مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۳، ۲۸۸-۲۸۳
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2017.226031.2577

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 (تلادورساژیا) 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 نربراساس مشخصات مورفومتریک اسپیکول‌ها از دو میزبان گوسفند و بز شناسایی گردیدند، سپس در بخش مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور تکثیر توالی لکوس ITS۱ ، ۵/۸S و ITS۲ 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 سیرکومسینکتا، اوسترتاژیا اکسیدنتالیس و اوسترتاژیا تریفورکاتا از نظر ژنوتایپ مولکولی اختلاف ۳-۲ درصد وشباهت ۹۸-۹۷درصدی دارند. **نتیجه‌گیری نهایی:** سه گونه نماتود 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 قرارگیرد.

واژه‌های کلیدی: : اوسترتاژیا، مولکولی، ITS۲

مقدمه

نماتود جنس اوسترتاژیا (تلادورساژیا) متعلق به دون‌خانواده اوسترتاژینه از نماتودهای تریکوسترونژیلید، در زمره نماتودهای با اهمیت شیردان نشخوارکنندگان بشمار آمده که به دلیل رنگ قهوه‌ای، تحت عنوان کرم قهوه‌ای شیردان هم موسوم است (۳). آلودگی به این نماتود در ایران از نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ نظیر گوسفند، بز، گاو، شتر، گاومیش 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 احتمالا 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 گونه‌ای برای شناسایی اجرام انگلی لازم هستند ولی بنظر می‌رسد کافی نمی‌باشند، چرا که در بسیاری موارد با اینکه دو موجود از نظر ویژگی‌های فنوتیپی کاملا به یکدیگر شبیه‌اند ولی اختلافات ژنوتیپی زیادی دارند که قطعا 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 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 مضاعف می‌نماید.

دو توالی ITS۱ و ITS۲ نشانگر ژنتیکی مطلوبی برای تشخیص نماتودهای تریکوسترونژیلید محسوب می‌شوند. این قطعات از دو طرف به نواحی نسبتاً محافظت شده s۱۸و s۲۸ (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 دردو 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

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۶۱-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: jalousian_f@ut.ac.ir

جدول ۱. مشخصات مورفومتریک اسپیکول در سه گونه تلادورساژیا (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 اکسیدنتالیس	۶۰	۲۸۸	۳۹۹	۳۲۳/۱	±۱۸/۸
اوسترتاژیا تریفورکاتا	۶۰	۲۱۸/۵	۲۳۰	۲۲۲/۳	±۳/۶

انتقال یافت و بر اساس کلید تشخیص تحت شناسایی قرار گرفت (۵،۱۱). اســاس تشخیص بر کرم‌های نر بود و در مجموع تعداد ۱۸۰ نمونه (در سه گونه و از هر گونه ۶۰ عدد) شناســایی شــد. 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.

بررســی مولکولی: به منظور بررســی مولکولی و تشــخیص تفریقی گونه‌های اوسترتاژیا از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و به دنبال آن تعیین توالی نمونه‌ها، استفاده شد.

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (MBST,IRAN) از بافت براساس 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 وپنج دقیقه) صورت پذیرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): برای انجام PCR قســمتی 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 vector NTI ۱۱ طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده بطول ۲۰ جفت‌باز تحت عناوین Ost-Ir-F و Ost-Ir-R عبارتند از:

Ost-Ir-F: ۵'GCGGGAAACAGTTCAATCGC۳'

Ost-Ir-R: ۵'TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT۳'

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

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

تعیین توالی و درخت شــجره‌ایی: هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه به میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ ml انتقال یافت و ضمن بستن درب آن‌ها (با پارافیلم) و ثبت کامل مشخصات برای خوانش دوطرفه به شرکت کاوش فناور کوثر ایران ارســال گردید. نتایج مربوط به توالی‌های به دســت آمده توسط ابزار Blast تحت تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در خاتمه ضمن ثبت نمونه‌های مورد نظر (از هر سه گونه) در بانک جهانی ژن، درخت شجره‌ای با استفاده از نرم‌افزار MEGA ۵ ترسیم گردید (۱۰).

نتایج

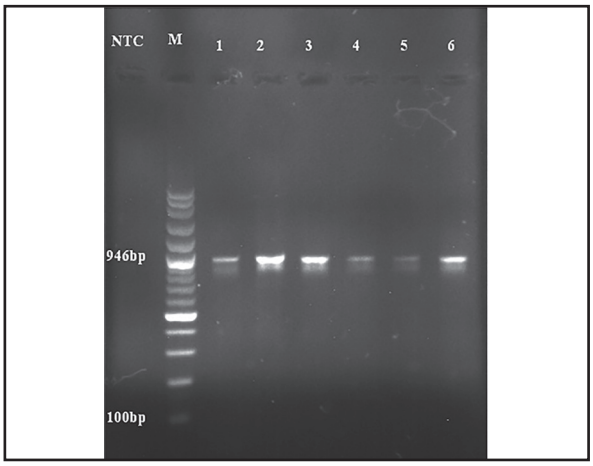
نتایج تشخیص تفریقی کرم‌ها بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی: همانطور که در روش کار هم توضیح داده شــد، از ســه گونه اوســترتاژیا شامل اوسترتاژیا سیرکومسینکتا، اوسترتاژیا اکسیدانتالیس و اوسترتاژیا تریفورکاتــا از هر کــدام تعداد ۶۰ عدد کرم نر بالغ جهت بررســی ریخت-شناسی انتخاب گردید. بدین منظور ویژگی‌های ریختی و اندازه اسپیکول در گونه‌های مختلف تلادورساژیا در نظر گرفته شد.

در اوسترتاژیا سیرکومسینکتا اســپیکول‌ها در انتها دو شاخه، نازک، کشــیده، به رنگ قهوه‌ای و در انتهای شاخه اصلی تکمه‌ای وجود داشت، همچنین شــاخه نازک و نوک تیز مانندی نزدیک به انتهای شــاخه اصلی مشاهده گردید . حداقل و حداکثر اندازه اسپیکول در این گونه به ترتیب µ ۳۶۸ و µ ۴۰۲/۵ بود (جدول ۱). در اوســترتاژیا اکســیدنتالیس اسپیکول‌ها ضخیم، قهوه‌ای پررنگ و هر یک در انتها به سه شاخه پهن تقسیم شده‌اند. ابعاد اســپیکول از µ ۲۸۸ تا µ ۳۹۹ در تغییر بود (جدول ۱). در اوســترتاژیا تریفورکاتا اســپیکول‌ها 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 µ ۲۱۸/۵ و µ ۲۳۰ بود (جدول ۱). میانگین طول اســپیکول‌ها در اوسترتاژیا سیرکومسینکتا (بیشتر از µ ۳۸۰) نسبت به دو گونه دیگر (کمتر از µ ۳۳۰) بوضوح قابل مشاهده است (جدول ۱).

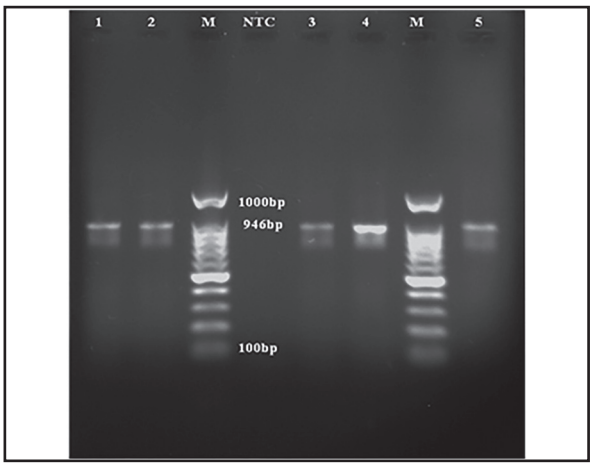
بررســی نتایــج مولکولــی: اســتخراج DNA از کــرم بالغ ســه گونه اوسترتاژیا و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز لکوس ژنی ITS۱ و ITS۲ با توجه بــه پرایمرهای اختصاصــی و در نظر گرفتن شــرایط بهینه PCR صورت پذیرفت.

الکتروفــورز محصــول PCR: در همه نمونه‌های تحت بررســی اندازه محصــول PCR برابر با ۹۴۶ جفت باز بوده اســت. ۹۴۶ جفت باز شــامل قســمتی از توالــی ۱۸S rRNA و توالی‌های کامــل ITS۱ ، ۵/۸S و ITS۲ همچنین قسمتی از توالی ۲۸S rRNA می‌باشند.

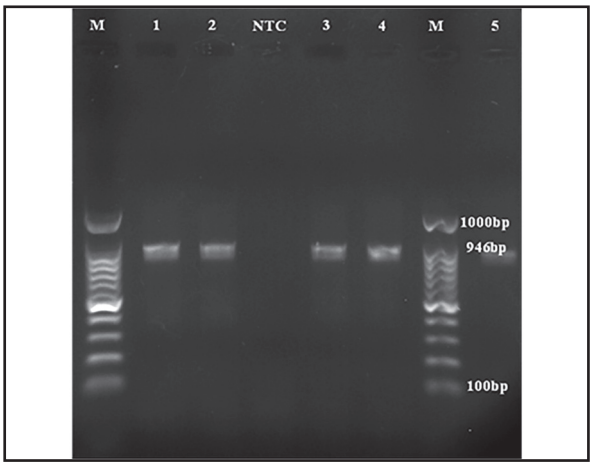
تعیین توالی نمونه‌ها و ثبت در بانک ژن: پس از تکثیر قطعه مربوط،



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



تصویر ۲. نتیجه الکتروفورز محصول PCR به اندازه ۹۴۶ جفت باز از اوسترتاژیا اکسیدنتالیس. ازچپ به راست بترتیب : ۲-۱) نمونه‌های اوسترتاژیا اکسیدنتالیس، (M مارکرbp ۱۰۰، ۱ (NTC کنترل منفی، ۴-۳) نمونه‌های اوسترتاژیا اکسیدنتالیس ، (M مارکرbp ۱۰۰، ۵) کنترل مثبت.



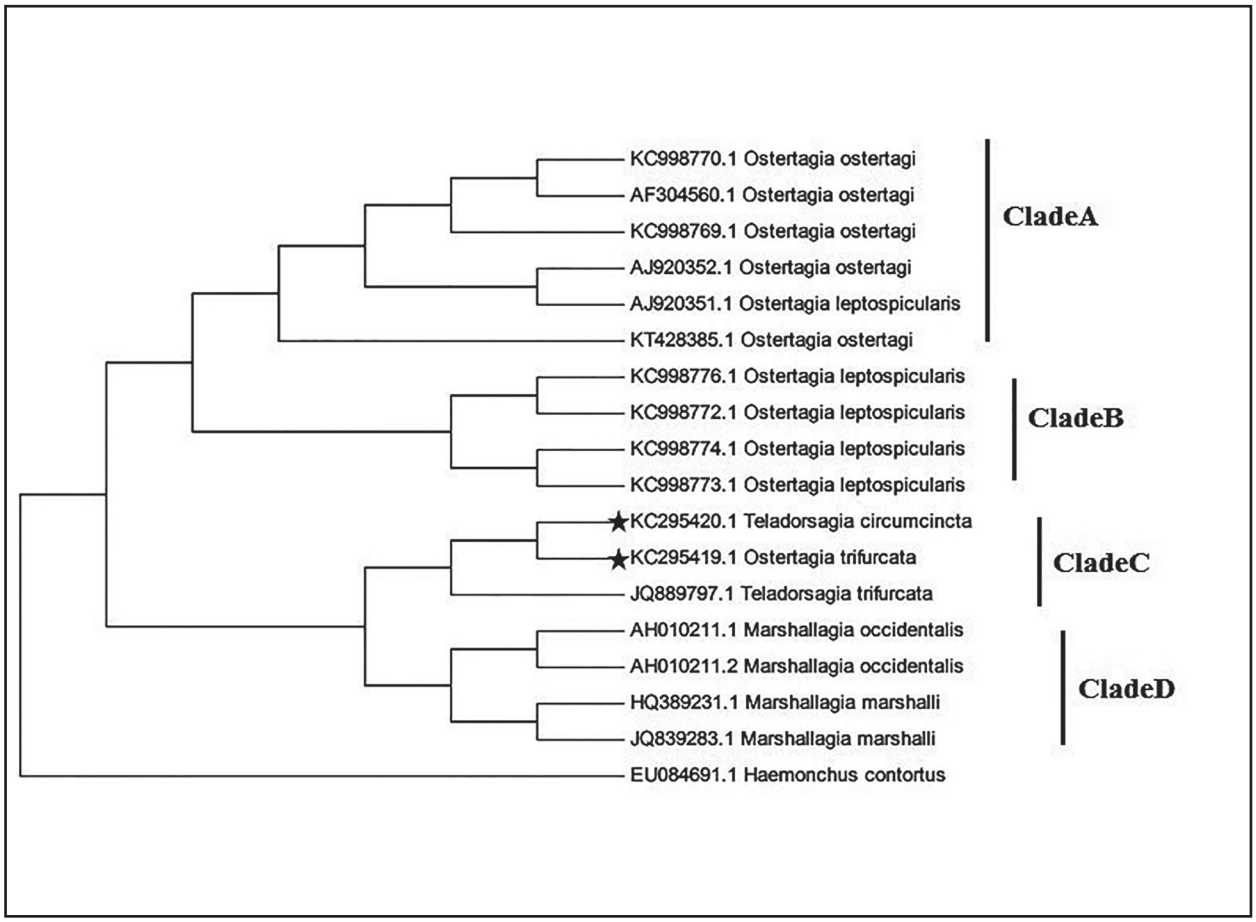
تصویر ۳. نتیجه الکتروفورز محصول PCRبه اندازه ۹۴۶ جفت باز از اوسترتاژیا تریفورکاتا.ازچپ به راست بترتیب : (M مارکرbp ۱۰۰، ۲-۱) نمونه‌های اوسترتاژیا تریفورکاتا، ۱ (NTC کنترل منفی، ۴-۳) نمونه‌های اوسترتاژیا تریفورکاتا، (M مارکرbp ۱۰۰، ۵) کنترل مثبت.

محصولات PCR بطول bp ۹۴۶ که دارای باندهای مشخصی بودند جهت تعیین توالی به شرکت کاوش فناور 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 و 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 بهمA,B,C ، وتوالی‌های مارشالاژیا مارشالی و مارشالاژیا اکسیدنتالیس نیزدر دسته جداگانه D قراردارند. هرچهار دسته نزدیک بهم و بعبارت دیگرچهار دسته خواهری هستند. توالی همونکوس کونتورتوس 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، ۵/۸S تحت بررسی قرار گرفت). جنس اوسترتاژیا قرار گرفته در دون خانواده اوسترتاژینه بنابر عقیده داسکالو و سپس لیختنفلس و همکاران به عنوان نماتودی پلی‌مورفیک توصیف شده است (۴،۱۱). در این مطالعات تأکید بر کرم 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 ۹۴۶جفت 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 مارشالاجیا مارشالی دیده می‌شود. قابل ذکر است که از دو گونه اوسترتاژیا سیرکومسینکتا و اوسترتاژیا



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

اوسترتاژی بالغ بر ۳۰۰۰ توالی (مرتبط با ژن‌های کد شونده ویا غیر آن) ثبت شده در بانک جهانی ژن وجود دارد، ولی در مورد دوگونه 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 دوگونه تحقیقات بیشتر بر آن‌ها متمرکز شده است اما درایران هر سه گونه اوسترتاژیا دردام‌های 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، تلادورساژیا و نماتودیروس بوده‌اند. توالی rDNA- ITS۲ در ۴ گونه نماتودیروس شامل (نماتودیروس ئوآرتیانوس، نماتودیروس داوتیانی، نماتودیروس ائوروپاتوس و نماتودیروس ریپی‌کاپره) از آهوی قرمز و بز کوهی آلپی 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 سال۲۰۰۱ و چندین بررسی دیگر در ارتباط با بحث حاضر اشاره شود، محققین مذکور با تعیین ترادف نوکلئوتیدی ITS۲ و ITS۱ مارشالاجیا مارشالی و مارشالاجیا اکسیدنتالیس نشان دادند، این دو گونه کاملا 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).

تلادورساژیا گروهنری و تلادورساژیا آرکتیکا همچنین تلادورساژیا سیرکومسینکتا، تلادورساژیا تریفورکاتا و تلادورساژیا داوتیانی بر اساس ویژگی‌های مولکولی یک گونه واحد محسوب می‌شوند (۲،۱۳). نتایج ریخت شناسی و بررسی مورفومتریک اسپیکول‌های سه گونه اوسترتاژیا در بررسی حاضر موید یافته‌های محققین پیشین است بطوریکه بر اساس ویژگی‌های قابل اندازه گیری 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 تلادورساژیا 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.

تشکر و قدردانی

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

References

1. 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.
2. Dallas, J.F., Irvine, R.J., Halvorsen, O. (2000) DNA evidence that Ostertagia gruehhneri and Ostertsgia arctica (Nematoda: Ostertaginae) in reindeer from Norway and Svalbard are conspecific. Int J Parasitol. 30: 655-658.
3. 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.
4. Daskalov, P. (1974) On the reproductive relationships between Ostertagia circumcincta, Teladorsagia davtiani and O.trifurcate (Nematoda: Trichostrongylidae). Izvestiya na Tsentralnata Khelminthologichna laborator, 17: 59-72. (In Russian).
5. Drozdz, J. (1995) Polymorphism in the ostetagiinae (Lopez-Neyra, 1947) and comments on the systematic of these nematodes. Systema Parasitol. 32: 91-99.
6. Eslami, A., Nabavi, L. (1976) Species of gastrointestinal parasites of sheep from Iran. Bull. Soc Path Exo. 69: 192-195.
7. Gasser, R.B., Newton, S.E. (2000) Genomic and genetic research on bursate nematodes. significance, implicatins and prospects. Int J Parasitol. 30: 509-534.
8. 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.
9. Hoste, H., Chiton, N.B., Gasser, R.B., Beveridge, I. (1995) Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of Trichstrongylus (Nematoda: Trichostrongylidae). Int J Parasitol. 25:75-80.
10. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol. 33: 1870-1874.
11. 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.
12. 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.
13. Stevenson, L.A., Gasser, R.B., Chilton, N.B. (1995) The ITS2 rDNA of Teladorsagia circumcincta, T. trifurcate and T.davtiani (Nematoda: Trichostrongylidae) indicates that these yaxa are one species. Int J Parasitol. 26: 1123-1126.
14. Zarlenga, D.S., Hoberg, E.P., Sreingfellow, F., Lichtenfels, J.R. (2001) Comparisons of tow polymorphic species of Ostertagia and phylogenetic relationships within the Ostertaginae (Nematoda: Trichosreongyloidea) inferred from rDNA repeat and mitochondrial DNA sequences. J Parasitol. 84: 806-812.

Phylogenetic study of *Ostertagia* species

Sabor Darbandi, 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 ampilified 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**