

بررسی شجره‌شناسی گونه‌های اوسترتاژیا

میثم صبور دربندی، فاطمه جالوسیان*، بهنام مشگی

گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران (قطب علمی بوم‌سازگان و تغییرات فراساختاری در کرم‌ها)

(دریافت مقاله: ۱۵ فروردین ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۹ خرداد ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: گونه‌های اوسترتاژیا (تلا دورسازیا) عامل اصلی گاستریت انگلی در نشخوارکنندگان محسوب می‌شوند که به دلیل اختلال در ساختار غدد شیردان، بر اسیدیته و عملکرد این اندام تأثیر گذاشته و در نتیجه با ایجاد اختلال در هضم آنزیمی مواد غذایی بویژه پروتئین‌ها، سبب کاهش تولید شیر، پشم و وزن دام می‌گردند لذا شناسایی گونه‌های مختلف و بومی کشور از ضرورت‌های تحقیقاتی در طب دامی بشمار می‌آید. **هدف:** بررسی حاضر با هدف تشخیص و تفریق گونه‌های اوسترتاژیا بر اساس خصوصیات مولکولی صورت پذیرفت. **روش کار:** جمع‌آوری نمونه‌ها ضمن بازرسی کشتارگاهی از شهرهای ری، تهران، مشهد و بندرعباس انجام گرفت. در این تحقیق تعداد ۱۸۰ عدد کرم بالغ نر براساس مشخصات مورفومتریک اسپیکول‌ها از دو میزبان گوسفند و بز شناسایی گردیدند، سپس در بخش مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور تکثیر توالی لکوس ITS۱، ITS۲ و ۵S/۸S بطول ۹۴۶ جفت باز انجام شد، بعد از تعیین توالی با استفاده از نرم افزارهای مربوط نتایج حاصل تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت. **نتایج:** نتایج بدست آمده نشان داد، سه گونه اوسترتاژیا سیر کومسینکتا، اوسترتاژیا اکسیدنتالیس و اوسترتاژیا تریفور کاتا از نظر ژنوتایپ مولکولی اختلاف ۳-۲ درصد و شباهت ۹۸-۹۷ درصدی دارند. **نتیجه‌گیری نهایی:** سه گونه نامتود تحت آزمایش در بررسی حاضر از حیث خصوصیات مولکولی تفاوت (۳-۲ درصدی) دارند و لازم است پراکنش و تمایل میزبانی آن‌ها بمنظور تدوین برنامه‌های کنترل و پیشگیری مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اوسترتاژیا، مولکولی، ITS۲

مقدمه

مولکولی برای تشخیص گونه‌های اوسترتاژیا بعنوان یکی از آلودگی‌های مهم شیردان نشخوارکنندگان و نبود هر گونه پژوهش داخلی در این زمینه، ضرورت و لزوم تحقیق حاضر را مضعف می‌نماید.

دو توالی ITS۱ و ITS۲ نشانگر ژنتیکی مطلوبی برای تشخیص نامتودهای تریکوسترونژیلید محسوب می‌شوند. این قطعات از دو طرف به نواحی نسبتاً محافظت شده ۱۸ و ۵۲۸ (مناسب برای طراحی پرایمرهای عمومی) متصل هستند (۸،۹). اگر چه تا کنون در ایران گونه‌های اوسترتاژیا با توجه به ویژگی‌های ریختی از یکدیگر تفریق شده‌اند ولی در این مورد خاص مطالعات مولکولی برای تعیین گونه‌ها مورد استفاده قرار نگرفته است، لذا پژوهش حاضر به منظور شناسایی ویژگی‌های مولکولی در راستای تفریق گونه‌های جنس اوسترتاژیا به مرحله اجرا در آمد.

مواد و روش کار

تحقیق پیش‌رو در دو مرحله اصلی شامل جمع‌آوری نمونه و ارزیابی ویژگی‌های مولکولی به شرح زیر صورت پذیرفت (جمع‌آوری نمونه و تشخیص تفریقی کرم‌ها): در ضمن بازرسی کشتارگاهی کرم بالغ اوسترتاژیا از شیردان دو میزبان گوسفند و بز از مناطق مختلف شامل کشتارگاه‌های شهر ری، تهران، مشهد و بندرعباس جمع‌آوری گردید. بدین صورت که محتویات شیردان در بازرسی کشتارگاهی از نظر آلودگی‌های کرمی تحت آزمایش قرار گرفت و در شرایط آزمایشگاهی اقدام به جداسازی نمونه‌های کرمی گردید. برای تعیین هویت کرم‌های جدا شده، هر کرم به روی لام

نامتود جنس اوسترتاژیا (تلا دورسازیا) متعلق به دون خانواده اوسترتاژینه از نامتودهای تریکوسترونژیلید، در زمره نامتودهای با اهمیت شیردان نشخوارکنندگان بشمار آمده که به دلیل رنگ قهوه‌ای، تحت عنوان کرم قهوه‌ای شیردان هم موسوم است (۳). آلودگی به این نامتود در ایران از نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ نظیر گوسفند، بز، گاو، شتر، گاو میش و آهوان گزارش شده است (۶). تشخیص ریخت‌شناسی جنس ماده این گونه‌ها به دلیل اینکه دارای ویژگی‌های اختصاصی نمی‌باشند، بالنسبه محدود است (۱). جنس اوسترتاژیا از تنوع درون گونه‌ای، طیف وسیع میزبانی و پراکنش جغرافیایی قابل ملاحظه‌ای برخوردار است. محققین بر این تصور هستند که گونه‌ها و احتمالاً سویه‌های اوسترتاژیا پاسخ‌های درمانی متفاوتی به داروها نشان می‌دهند که می‌تواند ناشی از اختلافات زیستی، فیزیولوژیک و تفاوت در فعالیت آنزیم‌های انگل باشد (۴، ۵). در تحقیقات اخیر مشخص شده است که تکیه بر بررسی‌های ریختی به تنهایی برای تشخیص گونه‌ها ناکافی بوده و در این ارتباط باید از ابزارهای مولکولی بهره گرفت. اگر چه اختلافات فنوتیپی بین گونه‌های برای شناسایی اجرام انگلی لازم هستند ولی بنظر می‌رسد کافی نمی‌باشند، چرا که در بسیاری موارد با اینکه دو موجود از نظر ویژگی‌های فنوتیپی کاملاً به یکدیگر شبیه‌اند ولی اختلافات ژنوتیپی زیادی دارند که قطعاً این تفاوت‌ها در پدیده‌های زیستی و از جمله در بیماری‌زایی، آلوده‌سازی دیگر میزبان‌ها، پاسخ به درمان و تولید غذای سالم با منشأ دامی و دیگر موارد، تأثیر گذارند (۱۱). لذا بررسی خصوصیات



جدول ۱. مشخصات مورفومتریک اسپیکول در سه گونه تلادورسازیا (μ) در ایران. آنالیز آماری یافته‌های بدست آمده با استفاده از آزمون t-student نشان داد که اندازه اسپیکول‌ها در سه گونه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (p<۰/۰۵).

گونه اوسترتاژیا	تعداد	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار
اوسترتاژیا سیرکومسینکتا	۶۰	۳۶۸	۴۰۲/۵	۳۸۹/۴	۱۲/۹±
اوسترتاژیا اکسیدانتالیس	۶۰	۲۸۸	۳۹۹	۳۲۳/۱	۱۸/۸±
اوسترتاژیا تریفورکاتا	۶۰	۲۱۸/۵	۲۳۰	۲۲۲/۳	۳/۶±

فناور کوثر ایران ارسال گردید. نتایج مربوط به توالی‌های به دست آمده توسط ابزار Blast تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در خامه ضمن ثبت نمونه‌های مورد نظر (از هر سه گونه) در بانک جهانی ژن، درخت شجره‌ای با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۸ و آزمون t-student انجام گرفت.

نتایج

نتایج تشخیص تفریقی کرم‌ها بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی:

همانطور که در روش کار هم توضیح داده شد، از سه گونه اوسترتاژیا شامل اوسترتاژیا سیرکومسینکتا، اوسترتاژیا اکسیدانتالیس و اوسترتاژیا تریفورکاتا از هر کدام تعداد ۶۰ عدد کرم نر بالغ جهت بررسی ریخت-شناسی انتخاب گردید. بدین منظور ویژگی‌های ریختی و اندازه اسپیکول در گونه‌های مختلف تلادورسازیا در نظر گرفته شد.

در اوسترتاژیا سیرکومسینکتا اسپیکول‌ها در انتها دو شاخه، نازک، کشیده، به رنگ قهوه‌ای و در انتهای شاخه اصلی تکمه‌ای وجود داشت، همچنین شاخه نازک و نوک تیز ماندنی نزدیک به انتهای شاخه اصلی مشاهده گردید. حداقل و حداکثر اندازه اسپیکول در این گونه به ترتیب ۳۶۸ و ۴۰۲/۵ μ بود (جدول ۱). در اوسترتاژیا اکسیدانتالیس اسپیکول‌ها ضخیم، قهوه‌ای پررنگ و هر یک در انتها به سه شاخه پهن تقسیم شده‌اند. ابعاد اسپیکول از ۲۸۸ μ تا ۳۹۹ μ در تغییر بود (جدول ۱). در اوسترتاژیا تریفورکاتا اسپیکول‌ها به رنگ قهوه‌ای و نسبتاً ضخیم که در انتها به سه شاخه تقسیم شده‌اند، انتهای شاخه طویل‌تر تکمه ضخیمی وجود دارد و قبل از آن دو شاخه نازک قابل مشاهده است. حداقل و حداکثر اندازه اسپیکول به ترتیب ۲۱۸/۵ μ و ۲۳۰ μ بود (جدول ۱). میانگین طول اسپیکول‌ها در اوسترتاژیا سیرکومسینکتا (بیشتر از ۳۸۰ μ) نسبت به دو گونه دیگر (کمتر از ۳۳۰ μ) بوضوح قابل مشاهده است (جدول ۱).

بررسی نتایج مولکولی: استخراج DNA از کرم بالغ سه گونه اوسترتاژیا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز لکوس ژنی ITS۱ و ITS۲ با توجه به پرایمرهای اختصاصی و در نظر گرفتن شرایط بهینه PCR صورت پذیرفت.

الکتروفورز محصول PCR: در همه نمونه‌های تحت بررسی اندازه محصول PCR برابر با ۹۴۶ جفت باز بوده است. ۹۴۶ جفت باز شامل قسمتی از توالی rRNA ۱۸S و توالی‌های کامل ITS۱، ITS۲ و ۵S شامل همچنین قسمتی از توالی rRNA ۲۸S می‌باشند.

تعیین توالی نمونه‌ها و ثبت در بانک ژن: پس از تکثیر قطعه مربوط،

انتقال یافت و بر اساس کلید تشخیص تحت شناسایی قرار گرفت (۵،۱۱). اساس تشخیص بر کرم‌های نر بود و در مجموع تعداد ۱۸۰ نمونه (در سه گونه و از هر گونه ۶۰ عدد) شناسایی شد. در تعیین ویژگی‌های ریختی، علاوه بر شکل اسپیکول‌ها، طول آن‌ها و اندازه کرم نر با روش‌های متریک و ترسیمی تعیین گردید. تجزیه و تحلیل آماری در این بخش از بررسی با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۸ و آزمون t-student انجام گرفت.

بررسی مولکولی: به منظور بررسی مولکولی و تشخیص تفریقی گونه‌های اوسترتاژیا از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و به دنبال آن تعیین توالی نمونه‌ها، استفاده شد.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (MBST, IRAN) از بافت بر اساس دستور شرکت سازنده انجام شد. تعیین هویت DNA استخراج شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد در ضمن الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ V (بمدت تقریبی چهل و پنج دقیقه) صورت پذیرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR): برای انجام PCR قسمتی از ژن مربوط به rDNA مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرها از ترادف Ostertagia ostertagi موجود در بانک ژن با شماره دستیابی KC۹۹۸۷۱۱ با استفاده از نرم افزار NII vector ۱۱ طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده بطول ۲۰ جفت باز تحت عنوان Ost-Ir-F و Ost-Ir-R عبارتند از:

Ost-Ir-F: ۵'GCGGGAACAGTTCAATCGC۳'

Ost-Ir-R: ۵'TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT۳'

واکنش در حجم ۱۰۰ μl انجام گرفت. نمونه‌ها بمنظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در دستگاه ترموسایکلر (شرکت بیوراد) قرار گرفتند و قطعه هدف در دمای اتصال ۵۷°C و با ۳۸ نوبت تکرار تکثیر شد. با هر بار آزمایش کنترل منفی بنام NTC (فاقد DNA)، همچنین کنترل مثبت (دارای DNA)، همراه با سایر نمونه‌ها، آزمایش شد.

۱μl محصول PCR به دست آمده توسط کیت تخلیص محصول PCR (MBST-IRAN) به طور جداگانه برای هر نمونه تحت خالص سازی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد و پس از اطمینان از حضور DNA که در عکسبرداری از ژل به صورت باندهای با طول ۹۴۶ bp مشخص بودند، نمونه‌ها برای تعیین توالی آماده سازی گردیدند.

تعیین توالی و درخت شجره‌ای: هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه به میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ ml انتقال یافت و ضمن بستن درب آن‌ها (با پارافیلیم) و ثبت کامل مشخصات برای خوانش دوطرفه به شرکت کاوش

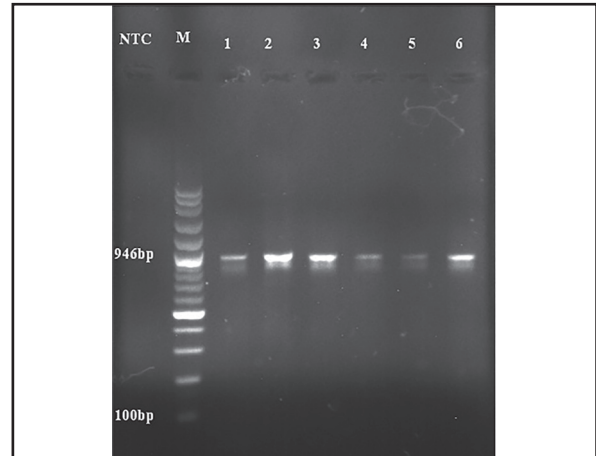


محصولات PCR بطول ۹۴۶ bp که دارای باندهای مشخصی بودند جهت تعیین توالی به شرکت کاوش فناوری کوثر ارسال گردید و ترادف نوکلئوتیدی لکوس ژنی ITS۱ و ITS۲ در نمونه‌های مختلف تعیین شد. سپس توالی‌های حاصل با اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن توسط ابزار بلاست مقایسه گردید. خلاصه نتایج در درخت شجره‌ای در تصویر ۴ مشاهده می‌شوند. تعداد دو نمونه با شماره‌های KC۲۹۵۴۱۷ و KC۲۹۵۴۱۸ مربوط به اوسترتاژیا اکسیدنتالیس، یک نمونه با شماره دستیابی KC۲۹۵۴۲۰ از اوسترتاژیا سیرکومسینکتا و یک نمونه از اوسترتاژیا تریفورکاتا به شماره KC۲۹۵۴۱۹ در بانک ژن ثبت گردید.

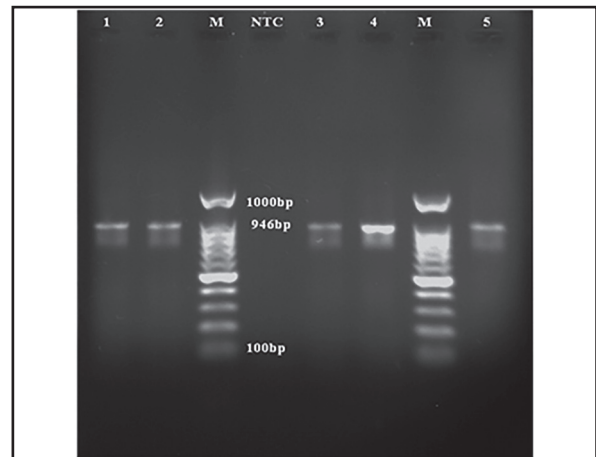
تصویر ۴ دندروگرام حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی مطالعه حاضر را با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۵ توسط روش Maximum parsimony نشان می‌دهد. درخت فیلوژنی نشان می‌دهد که گونه‌های اوسترتاژیا از ایران (ستاره دار) و گونه‌های ثبت شده از دیگر مناطق دنیا، در ۳ دسته جداگانه و نزدیک بهم A, B, C، و توالی‌های مارشالاژیا مارشالی و مارشالاژیا اکسیدنتالیس نیز در دسته جداگانه D قرار دارند. هرچهار دسته نزدیک بهم و بعبارت دیگر چهار دسته خواهری هستند. توالی همونکوس کونتوروس بعنوان توالی خارج گروه در درخت فیلوژنی قرار گرفت.

بحث

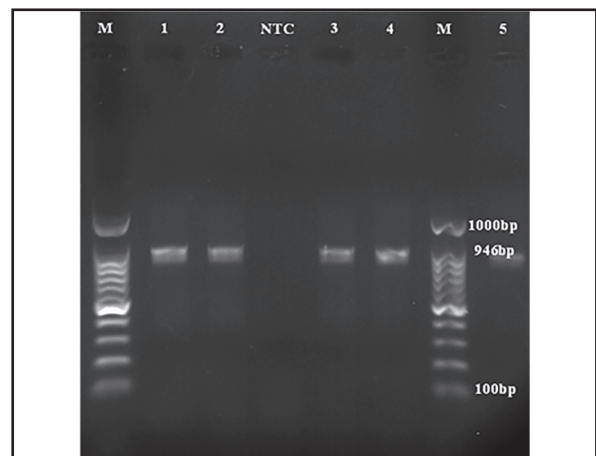
به منظور تعیین هویت سه گونه شایع تلادورساژیا در ایران شامل اوسترتاژیا سیرکومسینکتا، اوسترتاژیا اکسیدنتالیس و اوسترتاژیا تریفورکاتا با توجه به خصوصیات مولکولی بررسی حاضر به مرحله اجرا در آمد (لکوس‌های ITS۱، ITS۲، ۵S/۸S تحت بررسی قرار گرفت). جنس اوسترتاژیا قرار گرفته در دون خانواده اوسترتاژینه بنا بر عقیده داسکالو و سپس لیختنفلس و همکاران به عنوان نامتودی پلی مورفیک توصیف شده است (۴، ۱۱). در این مطالعات تأکید بر کرم بالغ بالغ بوده است، لذا همواره شناسایی گونه‌های موجود در این جنس بر حسب ویژگی‌های ریختی از زمان‌های دور و در بررسی‌های واپس نگر و تعیین هویت آن‌ها بر اساس خصوصیات مولکولی در یکی دو دهه اخیر مد نظر بوده است. در پژوهش حاضر که بمنظور بررسی ویژگی‌های مولکولی صورت پذیرفت در الگوی الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز هر سه گونه باند ۹۴۶ جفت باز قابل تشخیص بود و در ادامه که نمونه پس از خالص سازی تحت تعیین توالی قرار گرفت، نتایج نشان داد که ترادف نوکلئوتیدی سه گونه با یکدیگر اختلاف ۲-۳٪ دارند که اضافه بر آن اختلاف اندکی نیز بین ترادف‌های مذکور و اطلاعات ثبت شده در بانک جهانی ژن وجود دارد، برای مثال اوسترتاژیا سیرکومسینکتا تشابه صد درصد، در قیاس با اطلاعات بانک ژن دارد و در مورد دو گونه دیگر میزان تشابه در محدوده ۹۷٪ تا ۹۹٪ با توالی مربوط به اوسترتاژیا سیرکومسینکتا و مارشالاژیا مارشالی دیده می‌شود. قابل ذکر است که از دو گونه اوسترتاژیا سیرکومسینکتا و اوسترتاژیا



تصویر ۱. نتیجه الکتروفورز محصول PCR به اندازه ۹۴۶ جفت باز از اوسترتاژیا سیرکومسینکتا. NTC کنترل منفی، (M مارکر ۱۰۰ bp) (۱-۵) نمونه‌های اوسترتاژیا سیرکومسینکتا، (۶) کنترل مثبت.

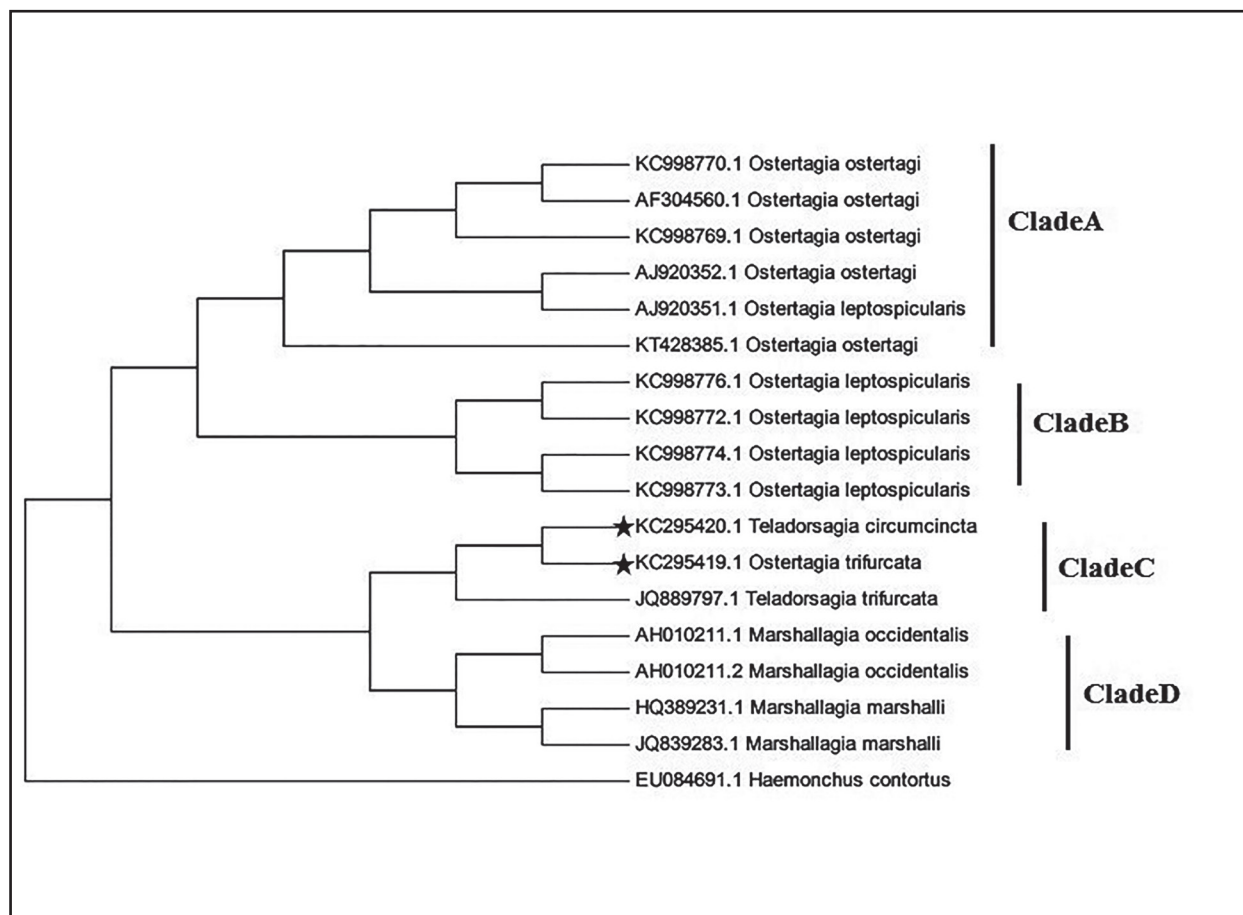


تصویر ۲. نتیجه الکتروفورز محصول PCR به اندازه ۹۴۶ جفت باز از اوسترتاژیا اکسیدنتالیس. از چپ به راست بترتیب: (۱-۲) نمونه‌های اوسترتاژیا اکسیدنتالیس، (M مارکر ۱۰۰ bp) NTC کنترل منفی، (۳-۴) نمونه‌های اوسترتاژیا اکسیدنتالیس، (M مارکر ۱۰۰ bp) کنترل مثبت.



تصویر ۳. نتیجه الکتروفورز محصول PCR به اندازه ۹۴۶ جفت باز از اوسترتاژیا تریفورکاتا. از چپ به راست بترتیب: (M مارکر ۱۰۰ bp) (۱-۲) نمونه‌های اوسترتاژیا تریفورکاتا، (NTC کنترل منفی، (۳-۴) نمونه‌های اوسترتاژیا تریفورکاتا، (M مارکر ۱۰۰ bp) کنترل مثبت.





تصویر ۴. درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز داده‌های کمپلکس DNA ریبوزومی گونه‌های تادورساژیا از جدایه‌های ایران (ستاره دار) و سایر مناطق دنیا.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی ITS۱ و ITS۲ مارشالاجیا مارشالی و مارشالاجیا اکسیدنتالیس نشان دادند، این دو گونه کاملاً یکسان هستند. در مورد جنس کوپریا از نماتودهای تریکوسترونژیلید و دون خانواده کوپرینه نیز مشخص شده است که دو گونه کوپریا سارنابادا و کوپریا انکوفورا در واقع یک گونه هستند (۱،۱۲).

تادورساژیا گروه‌بری و تادورساژیا آرکتیکا همچنین تادورساژیا سیرکومسینکتا، تادورساژیا تریفورکاتا و تادورساژیا داوتیانی بر اساس ویژگی‌های مولکولی یک گونه واحد محسوب می‌شوند (۲،۱۳). نتایج ریخت‌شناسی و بررسی مورفومتری اسپیکول‌های سه گونه اوسترتاژیا در بررسی حاضر موید یافته‌های محققین پیشین است بطوریکه بر اساس ویژگی‌های قابل اندازه‌گیری نظیر طول اسپیکول‌ها و ساختارهای ریختی اسپیکول این سه گونه بوضوح قابل تفریق هستند.

در واقع این تحقیق نشان می‌دهد، خصوصیات ریختی در تفریق گونه‌های تادورساژیا قابل استفاده‌اند همچنین با توجه به ویژگی‌های مولکولی مبتنی بر ITS و ترادف‌های نوکلئوتیدی به دست آمده اختلاف ۲-۳٪ بین آن‌ها وجود دارد. با در نظر گرفتن خصوصیات میزبانی و شرایط متغیر اقلیمی پیشنهاد می‌گردد که پراکندگی این گونه‌ها در نقاط مختلف کشور مورد بررسی قرار گیرد.

اوسترتاژیا بالغ بر ۳۰۰۰ توالی (مرتبط با ژن‌های کد شونده ویا غیر آن) ثبت شده در بانک جهانی ژن وجود دارد، ولی در مورد دو گونه اوسترتاژیا اکسیدنتالیس و اوسترتاژیا تریفورکاتا ترادف‌های ثبت شده بسیار اندک است (۴ توالی ثبت شده است)، لذا آیا واقعا دو گونه اخیر برای محققان در ارتباط با ژنتیک مولکولی نماتودها سوال برانگیز نبوده یا اهمیتی نداشته اند؟ بنظر می‌رسد بدلیل شیوع بیشتر این دو گونه تحقیقات بیشتر بر آن‌ها متمرکز شده است اما در ایران هر سه گونه اوسترتاژیا در دام‌های سراسر کشور گزارش شده اند (۶،۷).

تا کنون در زمینه مطالعات مولکولی بر روی کرم‌ها، در چندین بررسی از ناحیه ITS برای تعیین هویت نماتودها استفاده شده است (۵،۷،۱۴) که شامل جنس‌های نظیر تریکوسترونژیلوس، تادورساژیا و نماتودیروس بوده‌اند. توالی ITS۲-rDNA در ۴ گونه نماتودیروس شامل (نماتودیروس ثورآتیانوس، نماتودیروس داوتیانی، نماتودیروس ائوروپاتوس و نماتودیروس ریپی کاپره) از آهوی قرمز و بز کوهی آبی تعیین شده است. توالی ژن ITS۲ در این چهار گونه اختلاف داشته و تفاوت توالی در این ۴ گونه از ۵/۹٪ تا ۹/۷٪ گزارش شده است (۷،۸).

جای آن است که به بررسی Dallas و همکاران در سال ۲۰۰۱ و چندین بررسی دیگر در ارتباط با بحث حاضر اشاره شود، محققین مذکور با



References

- Dallas, J.F., Irvine, R.J., Halvorsen, O. (2001) DNA evidence that *Marshallagia marshalli* Ransom, 1907 and *M. occidentalis* Ransom, 1907 (Nematoda: Ostertagiinae) from Svalbard reindeer are conspecific. *Systema Parasitol.* 50: 101-103.
- Dallas, J.F., Irvine, R.J., Halvorsen, O. (2000) DNA evidence that *Ostertagia gruehneri* and *Ostertagia arctica* (Nematoda: Ostertaginae) in reindeer from Norway and Svalbard are conspecific. *Int J Parasitol.* 30: 655-658.
- Dallas, J.F., Irvine, R.J., Halvorsen, O., Albon, S.D. (2000) Identification by polymerase chain reaction (PCR) of *Marshallagia marshalli* and *Ostertagia gruehneri* from Svalbard reindeer. *Int J Parasitol.* 30: 863-866.
- Daskalov, P. (1974) On the reproductive relationships between *Ostertagia circumcincta*, *Teladorsagia davtiani* and *O. trifurcata* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Izvestiya na Tsentralnata Khelminthologichna laborator*, 17: 59-72. (In Russian).
- Drozdz, J. (1995) Polymorphism in the ostertagiinae (Lopez-Neyra, 1947) and comments on the systematic of these nematodes. *Systema Parasitol.* 32: 91-99.
- Eslami, A., Nabavi, L. (1976) Species of gastrointestinal parasites of sheep from Iran. *Bull. Soc Path Exo.* 69: 192-195.
- Gasser, R.B., Newton, S.E. (2000) Genomic and genetic research on bursate nematodes. significance, implications and prospects. *Int J Parasitol.* 30: 509-534.
- Heise, M., Epe, C., Schnieder, T. (1999) Differences in the second internal transcribed spacer (ITS2) of eight species of gastrointestinal nematodes of ruminants. *J Parasitol.* 85: 431-435.
- Hoste, H., Chilton, N.B., Gasser, R.B., Beveridge, I. (1995) Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Int J Parasitol.* 25: 75-80.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1870-1874.
- Lichtenfels, J.R., Hoberg, E.P., Zarlenga, D.S. (1997) Systematics of gastrointestinal nematodes of domestic ruminants: advances between 1992 and 1995 and proposals for future research. *Vet Parasitol.* 72: 225-238.
- Newton, L.A., Chilton, N.B., Beveridge, I., Gasser, R.B. (1998) Genetic evidence indicating that *Cooperia surnabada* and *Cooperia oncophora* are one species. *Int J Parasitol.* 28: 331-336.
- Stevenson, L.A., Gasser, R.B., Chilton, N.B. (1995) The ITS2 rDNA of *Teladorsagia circumcincta*, *T. trifurcata* and *T. davtiani* (Nematoda: Trichostrongylidae) indicates that these taxa are one species. *Int J Parasitol.* 26: 1123-1126.
- Zarlenga, D.S., Hoberg, E.P., Srengfellow, F., Lichtenfels, J.R. (2001) Comparisons of two polymorphic species of *Ostertagia* and phylogenetic relationships within the Ostertaginae (Nematoda: Trichostrongyloidea) inferred from rDNA repeat and mitochondrial DNA sequences. *J Parasitol.* 84: 806-812.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری سرکار خانم نرگس امینی، کارشناس محترم گروه انگل‌شناسی و معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی در انجام تحقیق حاضر تشکر نمایند.



Phylogenetic study of *Ostertagia* species

Sabor Drbandi, M., Jalousian, F.*, Meshgi, B.

Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran (Center of Excellent of Ecosystem and Ultrastructural changes of Helminthes)

(Received 4 April 2017, Accepted 30 May 2017)

Abstract:

BACKGROUND: *Ostertagia* species are the main domestic ruminants abomasum worms, which cause parasitic gastritis. Parasitic gastritis is associated with disruption of the endocrine structure of abomasum, and influence the function and pH of abomasums. This can lead to weight loss, reduced milk and wool production with potentially mal-digestion of proteins. These cause the economic loss to animal husbandry industry. So, the national research priority in veterinary parasitology is identification of different native species of *Ostertagia* in Iran. **OBJECTIVES:** The main purpose of this study is identification and differentiation of *Ostertagia* species based on the molecular characterization. **METHODS:** During carcasses inspection at different abattoirs in Rey, Tehran, Mashhad and Bandar Abbas, 180 adult male worms of *Ostertagia* species from sheep and goat were collected. Morphological analysis was performed based on the morphometric characteristics of spicules. The ITS1, 5.8s and ITS2 ribosomal DNA was amplified from individual worms by polymerase chain reaction (PCR) and then purified PCR product were sequenced and analyzed by Blast tool. **RESULTS:** 946 bp PCR products for all sequenced samples were compared with the released sequences of *Ostertagia* isolates available from GenBank and showed 2-3% differences and 97-98% similarity. **CONCLUSIONS:** The three species included in the present study are different in terms of molecular property (with 2-3% difference) and it is necessary to determine transmittance pattern and host affinity rules from each one to be used by program managers and evaluators for Prevention and Control programs.

Keyword: *Ostertagia*, Molecular genotyping, ITS2

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The morphometric characterisation of spicules in three *Ostertagi* species (μ).

Figure 1. Agar gel electrophoresis of PCR product of *O.circumcincta* (946 bp), Lane 1-5: DNA samples, NTC: Negative DNA control, M: DNA marker, 6) Positive DNA control.

Figure 2. Agar gel electrophoresis of PCR product of *O.occidentalis* (946 bp), Lane 1-4: DNA samples, NTC: Negative DNA control, M: DNA marker, 5) Positive DNA control.

Figure 3. Agar gel electrophoresis of PCR product of *O.trifurcata* (946 bp), Lane 1-4: DNA samples, NTC: Negative DNA control, M: DNA marker, 5) Positive DNA control.

Figure 4. Phylogenetic relationships of *Ostertagi* species based on record sequences, from Iran (). Phylogenetic analysis were conducted in Mega 5.

*Corresponding author's email: jalousian_f@ut.ac.ir, Tel: 021-61117161, Fax: 021-66933222

