند از: طول کلی قلاب‌های مرکزی ۵۸/۸۲-۵۲/۱۲، طول بدنه قلاب مرکزی ۴۵/۲۴-۴۰/۱۳، طول ریشه قلاب مرکزی ۱۸/۸۲-۱۳/۵۱، طول رأس قلاب مرکزی ۲۸/۲۵-۲۳/۵۴، طول کلی قلابک‌های حاشیه‌ای ۲۷/۸۳-۲۶/۲۲، طول قسمت داسی شکل قلابک‌های حاشیه‌ای ۵/۵۴-۴/۹۰، طول دسته قلابک‌های حاشیه‌ای ۲۲/۲۵-۲۱/۱۳، طول میله شکمی ۲۳/۸۱-۲۰/۰۴، عرض میانی میله شکمی ۷/۲-۶/۲۵، طول میله پشتی ۲۵/۱۴-۲۰/۳۳ و عرض میانی میله پشتی ۲/۲۳-۱/۵۴.

سپس توالی نوکلئوتیدی انگل‌های ژیروداکتیلوس جداسازی شده در این مطالعه، با استفاده از تکنیکPCR، توسط پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر DNA مورد ارزیابی قرار گرفت. از نظر مولکولی گونه انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی شناسایی گردید. در این تحقیق اندازه توالی نوکلئوتیدی محصول PCR مربوط به این گونه انگل ژیروداکتیلوس ۳۷۴ جفت بازمشخص گردید که ۷۲ جفت باز مربوط به ناحیه ۵/۸S ژن RNA ریبوزومی و ۳۰۲ جفت باز مربوط به ناحیه ITS۲ می باشد (تصویر ۳). توالی نوکلئوتیدی به دست آمده با سایر توالی ثبت شده انگل ژیروداکتیلوس در بانک ژن NCBI مقایسه شد و ۱۰۰٪ تشابه باگونه انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی مشاهده گردید (تصویر ۴). توالی نوکلئوتیدی این انگل در این

جدول ۱. مقایسه خصوصیات مورفومتریک انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی جداسازی شده در این مطالعه با خصوصیات مورفومتریک انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی گزارش شده توسط Gussev در سال ۱۹۸۵و Ergens در سال ۱۹۷۸.

اندازه گیری (µm)		ژیروداکتیلوس کوبایاشی		
		مطالعه حاضر	Gussev (۱۹۸۵)	Ergens (۱۹۷۸)
قلاب مرکزی	طول کلی	۵۸/۸۲-۵۲/۱۲	۶۹-۵۱	۶۹-۵۷
	طول بدنه	۴۵/۲۴ -۴۰/۱۳	۵۲-۳۹	۵۲-۴۴
	طول ریشه	۱۸/۸۲-۱۳/۵۱	۲۳-۱۳	۲۳-۱۷
	طول راس	۲۸/۲۵-۲۳/۵۴	۳۲-۲۵	۳۰-۲۸
قلابک حاشیه ای	طول کلی	۲۷/۸۳-۲۶/۲۲	۲۸-۲۵	۲۸-۲۵
	طول قسمت داسی شکل	۵/۵۴-۴/۹۰	۶-۵	۶-۵
	طول دسته	۲۱/۱۳-۲۲/۲۵	-	-
میله شکمی	طول	۲۳/۸۱-۲۰/۰۱	۲۵-۲۱	۲۵-۲۲
	عرض میانی	۷/۲۲-۵/۶۱	۷-۶	-
میله پشتی	طول	۲۰/۳۳-۲۵/۱۴	۱۹-۱۴	۱۹
	عرض میانی	۲/۲۳-۱/۵۴	۳-۱	-

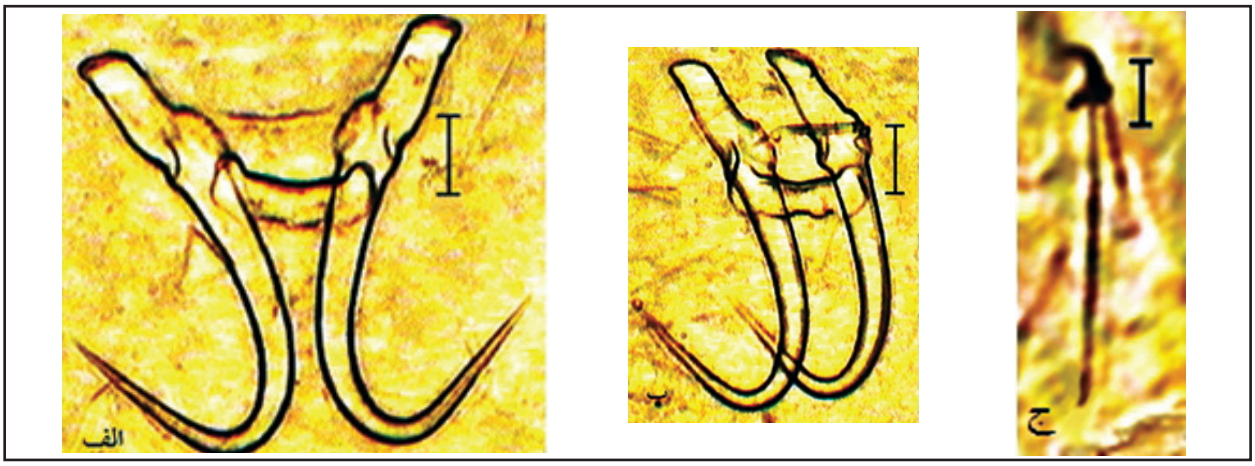


تصویر۱. نمونه‌ای از انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی جداسازی شده در این مطالعه، میله مقیاس: ۵۰µm.

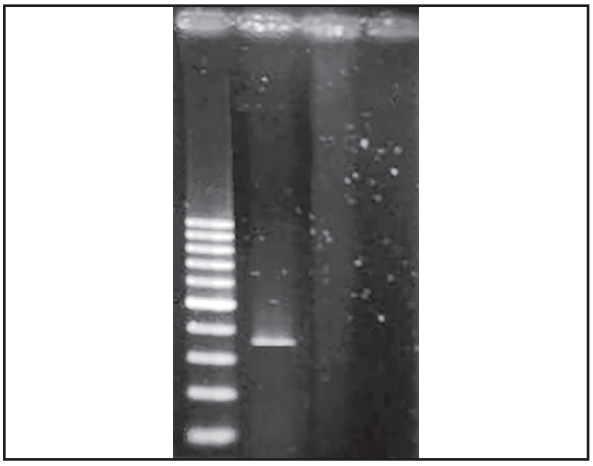
مطالعه با Accession number JN۹۸۴۹۳ در بانک ژن NCBI ثبت شد.

بحث

در مطالعه حاضر انگل *Gyrodactylus kobayashi* در ماهی *Carassius auratus* از نظر ریخت شناسی و مولکولی شناسایی گردید. در مطالعات دیگری نیز انگل ژیروداکتیلوس از ماهی‌های مختلف در ایران گزارش شده است، چنانچه طی بررسی به عمل آمده توسط Rasouli و همکاران در سال ۲۰۱۲ بروی ۲۰۷ عدد ماهی کاراس از سال ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ در رودخانه‌های شمال، مرکز و جنوب استان آذربایجان غربی انگل ژیروداکتیلوس در حد جنس از آبشش‌های ماهیان کاراس رودخانه ارس شناسایی شدند (۲۱). Pazooki و همکاران در سال ۲۰۱۱ انگل



تصویر۲. ژیرودکتیلوس کوبایاشی الف وب: مجموعه قلاب مرکزی ج: قلابک حاشیه‌ای، میله مقیاس: الف وب: ۱۰µm، ج:۵ µm.



تصویر ۳. الکتروفورز محصول PCR حاصل از DNA ژنومیک گونه ژیرودکتیلوس کوبایاشی.

```
Query  1     CGATCATCGGTCTCTCGAACGCAAATGGCGGCTAAGGGCTTGCTCTTAGCCACGTTCGAT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  720   CGATCATCGGTCTCTCGAACGCAAATGGCGGCTAAGGGCTTGCTCTTAGCCACGTTCGAT  779

Query  61    CGAGTGTCGGCTTTTACCTATCGTAACGCTTAATTAGTTGCGGATTGGGAAGCATACCAT  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  780   CGAGTGTCGGCTTTTACCTATCGTAACGCTTAATTAGTTGCGGATTGGGAAGCATACCAT  839

Query  121   GGCTACGCGATTAACTTGTTGTTGAAAGTATTGACACTGGGTATTACACGGTCTTGACGG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  840   GGCTACGCGATTAACTTGTTGTTGAAAGTATTGACACTGGGTATTACACGGTCTTGACGG  899

Query  181   TTTGCCCAGTGGTGTTCGGATTTTGGTATTACACGGTCTTTGCGGTTTGCCAATTGATGT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  900   TTTGCCCAGTGGTGTTCGGATTTTGGTATTACACGGTCTTTGCGGTTTGCCAATTGATGT  959

Query  241   TCACGCCTTTACTAGTAAGCAGCTTCAGAGTATTACACGGTCTTGACGGTTTGCTCTGAA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  960   TCACGCCTTTACTAGTAAGCAGCTTCAGAGTATTACACGGTCTTGACGGTTTGCTCTGAA  1019

Query  301   GTAAAGACCTCCATATCATACACGACCTTTACGGTTTGATGTGGAGTGTAGTGGCTCTAG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1020  GTAAAGACCTCCATATCATACACGACCTTTACGGTTTGATGTGGAGTGTAGTGGCTCTAG  1079

Query  361   TGGTTCTTCCTTAA  374
             ||||||||||||||
Sbjct  1080  TGGTTCTTCCTTAA  1093
```

تصویر ۴. مقایسه توالی نوکلئوتیدی به دست آمده از انگل ژیروداکتیلوس در این مطالعه با توالی نوکلئوتیدی ثبت شده از انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی در بانک ژن NCBI.

ژیروداکتیلوس با گونه نامشخص را بروی آبشش ماهیان گوبی در ناحیه جنوب شرقی دریای خزر شناسایی کردند و این اولین گزارش این انگل از ماهی فوق الذکر در ایران بود (۱۹). در مورد آلودگی انگلی در ماهیان زینتی در ایران گزارشات کمی موجود است. طی بررسی که توسط Ebrahimzadeh Mousavi در سال ۲۰۰۳ برروی تعداد زیادی از انواع ماهیان زینتی در ایران، جهت بررسی آلودگی انگلی صورت گرفت، انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی از ماهی Carassius auratus و انگل ژیروداکتیلوس با گونه نامشخص از ماهی اسکار گزارش گردید (۵). Thilakaratne و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بررسی آلودگی انگلی ماهیان زینتی کشور سریلانکا که یکی از صادر کنندگان عمده ماهیان زینتی به سرتاسر دنیا از جمله ایران می‌باشد، انگل ژیروداکتیلوس را به همراه داکتیلوژیروس، تریکودینا، تتراهایمنا، آرگولوس، سنتروسستوس، لیکتیوفتیریوس مولتیفیلیس گزارش کردند (۲۳). Ebrahimzadeh Mousavi و همکاران در سال ۲۰۰۹ انگل *Gyrodactylus chinensis* و *Gyrodactylus* sp. را ازماهی طلایی (نوع فلس مرواریدی) گزارش کردند (۶).

به لحاظ ریخت‌شناسی تشخیص گونه انگل ژیروداکتیلوس بسیار کار مشکلی است. بعضی از گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس از نظر ریخت شناسی بسیار شبیه به همدیگر هستند ولی از نظر مولکولی مشخصاً با یکدیگر تفاوت دارند (۲۲). Cunningham و همکاران در سال ۱۹۹۵ کاربرد روش‌های مولکولی را به عنوان روشی نوین برای تشخیص گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس معرفی کردند. از زمان معرفی روش مولکولی وجود گونه‌هایی از انگل ژیروداکتیلوس که از نظر ریخت شناسی بسیار مشابه همدیگر بودند، ولی از نظر مولکولی کاملاً با یکدیگر تفاوت داشتند، ثابت شد (۲۲).

Rokicka و همکاران در سال ۲۰۰۷ مزارع چهار گونه ماهی *Thymallus thymall*، *Salmo trutta*، *Oncorhynchus mykiss* و *Hucho hucho* را در لهستان از لحاظ آلودگی به انگل ژیروداکتیلوس با روش PCR مورد بررسی قرار دادند. این محققین بیان کردند که تشخیص مدرن گونه‌های ژیروداکتیلوس ضروری است و روشی مطمئن برای شناسایی جنس غنی از گونه انگل ژیروداکتیلوس محسوب می‌شود (۲۲).

Gyrodactylus salina در سال ۲۰۱۱ توسط Paladini و همکاران از ماهی کپور دندانـدار گورخری گزارش شـد. این گونه انگل از نظر خصوصیات ریخت شناسـی بسـیار بـه انـگل *Gyrodactylus rugiensoides* شـبیه است، اما تعیین توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS۱، ۵/۸S و ITS۲ نشان داد که ژیرودکتیلوس سالینا گونه جدیدی است (۱۸). You و همکاران در سـال ۲۰۱۱ انگل *Gyrodactylus granoei* را از ماهی لـوچ *Cobitis granoei* در چین گزارش کردند. این انگل از نظر ریخت شناسی بسـیار شـبیه گونه *Gyrodactylus micracanthus* می‌باشـد، اما بررسـی مولکولی نواحـی ITS۱، ۸/۵S و ITS۲ گونه جدید ژیرودکتیلوس گراتوئی را در ماهی لوچ معرفی کرد (۲۵).

Garcia-Vasquez و همـکاران در سـال ۲۰۱۵ گونه‌هـای جدید انگل ژیروداکتیلوس را از ماهی‌های خانواده poeciliidae گزارش کردند. انگل‌هـای *Gyrodactylus microdactylus* و *Gyrodactylus actzu* و *Gyrodactylus poeciliae* که از لحاظ ریخت شناسی بسیار شبیه هم بودند، با مطالعه مولکولی بر روی ITS۱ و ITS۲ و ۵/۸S ژن RNA ریبوزومی گونه‌های جدید و جداگانه‌ای شناخته شدند (۸). مثال‌های فوق از بررسی‌های ریخت شناسی و مولکولی انگل ژیروداکتیلوس در نقاط مختلف دنیا، اهمیت کاربرد توام روش‌های تشخیص ریخت شناسی و مولکولی را در شناسایی گونه‌های مختلف انگل ژیروداکتیلوس نشان می‌دهد. مطالعه حاضر برای نخسـتین بار در ایران انگل ژیروداکتیلـوس را با هر دو روش ریخت شناسی و مولکولی مورد بررسی قرار می‌دهد.

انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشـی اولین بار توسـط Hukuda در سال ۱۹۴۰در ماهی طلایی مورد شناسایی قرار گرفت. مجدداً Ergens در سال ۱۹۷۸ و Gussev در سال ۱۹۸۵ این گونه انگل را بررسی و توصیف نمودند (۷،۹). خصوصیات مورفومتریک انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی جداسازی شـده در ایـن مطالعه با خصوصیـات مورفومتریک انـگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی گزارش شده توسط Gussev در سال ۱۹۸۵ و Ergens در سال ۱۹۷۸ مقایسـه شده است. خصوصیات مورفومتریک انگل ژیرودکتیلوس کوبایاشی در این مطالعه، در تمام خصوصیات مشابه و تنها طول میله پشتی بلندتر از ژیرودکتیلوس کوبایاشـی گزارش شده توسط Gussev در سال ۱۹۸۵ و Ergens در سال ۱۹۷۸ بود (جدول ۱).

در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی و ریخت شناسی توسـط بررسـی مولکولی مورد تأیید قـرار گرفت. تلفیق بررسـی ریخت شناسی و تکنیک مولکولی بهترین دستاورد را در شناسایی گونه‌های انگل ژیروداکتیلوس به همراه دارد. پرایمرهای ارائه شده در این مطالعه به صورت اختصاصی و جامع برای انگل ژیروداکتیلوس طراحی شـده است و قادر به شناسـایی گونه‌های مختلف انگل ژیروداکتیلوس می‌باشد. با توجه با این نکته که طی سـال‌های گذشـته روند واردات ماهیان زینتی به ایران رو به رشـد بوده اسـت و همچنین ایران اکنون موفق به تکثیر و پرورش تعداد زیادی از گونه‌های ماهیان زینتی شـد ه اسـت، روش‌های کنترل مناسب، رعایت اصول بهداشتی و شناسایی دقیق عوامل بیماریزا نقش مهمی را در این صنعت مهم اقتصادی ایفا می‌کند. کاربرد روش مولکولی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و جامع بـرای انگل ژیروداکتیلوس علاوه بر اینکه روشی مناسب در جهت شناسایی دقیق و بررسی اپیدمیولوژیک گونه‌های مختلف انگل ژیروداکتیلوس در کشـور محسـوب می‌شود، می‌تواند نقش مهمی را در تشخیص سریع و دقیق گونه‌های مختلف انگل ژیروداکتیلوس طی دوره قرنطینه ماهیان وارداتی، بررسـی اپیدمیولوژیک آلودگی به این انگل در ماهیان وارداتی و همچنین پیشـگیری از ورود آلودگی به کشـور ایفا کند.

ارزش ماهی‌های زینتی بر اسـاس کیفیت و سـلامت و شـادابی آنها تخمین زده می‌شـود و تنها ماهی‌های سـالم و ماندگار دارای ارزش خوبی می‌باشند. بنابراین مدیریت بهداشتی، پیشگیری و شناسایی دقیق عوامل بیماریزا در ماهیان زینتی که امروزه به یک صنعت عظیم اقتصادی تبدیل شده است امری مهم به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از طرف دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران حمایت مالی شـده است. همچنین از کمک‌های کارشناسی سرکار خانم‌ها دکتر شقایق روح اللهـی، دکتر سـمیرا محمدیان و خانم نرگس امینی تشـکر به عمل می‌آید.

References

1. Bakke, T.A., Harris, P.D., Cable, J. (2002) Host specificity dynamics: observations on gyrodactylid monogeneans. Int J Parasitol. 32: 281–308.
2. Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D. (2007) The biology of Gyrodactylid monogeneans: the "russian doll-killers". Adv Parasitol. 64: 161-376.
3. Collins, C.M., Buchmann, K., Cunningham, C.O. (2002) Diagnosis of Gyrodactylus (Monogenea; Platyhelminthes) infecting salmonid fish in Northern europe. Fish Res Serv. 72: 2-54.
4. Cunningham, C.O., McGillivray, D.M., MacKenzie, K., Melvin, W.T. (1995) Discrimination between *Gyrodactylus salaris*, *G. derjavini*, and *G. truttae* (Platyhelminthes: Monogenea) using restriction fragment length polymorphisms and an oligonucleotide probe within the small subunit ribosomal RNA gene. Parasitology. 111: 87-94.

5. Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. (2003) Parasites of ornamental fish in Iran. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 23: 297-300.
6. Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Mehdizadeh, S., Shoeibi, B., Mokhayer, B., Soltani, M., Ahmadi, M., Mirzargar, S. (2009) Gill ectoparasites of goldfish imported into Iran. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 29: 69-74.
7. Ergens, R., Yukhimenko, S.S. (1987) Contribution to the knowledge of *Gyrodactylus gurleyi* Price 1937 (monogenea: Gyrodactylidae). Folia Parasitol. 34: 205-209.
8. García-Vásquez, A., Razo-Mendivil, U., Rubio-Godoy, M. (2015) Morphological and molecular description of eight new species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 (Platyhelminthes: Monogenea) from poeciliid fishes, collected in their natural distribution range in the Gulf of Mexico slope, Mexico. Parasitol Res. 114: 3337-55.
9. Gussev, A.V. (1985) Monogenea. In: Key to Parasites of Freshwater Fishes of USSR. Bauer, O.N. (ed.). Vol 2, Nauka Leningrad, USSR. p. 424- 430.
10. Hansen, H., Bakke, T.A., Bachmann, L. (2007) DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from Gyrodactylus. Trend Parasitol. 23: 363-367.
11. Harris, P.D., Shinn, A.P., Cable, J., Bakke, T.A. (2004) Nominal species of the genus *Gyrodactylus* von Nordmann 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae), with a list of principal host species. Syst Parasitol. 59: 1-27.
12. Huyse, T., Malmberg, G., Volckaert, A.M. (2004) Four new species of *Gyrodactylus* von Nordmann, 1832 (Monogenea, Gyrodactylidae) on gobiid fishes: combined DNA and morphological analyses. Syst Parasitol. 59: 103-120.
13. Jalali, B., Shamsi, Sh., Barzegar, M. (2005) Occurance of *Gyrodactylus* spp (monogenea: gyrodactylidae) from Iranian freshwater. Iran J Fish Sci. 4: 19-30.
14. Jalali, B., Miar, A., Bozorgnia, A., Pazooki, J., Barzegar, M., Masoumian, M. (2008) Fish parasite in Valasht Lake and Chalus River. Iran Sci Fish J.17: 133-138.
15. Malmberg, G., Collins, C.M., Cunningham, C.O., Jalali, B. (2007) *Gyrodactylus derjavinoides* sp. nov. (Monogenea, Platyhelminthes) on *Salmo trutta trutta* L. and *G. derjavini* Mikailov, 1975 on S. t. caspius Kessler, two different species of Gyrodactylus – combined morphological and molecular investigations. Acta Parasitol. 52: 89-103.
16. Matejusova, I., Gelnar, M., McBeath, A.J.A. (2001) Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five families (Teleostei). Int J Parasitol. 31: 738-745.
17. Noga, E.J. (2010) Fish Disease: Diagnosis and Treatment. (2nd ed) Wiley-Blackwell, Iowa, USA.
18. Paladini, G., Huyse, T., Shinn, A.P. (2011) *Gyrodactylus salinae*, n. sp. (Platyhelminthes: Monogenea) infecting the south European toothcarp *Aphanius fasciatus* (Valenciennes) (Teleostei, Cyprinodontidae) from a hyper saline environment in Italy. Parasit Vect. 4: 100 -112.
19. Pazooki, J., Mansouri-Habibabadi, Z., Masoumian, M., Aghaee-Moghadam, A. (2011) Survey on the metazoan parasites in Neogobius fishes from Southeastern part of the Caspian Sea. Iran J Fish Sci. 10: 95-104.
20. Pazooki, J., Masoumian, M., Yahyazadeh, M. Sadri, G., Jalali, B. (2004) Monogenean parasites from fresh water fishes of Northwest Iran. Pajouhesh & Sazandegi. (In Persian). 77: 17-25.
21. Rasouli, S., Nekuifard, A., Azadikhah, D., Ahari, H., Anvar, A.A., Khodadadi, A., Ghasemi, A. (2012) Ectoparasite infection of *Carassius carassius* in water resources of west Azerbaijan. Iran J Fish Sci. 11: 156-164.
22. Rokicka, M., Lumme, J., Ziêtara, M.S. (2007) Identification of Gyrodactylus ectoparasites in Polish salmonid farms by PCR-RFLP of the nuclear ITS segment of ribosomal DNA (Monogenea, Gyrodactylidae). Acta Parasitol. 52: 185-195.
23. Thilakaratne, I.D., Rajapaksha, G., Hewakopara, A. (2003) Parasitic infections in freshwater ornamental fish in Sri Lanka. Dis Aquat Org. 54: 157-162.
24. Yamaguti, S. (1961) Systema Helminthum:

Monogenea and Aspidocotrlea. (1st ed.) John Wiley & Sons, London, UK.
25. You, P., Guo, Z., King, S.D., Cone, D.K. (2010) A new gyrodactylid species from *Cobitis granoei* (Rendahl) (Cobitidae) in central China. J Parasitol. 96: 897-899.

Morphometric and Molecular Analysis of *Gyrodactlus kobayashi* in *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)

Omidzahir, Sh.[1], Ebrahimzadeh Mousavi, H.A.[2*], Shayan, P.[3], Ebrahimzadeh Abkooh, E.[3], Mahmoodzadeh, H.[4]

[1]*Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, University of Mazandaran, Babolsar-Iran*
[2]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*
[3]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*
[4]*Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 6 September 2015, Accepted 14 November 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Fish are constantly exposed to various pathogens and parasites in particular. Gyrodactylus from Platyhelminthes is an important monogenean ectoparasite that can cause disease and economical losses to cultured, wild, salt and fresh water and ornamental fish. Gyrodactylus appears to be one of the most prevalent parasites of ornamental fish especially in Cyprinids. **OBJECTIVES:** The present study aimed to identify morphometric and molecular characteristics of Gyrodactylus parasite on *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). **METHODS:** Gyrocactylus parasites were isolated from skin, fins and gills of the fish with wet mount slide and were examined under light microscopy. The morphometrical characterization of *Gyrodactylus* specimens was performed using the measurements and drawings of opisthaptoral hard parts of the parasites. The molecular species description was based on polymerase chain reaction (PCR) of partial sequence of 5.8S region of ribosomal RNA (5´CGATCATCGGTCTCTCGAAC3´) and partial sequence of internal transcribed spacer2 (ITS2) of ribosomal RNA (5´TTAAGGAAGAACCACTAGAG3´). **RESULTS:** *Gyrodactylus* species morphology identification was performed using Yamaguti (1961) identification key. The nucleotide sequences of the PCR products were compared with GenBank sequences. **CONCLUSIONS:** Based on morphometric analysis and sequencing, the *Gyrodactylus* specimens were described as *Gyrodactylus kobayashi.* Combination of molecular techniques with morphological analysis seems to be the best approach to identification of *Gyrodactylus* spices.

Keyword: *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), *Gyrodactylus kobayashi*, morphometric and molecular characterization

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Morphological measurements of opisthaptoral hard parts of *Gyrodactylus kobayashi* isolated from this study and *Gyrodactylus kobayashi* reported by Ergens (1978) and Gussev (1985).

Figure 1. An example of *Gyrodactylus kobayashi* isolated in this study, scale bar: 50µm.

Figure 2. *Gyrodactylus kobayashi*, A&B: Anchor complex, C: Marginal hook, Scale bar A&B: 10 µm, C: 5 µm.

Figure 3. Electrophoresis of PCR amplification product from *Gyrodactylus kobayashi*.

Figure 4. Comparison of nucleotide sequence of Gyrodactylus in present study with *Gyrodactylus kobayashi* in NCBI Genbank.

***Corresponding author's email: hmosavi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117172, Fax: 021-66933222**