جداسازی و تشخیص مولکولی انگل *Bothriocephalus acheilognathi* (خانواده بوتریوسفالیده) جداسازی شده از ماهیان برخی منابع آبی کازرون به روش PCR

علیرضا گلچین منشادی [1*]
مهدی عمادی [1]
مریم شهریور [1]

۱. دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

* **نویسنده مسئول مکاتبات**
dr.golchin@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۷

این مقاله برگرفته از پایان نامه می‌باشد.

چکیده

به منظور شناسایی سستودهای ماهی‌های رودخانه شاپور و چشمه سید حسین در سال ۱۴۰۲ تعداد ۳۸ عدد ماهی از ۴ گونه کپور ماهی شامل *Albumus mossulensis*، *Cyprnion macrostomum*، *Capoeta barrosisi* و *Garra rufa* صید شده و بصورت زنده به وسیله کیسه پلاستیکی به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون منتقل گردید. نمونه‌ها در این آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بیهوش کردن ماهیان ابتدا عملیات بیومتری جهت شناسایی ماهیان انجام شد و محوطه بطنی و احشاء آن‌ها از نظر وجود سستودها بررسی شدند. نتایج نشان داد که فقط سستود جنس بوتریوسفالوس *Bothriocephalus* sp. از روده جنس ماده ماهی برگ بیدی جداسازی و شناسایی گردید. ۴۰ درصد از ماهیان برگ بیدی به انگل بوتریوسفالوس آلوده و سایر ماهی‌ها به این انگل آلوده نبودند. در مرحله بعد انگل بوتریوسفالوس به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفت و محصول PCR و آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن ITS-1, 5.8S و ITS-2 نشان داد شباهت ۸۸ درصدی بین نمونه مورد آزمایش با نمونه گونه *B. acheilognathi* استاندارد با شماره شناسایی KP099579.1 وجود دارد. لذا بررسی مولکولی برای شناسایی انگل‌ها می‌تواند در تأیید تشخیص انگل‌ها اهمیت شایانی داشته باشد. همچنین داشتن اطلاعات کافی از آلودگی‌های انگلی و میزبان‌های آن‌ها در یک منطقه، می‌تواند کمک موثری به جلوگیری از خسارت‌های زیانبار اقتصادی نماید.

واژگان کلیدی: انگل روده‌ای، کپور ماهیان، جداسازی مولکولی، رودخانه شاپور، چشمه سید حسین.

مقدمه

در آلودگی ناشی از سستودهای روده‌ای معمولاً، شکم برآمده و ماهیان ضعیف، لاغر و بی‌اشتها می‌شوند. کم‌خونی و خونریزی در دستگاه گوارش دیده می‌شود. در موارد پیشرفته لاغری مفرط، اتساع شکم و شنا کردن در سطح آب نیز دیده می‌شود. آبشش‌ها به دلیل کم‌خونی ناشی از اختلال در جذب ویتامین B_{12} کم‌رنگ هستند. در کالبد گشایی انگل‌ها خصوصاً بوتریوسفالوس عمدتاً در بخش پیش روده تجمع و باعث انسداد روده شده و حتی گاهی به محوطه حلقی وارد می‌شوند. در محل اتصال بادکش ایجاد خونریزی نقطه‌ای و نواری کرده و حتی گاهی باعث نکروز و نازک شدن دیواره روده می‌شوند، به طوری که ممکن است دیواره روده پاره گردد. در مواردی مانند آلودگی به انگل لیگولا (*Ligula* sp.) که ماهی میزبان واسط بوده و مرحله پلروسرکوئید در محوطه بطنی مشاهده می‌شود و ماهیان علائمی همچون بی‌اشتهایی، لاغری مفرط، اتساع شکم، کم خونی، تیرگی رنگ ، عدم تعادل و عقیمی را نشان می‌دهند. عقیمی بدلیل اثر مستقیم انگل روی غدد تناسلی یا اثر سمی انگل روی هیپوفیز و هورمون‌های مترشحه آن است. اگر تعداد انگل‌ها در محوطه بطنی زیاد باشد، پاره شدن دیواره شکمی دور از انتظار نیست. انگل می‌تواند در محوطه بطنی مثل کبد، کلیه ،کیسه هوایی و غدد تناسلی حضور داشته باشد (جلالی، ۱۳۷۷).
بوتریوسفالوزیس که عامل آن گونه‌های انگل بوتریوسفالوس از سستودهای بیماریزای ماهی است، به‌صورت گسترده‌ای در مزارع پرورش ماهی کشور شیوع داشته و تلفات عمده‌ای در بچه ماهیان کپور معمولی و کپور علفخوار ایجاد کرده و یا منجر به کاهش رشد در ماهیان یک و دو ساله می‌شود و در نتیجه ضایعات اقتصادی زیادی را به موسسات پرورش ماهی وارد می‌کند. بیماری شایع دیگری که در بعضی گونه‌های مهم و اقتصادی ماهیان مانند سیم و کلمه در اکثر منابع آبی شیرین کشور وجود دارد، لیگولوزیس است که با توجه به ضایعات

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]

خاص آن بر روی سیستم تناسلی ماهی به عقیم شدن آن‌ها منجر شده و باعث کاهش ذخایر این ماهیان می‌شود (پوررنگ، ۱۳۶۹). مخیر (۱۳۵۹) بوتریوسفالوس گوکونژنزیس (*B.goukongensis*) را در گونه‌های متعددی از کپور ماهیان رودخانه سفید رود و کاریوفیلئوس فیمبریسپس (*Caryophyllaeus fimbriceps*) را از روده ماهی کپور گزارش کرده است. در همین گزارش، پلروسرکوئید دیفیلوبرتریوم لاتوم (*Diphyllobothrium latum*) در سس ماهی رودخانه سفید رود معرفی شده است. کورالوبوتریوم (*Corallobothrtum sp.*) در ماهیان رودخانه به‌وسیله .Ebrahim zadeh و kilang- Damavandi (۱۹۷۷) و کاویا آرمنیکا (*Kawia armenica*) در سیاه ماهیان به وسیله Williams و همکاران (۱۹۸۰) معرفی شدند. گزارش‌های متعددی در مورد آلودگی ماهیان با کرم لیگولا در دریاچه سد اکباتان همدان (شکریان، ۱۳۶۶)، دریاچه هامون (روحانی، ۱۳۷۳) و رودخانه زرینه رود (پورضرغام، ۱۳۷۴) وجود دارد. اسبله ماهیان رودخانه زرینه رود نیز آلودگی به دو سستود پروتوسفالوس اسکولاتوس (*Protocephahus osculatus*) و گونه‌ای از جنس بوتریوسفالوس را در مطالعه ظهیر مالکی (۱۳۷۲) نشان دادند. همچنین آلودگی کپور ماهیان پرورشی در کلیه نقاط کشور با بوتریوسفالوس و همچنین دیگراما (*Digrama sp.*) و لیگولا در ماهیان کلمه و سیم و سایر گونه‌های کپور ماهیان با کاریوفیلئوس مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از انجام این مطالعه در وهله اول شناسایی و بررسی میزان آلودگی به سستودهای دستگاه گوارش رودخانه شاپور و چشمه سید حسین بود. از آنجایی که این مطالعه برای نخستین بار در این مناطق انجام می‌گیرد، نتایج آن می‌تواند اطلاعات و وضعیت آلودگی به انگل‌های سستود ماهیان منطقه را ارزیابی و ارتقاء دهد. ضمن این‌که جداسازی و شناسایی انگل‌های ماهی برای حفظ سلامت آن و جلوگیری از خسارات اقتصادی مهم است و با اطلاع از میزان شیوع آلودگی می‌توان با ارایه راهکارهای مناسب در جهت کاهش یا از بین بردن آلودگی‌های انگلی اقدامات لازم را انجام داد. از طرفی بررسی مولکولی انگل‌های جداسازی شده در ماهیان مناطق یاد شده کمک موثری به شناسایی دقیق‌تر انگل‌های جداسازی شده می‌نماید.

مواد و روش‌ها

رودخانه شاپور با طول ۲۲۰ کیلومتر، از ارتفاعات شمال شرقی کازرون از چشمه رنجان سرچشمه گرفته و در تنگ چوگان به چشمه ساسان متصل می‌شود و با عبور از میان دریاچه آب شیرین ارژن و پریشان در امتداد جنوب غربی به شمال شرق ادامه پیدا می‌کند. این رود سپس از ناحیه غربی کازرون گذشته و پس از دریافت آب رودخانه شکستیان و طی یک مسیر کوهستانی، وارد دشت خشت شده و پس از آبیاری بیش از ۲ هزار هکتار از زمین‌های کشاورزی این منطقه و اتصال چند شاخه فرعی دیگر به آن، در نزدیکی روستاهای جره بالا و میلک، وارد دشت شبانکاره شهرستان دشتستان استان بوشهر می‌شود. این رودخانه در استان بوشهر به رود دالکی پیوسته و با نام رود حلّه، به خلیج فارس می‌ریزد (محسنی بیله سوارچی و همکاران، ۱۳۹۹).

در این مطالعه که بر روی این حوضه آبی صورت گرفت، ۳۸ عدد ماهی در سال ۱۴۰۲ از کپور ماهیان رودخانه شاپور و چشمه سید حسین کازرون در بامداد بوسیله دام گوشگیر و ساچوک دستی صید شده، بصورت زنده بوسیله کیسه پلاستیکی (به نحوی که یک چهارم کیسه از آب رودخانه و الباقی آن با گاز اکسیژن پر شده و درب آب با حرارت بسته شده بود)، به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون منتقل گردیده و در آکواریوم نگهداری شدند. برای این منظور چهار ایستگاه نمونه‌گیری به فاصله ۱۰۰ متر در رودخانه شاپور و چهار ایستگاه نمونه‌گیری در منطقه شمال، جنوب، شرق و غرب چشمه سید حسین جهت نمونه‌گیری در نظر گرفته شد. شناسایی ماهی‌ها بر اساس کلیدهای شناسایی Coad (۱۹۹۵) انجام گرفت که شامل چهار گونه کپور ماهی *Albumus mossulensis* (۱۸ عدد)، *Cyprnion macrostomum* (۵ عدد)، *Capoeta barrosisi* (۱۰ عدد) و *Garra rufa* (۵ عدد) بودند (جدول ۲). پس از بیهوش نمودن ماهی‌ها، اندام‌های احشایی مورد بررسی انگل‌شناسی قرار گرفتند. برای این منظور ابتدا محتویات روده ماهیان به‌طور جداگانه درون الک ۱۰۰ میکرون تخلیه و پس از شستشو در داخل یک پلت به‌وسیله استرئومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. تثبیت و شفاف سازی نمونه‌های انگلی با استفاده از دستورالعمل‌های Fernando و همکاران (۱۹۷۲) انجام گردید. شناسایی سستودهای جداسازی

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]

شده با استفاده از کلید شناسایی Gussev (۱۹۸۵ و ۱۹۸۷) انجام شد. پس از پایان پژوهش، نتایج در فرم اطلاعاتی ثبت و نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ و آزمون آماری مجذور کای مورد بررسی قرار گرفتند.

پرایمرهای اختصاصی این انگل به‌منظور تکثیر منطقه ITS-1, 5.8S و ITS-2 توسط Luo و همکاران (۲۰۰۲) طراحی گردید که توسط شرکت سیناژن تهیه و جهت این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و توالی نوکلئوتیدهای آن‌ها بدین ترتیب می‌باشد.

BD1 (5’ -GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA- 3’) (Forward)

BD2 (5’ -TAT GCT TAA GTT CAG CGG GT- 3’) (Reverse)

استخراج DNA با استفاده از کیت High Pure PCR Template Prepration Kit با نام تجاری Roche انجام شد. برای تهیه مخلوط PCR از اجزاء زیر جهت ساخت ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط PCR به یک لوله اپندروف ۵۰ میکرولیتر اضافه گردید (Luo *et al*., 2002).

- ۱۰ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)
- ۱۲۵ pmol پرایمر فوروارد (جلو برنده) رقیق شده
- ۱۲۵ pmol پرایمر ریورس (عقب برنده) رقیق شده
- ۲۰۰ ng DNA الگوی رقیق شده
- $Mgcl_2$ ۲۰ Mm
- ۲ میکرولیتر از ۰/۸ Mm محلول dNTP
- ۲/۲۵ میکرولیتر آب مقطر (دیونیزه)

واکنش PCR به ترتیب دمایی ذیل بر روی مخلوط PCR توسط دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت (Luo *et al*., 2002) (جدول ۱).

جدول ۱: برنامه دمایی واکنش PCR

برنامه ۱	واسرشتگی یا تقلیب اولیه	۹۴ °C بمدت ۵ دقیقه	یک سیکل
برنامه۲	۱-۲) واسرشتگی (تقلیب) ۲-۲) جفت شدن (اتصال) ۳-۲) گسترش (طویل شدن)	۹۴ °C بمدت ۳۰ ثانیه ۵۶ °C بمدت ۳۰ ثانیه ۷۲ °C بمدت ۱ دقیقه	۴۵ سیکل
برنامه ۳	گسترش نهایی	۷۲ °C بمدت ۵ دقیقه	یک سیکل

محصولات PCR پس از پایان واکنش PCR، براساس روش‌های استاندارد، الکتروفورز شدند. بدین منظور پس از تهیه ژل آگاروز ۱/۵ درصد و قراردادن آن در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE، ۵ میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر رنگ لودینگ (Loadingdye) مخلوط و در داخل چاله‌های ایجاد شده به‌وسیله شانه الکتروفورز تزریق گردید. ضمناً از نشانگر ۱۰۰bp نیز جهت تعیین محل باندهای DNA استفاده گردید. سپس تانک الکتروفورز به دستگاه منبع تغذیه با ولتاژ ۷۵ متصل گردید. پس از پایان الکتروفورز ،ژل مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در داخل رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) جهت ظهور باندهای DNA (۱۲۰۰ pb) قرار داده و نهایتاً باندهای مربوطه توسط دستگاه آشکارساز UV رویت شد (حسینی سالکده و همکاران، ۱۳۸۴). شناسایی انگل بر اساس ژن ITS-1, 5.8S و ITS-2 انجام گرفت. محصولات PCR خالص‌سازی شده جهت انجام تعیین توالی به شرکت شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال گردید و پس از آن توالی نوکلئوتیدی مذکور در سایت بانک ژن (www.ncbi.nih.gov) بوسیله نرم‌افزار بلاست تحت جستجوی همانندسازی قرار گرفت.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]

نتایج

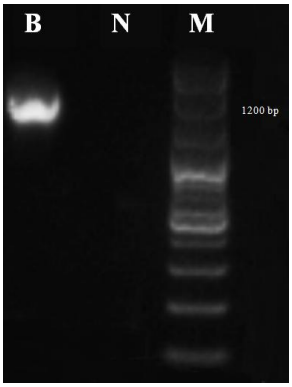
نتایج بررسی آماری نشان داد که از ۳۸ ماهی مورد بررسی در مطالعه حاضر، ۴۰ درصد از ماهیان برگ بیدی و ۱۰/۵ درصد از کل ماهیان مورد بررسی، به انگل بوتریوسفالوس آلوده بودند. لازم به ذکر این که فقط جنس ماده ماهی برگ بیدی آلوده به انگل بوتریوسفالوس بود. در بررسی آماری بین جنسیت و میزان آلودگی رابطه معنی‌داری یافت نشد (P>0/05) (شکل ۱، جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی و درصد فراوانی نسبی ماهیان آلوده در ۴ گروه مورد بررسی به انگل بوتریوسفالوس

گونه	*Cyprnion macrostomum*			*Capoeta barrosisi*			*Albumus mossulensis*			*Garra rufa*		
جنسیت	نر	ماده	کل	نر	ماده	کل	نر	ماده	کل	نر	ماده	کل
ماهیان آلوده	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۴	۴	۰	۰	۰
ماهیان غیرآلوده	۶	۱۲	۱۸	۴	۱	۵	۱	۵	۶	۱	۴	۵
ماهیان مورد بررسی	۶	۱۲	۱۸	۴	۱	۵	۱	۹	۱۰	۱	۴	۵
تعداد کل ماهی‌ها	۳۸											

نتایج آزمایشات مولکولی نشان داد پس از استخراج DNA و انجام آزمایش PCR، قسمتی از محصول PCR جهت انجام الکتروفورز و قسمت دیگر جهت ارسال برای انجام تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing) در دمای لازم نگهداری گردید. نتایج حاصل از انجام الکتروفورز که روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت، نشان داد باند حاصله بسیار واضح و مشخص بود لذا نشان دهنده این مهم بود که پروتکل آزمایش PCR از قبیل پرایمرهای طراحی شده و چرخه‌های حرارتی مورد استفاده مناسب بوده است که با مقایسه با مارکر ۱۰۰ pb، اندازه باند ۱۲۰۰ pb بود. همچنین در قسمت کنترل منفی هیچگونه باندی مشاهده نگردید (شکل ۲).

شکل ۱: انگل بوتریوسفالوس (۳۰۰X).



شکل ۲: DNA تکثیر شده *B. acheilognathi* با استفاده از پرایمر مشتق شده از ژن ITS-1, 5.8S و ITS-2 M : نشانگر ۱۰۰pb، B: *B. acheilognathi*، N : کنترل منفی.

در مرحله بعدی محصول PCR جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت ماکروژن ارسال گردید که این آزمایش توسط دستگاه تعیین توالی خودکار صورت پذیرفت (شکل ۳). همان طور که در شکل مذکور مشاهده می‌شود تعیین توالی نوکلئوتیدی دقیق و کامل انجام شد و نقاط حذف یا خوانده نشده نوکلئوتیدی وجود نداشت، که نشان دهنده خلوص محصول PCR و تعیین توالی صحیح نمونه مورد بررسی بود. توالی نوکلئوتیدی مذکور در سایت بانک ژن (www.ncbi.nih.gov) بوسیله نرم‌افزار بلاست (Blast software) تحت جستجوی همانندسازی قرار گرفت که نتیجه آن شباهت ۸۸ درصدی با نمونه گونه *B. acheilognathi* استاندارد با شماره شناسایی KP099579.1 داشت. توالی نوکلئوتیدی انگل *B.acheilognathi* در این بررسی نشان داد که با نمونه استاندارد *B.acheilognathi* با شماره شناسایی KP099579.1 مطابقت دارد.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
953 bits(516)	0.0	712/809(88%)	4/809(0%)	Plus/Plus

```
Query  12   TTACTGCGTTCTGTATCATTTGCTCTGCTGCTGGGGTTGTCGGGATGTCTCTCTCTGAGT  71
            |||| |||||| |||||| ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||
Sbjct  2    TTAC-GCGTTCCGTATCAGTTGCTCTGCTGCTGGGGTTGTAGGGATGTCTCTCTCTGTGT  60

Query  72   GTGTATGTGATGCGTGAAACTTC-ACTCGCTGCTACCTGCTGAATGCTCGTCTTAGTAGC  130
            ||||||||| |||||||  || | ||||   |||||||||||  ||||||||||||||||
Sbjct  61   GTGTATGTGGTGCGTGACCCTACAACTCTAGGCTACCTGCTGGCTGCTCGTCTTAGTAGC  120

Query  131  CAACCTATTTACGGTGGGGCGCCTAGCCTGTCTGACACCCGTCAGGTGTGCTCGCCAGTG  190
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  CAACCTATTTACGGTGGGGCGCCTAGCCTGTCTGACACCCGTCAGGTGTGCTCGCCAGTG  180

Query  191  TTGCTGGCCAGTCCATACCGGGGCGACAGGGTAGTGCACAGCAATGTGCGCAAGGCGTAA  250
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TTGCTGGCCAGTCCATACCGGGGCGACAGGGTAGTGCACAGCAATGTGCGCAAGGCGTAA  240

Query  251  GATTGTTAgtgtggtgtgcgaaccacccgtgtgtgcgtgtgcgtgtgcgtttgtgtgcgt  310
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  241  GATTGTTAGTGTGGTGTGCGAACCACCCGTGTGTGCGTGTGCGTGTGCGTTTGTGTGCAT  300

Query  311  ATACAAGGATGATGATCGCTTACGCCCCATCATGATTGAGTGAGTGTTGTGGTACACGGA  370
            |||| ||| || ||| |||||||||||||||||||||||| ||| ||||||| |||||||
Sbjct  301  ATACGAGGTTGTTGACCGCTTACGCCCCATCATGATTGACTGATTGTTGTGTTACACGGT  360

Query  371  GTCGATGATGAGTTTGCGCTTGCTGTCGTCGTGACACTCTGCATTCCCTATACCAACGTT  430
            |||||| ||| ||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| || |||||||
Sbjct  361  GTCGATAATGGGTTTGCGCTTGCTGTCGTCGTGACACGCTGCATTCCCTAGACAAACGTT  420

Query  431  TTGTGCCAGCTCGATCGCTGGCTGGGTTGGTGTTGGTGGTGGTGCAGGAGACGGATAACG  490
            |||||||| |||| ||| ||| ||| ||| || |||||||||||||||| |||| | |||
Sbjct  421  TTGTGCCACCTCGTTCGTTGGTTGGTTTGTTGGTGGTGGTGGTGCAGGACACGGTTCACG  480

Query  491  CCTTCTTGTTTGTGAATGGCAGAAGTTCTTGTGAGCGTGATCCGATCGACATCGGTGACG  550
            ||||||||  || ||| ||| ||||||||||||||||   ||  ||||| |  ||||||||
Sbjct  481  CCTTCTTGGCTGGGAACGGCCGAAGTTCTTGTGAGCCAAATAAGATCGGCGGCGGTGACG  540

Query  551  ACGTCCATCTGTCTGTGTGCTGCTCGTGTGCACAAGTTTATGCTGAGGATCACTCGCCTT  610
            |||||| |||||| ||  | || |||| || |||| ||||||| | ||||||||| ||
Sbjct  541  ACGTCCGTCTGTCCGTCCGTTGGTCGTTTGTACAACTTTATGCGGTGGATCACTCGGCTC  600

Query  611  GTGTGTCGATGAAGAGCACAACCGACTGTGTGAGTTAATGTGAATCTCAGACTGCTATGA  670
            |||||||||||||||| || || ||||||||| ||||||||||| ||||||||| |||
Sbjct  601  GTGTGTCGATGAAGAGCGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGTGAATCGCAGACTGCTTTGA  660

Query  671  ACATCGACATCTTGATCGCGCATTGAGATCGTAGGCATGCCTATGCCTACGTCTGCCCCA  730
            |||||||| |||||| ||| ||||| |  | ||||| |||||||| | ||||||| || |
Sbjct  661  ACATCGACCTCTTGAACGCACATTGCGGCCATAGGCTTGCCTATGGCCACGTCTGGCCGA  720

Query  731  GGGTCAGCTTAT-AACTATCACGATGCAGAATGAGTCGGAGCTTTGGAT-GTTGACAGTT  788
            ||||| |||||| |||||||| || ||| |||||||||  ||||||||  |||| ||| |
Sbjct  721  GGGTCGGCTTATAAACTATCATGACGCATAATGAGTCGTGGCTTTGGAAGGTTGCCAGCT  780

Query  789  GACGCAGACACTGTGAGTGAGTGAGTGAG  817
            |||||||  | ||||||||||||||||||
Sbjct  781  GACGCAGTGAGTGTGAGTGAGTGAGTGAG  809
```

شکل ۳: مقایسه توالی نوکلئوتیدی آزمایش شده در این مطالعه با نمونه ثبت شده در بانک ژن (gene bank) به شماره KP099579.1 .

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق از میان سستودها در این مطالعه بوتریوسفالوس فقط از ماهی برگ بیدی جداسازی شد. پیش از این ملاحی(۱۳۹۳) این انگل را برای اولین بار در ایران از ماهی بوتک جدا نمود و این ماهی به عنوان میزبان جدید این انگل معرفی گردید. مخیر (۱۳۵۹) انگل بوتریوسفالوس را برای اولین بار در ایران از بین ماهیان علفخوار کارگاه تحقیقاتی کپور ماهیان در پل آستانه جدا و شناسایی کرد و توانست بوتریوسفالوس آچیلوگناتی را از لوله گوارش ماهی کپور، شگ ماهی، شاه کولی و سس ماهی گزارش نماید. وی بوتریوسفالوس گوکونژنزیس را در گونه‌های متعددی از کپور ماهیان رودخانه سفیدرود و کاریوفیلئوس فیمبریسپس را از روده ماهی کپور گزارش کرده است. ظهیر مالکی (۱۳۷۲) آلودگی اسبله ماهیان رودخانه زرینه رود به دو سستود پروتوسفالوس اسکولاتوس و بوتریوسفالوس و آلودگی کپور ماهیان پرورشی در کلیه نقاط کشور با بوتریوسفالوس و همچنین دیگراما و لیگولا در ماهیان کلمه و سیم و سایر گونه‌های کپور ماهیان با کاریوفیلئوس را گزارش نمود. این انگل از جنوب چین از ماهی کپور علفخوار تا مراکز پرورش آسیا، اروپا و زنلاندنو پراکنده می‌باشد

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]

(پورضرغام، ۱۳۷۴). از مطالعات دیگر انجام شده در ایران، مطالعه میرهاشمی‌نسب و همکاران (۱۳۹۹) می‌باشد که فقط یک گونه سستود *Caryophyllaeus fimbericeps* با فراوانی ۳۸/۱۵ درصد از کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در تالاب انزلی جداسازی نمودند، اما انگل بوتریوسفالوس جداسازی نشد. علیزاده و همکاران (۱۴۰۱) نیز در بررسی انگل‌های ماهیان رودخانه ارس، انگل‌های کرمی یافت شده در این ماهیان را پلروسرکوئید لیگولا اینتستینالیس در کپور معمولی ۴۰ درصد، کلمه ۱۳/۳۳ درصد، سیم ۱۲/۵ درصد، انگل بوتریوسفالوس در کپور معمولی ۵ درصد، دیپلوزون در کپور معمولی ۵ درصد و در کلمه ۶/۷ درصد گزارش نمودند. در بررسی Salgado-Maldonado (۲۰۱۵) در منطقه‌ای از یونان، ۸۰ درصد کپور ماهیان پرورشی کمتر از یک سال، به این انگل آلوده بودند. در روسیه ۲۰ درصد کاهش رشد در ماهیان آلوده به این سستود گزارش نمودند (Gussev, 1985). از طرفی پس از انتقال ماهی کپور علفخوار از آسیا به اروپا و آمریکا *B. acheilognathi* در اروپا خسارات اقتصادی هنگفتی به صنعت پرورش ماهی وارد نمود. بر اساس گزارش‌های موجود به دلیل کوچک بودن مراحل اولیه رشد انگل *B. acheilognathi* در روده حتی آزمایش‌های دقیق انگل‌شناسی قبل از ورود و یا صدور ماهی، قادر به جلوگیری از انتشار آلودگی نشده است، لذا باید این انگل را جدی تلقی نمود. خوشبختانه با درمان شیمیایی می‌توان با آلودگی ماهیان با این سستود مبارزه نمود. به علاوه با انجام اقدامات بهداشتی و پیشگیرانه باید از آلودگی استخرهای پرورش ممانعت بعمل آورد. مطالعات انجام شده در ایران نشان می‌دهد آلودگی به سستودها و خصوصاً انگل بوتریوسفالوس از شمال تا جنوب ایران به‌ویژه در کپور ماهیان پراکنش دارد. مقایسه مطالعه انجام شده با سایر مطالعات نشان می‌دهد آلودگی به انگل بوتریوسفالوس در گونه‌های مختلف و با درصدهای متفاوتی گزارش گردیده است و از قاعده مشخصی پیروی نمی‌کند. Chaudhary و همکاران (۲۰۱۵) نمونه‌هایی از جنس بوتریوسفالوس که از ماهی‌های غیربومی در هند جداسازی و به روش مرفولوژی شناسایی شده بود را برای اولین بار به روش مولکولی بررسی و شناسایی کردند. جهت مطالعه مولکولی انگل‌ها از ژن 18S و 28S rRNA استفاده گردید و نتایج به دست آمده نشان داد انگل بوتریوسفالوس از گونه *B. Acheilognathi* بود. Salgado-Maldonado و همکاران (۲۰۱۵) نیز با استفاده از ژن ITS-1, 5.8S و ITS-2 توانستند برای نخستین بار انگل *B. acheilognathi* را از نوعی ماهی در هندوراس آمریکای مرکزی گزارش کنند. Eun Han و همکاران (۲۰۱۰) مرگ و میر ایجاد شده در ماهی کپور معمولی در کره جنوبی را بررسی کردند. آن‌ها پس از بررسی ریخت‌شناسی و آسیب‌شناسی انگل عامل مرگ و میر آن را به روش PCR و سپس تعیین توالی بر اساس ژن V4-18S rRNA مورد بررسی قرار دادند و عامل این مرگ و میر را انگل *B. acheilognathi* گزارش نمودند. در این مطالعه با استفاده از قطعات ITS-1, 5.8S و ITS-2 ژن ریبوزومی DNA، انگل*B. acheilognathi* از ماهی *A. mossulensis* برای نخستین بار به روش مولکولی جداسازی و شناسایی گردید. در مجموع می‌توان گفت مطالعات انگلی انجام شده بر روی رودخانه شاپور و چشمه سید حسین و همچنین منابع آبی اطراف آن از جمله مطالعه‌ای که سابقاً بر روی رودخانه فهلیان انجام گرفته بود و همگی در منطقه بین النهرین یا مزوپوتامیا (Mesopotamia) قرار گرفته‌اند، نشان می‌دهد که این منطقه انگل‌ها و میزبان‌های جدیدی را به مجموعه انگل‌های جداسازی شده و میزبان‌های قبلی گزارش شده در کشور خصوصاً در طول دهه‌های اخیر اضافه نمود که لازم است تا دست‌اندرکاران در امور دامپزشکی با آگاهی لازم از این انگل‌ها و میزبان‌های آن‌ها، از انتشار و گسترش این انگل‌ها جلوگیری به عمل آورند. برخی از این انگل‌ها باعث لاغری مفرط در ماهیان شده و می‌توانند خسارت‌های اقتصادی زیادی را در منطقه‌ای که افراد بومی اقدام به صید و استفاده یا فروش آن‌ها می‌کنند به همراه داشته باشد. برخی دیگر از این انگل‌ها می‌توانند انسان را به عنوان میزبان نهایی آلوده نمایند، لذا لازم است تا مسئولین بهداشتی و دست اندرکاران دامپزشکی قبلاً تمهیدات لازم و پیشگیرانه را در این زمینه انجام دهند. در این زمینه می‌توان به اقداماتی از جمله نظارت و نمونه‌برداری منظم با انجام آزمایش‌های دوره‌ای بر روی آبزیان و آب رودخانه‌ها برای تشخیص زودهنگام آلودگی‌های انگلی، کنترل سخت‌پوستان، حلزون‌ها و سایر ناقلان انگلی که در محیط‌های آبی وجود دارند، جلوگیری از انتقال آبزیان با آلودگی انگلی از مناطق دیگر به رودخانه‌ها با محدود کردن ورود آبزیان آلوده به محیط‌های طبیعی، محدود کردن واردات یا انتقال آبزیان آلوده بدون رعایت استانداردهای بهداشتی و توسعه روش‌های بیولوژیک و شیمیایی کنترل آلودگی‌های انگلی با استفاده اصولی از داروهای ضدانگل در صورت نیاز، به نحوی که بر محیط‌زیست اثر منفی نداشته باشد را نام برد.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]

منابع

پورضرغام، م.، ۱۳۷۴. بررسی انگل‌های پریاخته دستگاه گوارش ماهیان زرینه رود. پایان‌نامه دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه، شماره ۱۱۹، ۱۹۲ ص.

پوررنگ، ن.، ۱۳۶۹. لیگولوز در ماهی کلمه. پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۲۱، ۸۹ ص.

جلالی، ب.، ۱۳۷۷. انگل‌ها و بیماری‌های انگلی ماهیان آب شیرین ایران. انتشارات شرکت سهامی شیلات ایران، ۵۶۲ ص.

حسینی‌سالکده، ق.، قره ریاضی، ب. و نقوی، م.ر.، ۱۳۸۴. نشانگرهای مولکولی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۳۰-۴۴.

روحانی، م.،۱۳۷۳. بررسی آلودگی‌ها و بیماری‌های انگلی آبزیان منطقه سیستان. خلاصه مقاله‌های دومین گردهمایی دامپزشکان علوم بالینی ایران.

شکریان، ا.، ۱۳۶۶. بررسی لیگولوز ماهیان دریاچه اکباتان. پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره۱۷۱۷.

ظهیر مالکی، ا.، ۱۳۷۲. بررسی انگل‌های گوارشی ماهی اسبله معمولی رودخانه زرینه‌رود. پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۲۲۰۳، ۹۷ ص.

علیزاده، ز.، میرزانژاد اصل، ح.، محمدی قلعه بین، ب. و حیدری، ز.، ۱۴۰۱. بررسی آلودگی‌های انگلی کرمی ماهی‌های صید شده از رود ارس در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹. مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، ۲۲ (۳): ۲۵۸-۲۵۰.

محسنی بیله سوارچی، ش.، نصیری صالح، ف. و زهرایی، ب.، ۱۳۹۹. بررسی اثر منشأ کارست بر سهم جریان پایه رودخانه با استفاده از مدل اصالح شده نواحی اشباع SAM (مطالعه موردیحوضه کازرون و دشت برم). مجله تحقیقات منابع آب ایران، ۱۶(۲): ۲۰۱-۱۹۲

مخیر، ب.، ۱۳۵۹. بررسی انگل‌های ماهیان حوضه سفید رود. پایان نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحات ۷۲-۴.

ملاحی، س.، ۱۳۹۳. بررسی انگل‌های کرمی و تک‌یاخته احشایی ماهیان صید شده در رودخانه فهلیان شهرستان نورآباد ممسنی. پایان نامه دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، شماره ۳۱۷ ، ۹۶ ص.

میرهاشمی‌نسب، س.ف.، فیروزبخش، ف.، ستاری، م. و قاسمی، م.، ۱۳۹۹. آلودگی‌های انگلی و تأثیر آن‌ها بر شاخص‌های بیومتریک ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در تالاب انزلی، جنوب غربی دریای خزر. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۵(۱): صفحات ۸۲-۷۴.

Chaudhary, A., Chiary, H.A., Sharma, B. and Shanker Singh, H., 2015. First molecular identification of invasive tapeworm, *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (Cestoda: Bothriocephalidea) in India. BioInvasions Records, 4(4): 269–276.

Coad, B.W., 1995. Freshwater Fishes of Iran, Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae. Brno, 29(1):1-64.

Ebrahim zadeh, A. and kilang- Damavandi, R., 1977. parasitic infections in the fish of Karoon River in province Khoozestan, Izmir, Turkey, p.130.

Eun Han, J., Shin, S.P., Kim, J.H., Choresca, C.H., Jun, J.W., Gomez, D.K. and Park, S.C., 2010. Mortality of cultured Koi *Cyprinus carpio* in Korea caused by *Bothriocephalus acheilognathi*. African Journal of Microbiology Research, 4: 543-546.

Fernando, C.H., Furtado, J.I., Gussev, A.V., and Kakonge, S.A. and Hanek, G., 1972. Methods for the study of fresh water fish parasites, University of waterloo, Biology series, PP. 4-70.

Gussev, A.V., 1985. Parasitic metazoans (In Russian), In O.N. Bauer (ed); Key to the Parasites of freshwater fishes of the USSR. Vol. 3. Nauka, Leningrad.

Gussev, A.V., 1987. Key to parasites of freshwater fishes of the soviet USSR. Izd. Nauka, Leningrad, USSR, PP. 379-523.

Luo, H.Y., Nie, P., Zhang, Y.A., Wang, G.T. and Yao, W.J., 2002. Molecular variation of *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (Cestoda: Pseudophyllidea) in different fish host species based on ITS rDNA sequences. Systematic Parasitology, 52: 159–166.

Salgado-Maldonado, G., Matamoros, W., Kreiser, B.R., Caspeta- Mandujano, J.M. and Mendoza-Franco, E.F., 2015. First record of the invasive Asian fish tapeworm, *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934, in Honduras, Central America. Parasite, 22: 1–5

Williams, J. S., Gibson, D. I. and Sadeghian, A., 1980. Some Helminthes parasites of Iranian freshwater fishes. Journal of Natural History, 14: 685–699.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]

Isolation and Molecular Identification of *Bothriocephalus acheilognathi* (Family Bothriocephalidae) Isolated from Some Aquatic Sources of Kazerun Using PCR Method

Alireza Golchin Manshadi[1*]
Mehdi Emadi[1]
Maryam Shahrivar[1]

1.Department of Aquatic Animal health, Faculty of Veterinary Medicine, Kaz .C, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

[*]**Corresponding author:**
dr.golchin@iau.ac.ir

Received date: May/02/2025
Reception date: June/28/2025

Abstract

For the identification of cestode parasitesin fish from the Shapor River and Seyed Hossein Spring in 2023, a total of 38 fish from four carp species, including *Alburnus mossulensis*, *Cyprinion macrostomum*, *Capoeta barrosii*, and *Garra rufa*, were caught. They were kept alive in plastic bags and transferred to the Parasitology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine at Islamic Azad University, Kazerun Branch. The samples were examined in the laboratory. After anesthetizing the fish, biometric measurements were performed to identify the species, and the abdominal cavity and internal organs were checked for parasite presence. The results showed that only *Bothriocephalus* spp. of the genus Bothriocephalus was isolated and identified from the intestine of the *A. mossulensis*. 40% of the *A. mossulensis* fish were infected with Bothriocephalus, while the other fish species were uninfected. Subsequently, the Bothriocephalus parasite was examined using molecular techniques. PCR results and nucleotide sequencing of the ITS-1, 5.8S, and ITS-2 gene regions showed an 88% similarity between the tested sample and the standard *B. acheilognathi* sample with accession number KP099579.1. Therefore, molecular analysis for parasite identification can play a significant role in confirming parasite diagnoses. Additionally, possessing sufficient information about parasitic infections and their hosts in a region can provide valuable assistance in preventing substantial economic damages.

Keywords: intestinal parasite, carp fishes, molecular identification, Shapor River, Seyed Hossein Spring.

[Downloaded from jweb.ahvaz.iau.ir on 2026-11-09]