magiran.com

معرفی نشانگرهای ژنتیکی جهت شناسایی انگل‌های لرنه‌آ سیپریناسه‌آ (*Lernaea cyprinacea*) و لرنه‌آ کتنوفارینگودونی (*L. ctenopharyngodoni*) با استفاده از روش RAPD

محمد پورکاظمی[۱]* ؛ حمید اسدیان[۲] ؛ جمیله پازوکی[۳] ؛ محمود معصومیان[۴] و حسینعلی ابراهیم‌زاده موسوی[۵]

pkazemi_m@yahoo.com

۱- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت صندوق پستی: ۳۴۶۴-۴۱۶۳۵

۲- دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد کرج

۳- گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی، تهران

۴- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۱۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۵- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۶۴۵۳-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۸۶

چکیده

این تحقیق بمنظور مقایسه مولکولی دو انگل لرنه‌آ سیپریناسه‌آ (*Lernaea cyprinacea*) و انگل لرنه‌آ کتنوفارینگودونی(*L. ctenopharyngodoni*) با استفاده از روش (Random Amplified Polymorphic DNA) یا RAPD و امکان معرفی نشانگرهای مولکولی صورت گرفت. برای این منظور ۴۳ نمونه انگل لرنه‌آ از دو گونه فوق از استانهای خوزستان و گیلان جمع‌آوری و DNA آنها به روش فنل- کلروفرم استخراج گردید. پس از بررسی کیفیت و کمیت DNA بوسیله الکتروفورز ژل آگارز۱ درصد و دستگاه اسپکتوفتومتر، تحت شرایط خاصی PCR گردید و محصول PCR بر روی ژل پلی آکریلامید ۶ درصد الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره رنگ‌آمیزی و در پایان اندازه و تعداد نوارهای DNA با استفاده از دستگاه مستند سازی ژل ثبت و آنالیزآماری آن با برنامه کامپیوتری POP GEN 32 مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این تحقیق از ۴۲ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی استفاده گردید که در مجموع ۳۹۷ باند DNA تولید شد که از این بین ۳۴۹ باند مشخص و چند شکلی در بین دو گونه شناسایی گردید که تعدادی از آنها را می‌توان بعنوان نشانگر مولکولی جهت شناسایی دو گونه مزبور بکار برد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از محصول PCR نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی در لرنه‌آ کتنوفارینگودونی استان گیلان (۱/۱۵درصد) بیشتر از خوزستان (صفر) بوده ولی در لرنه‌آ سیپریناسه‌آ در استان خوزستان (۲۷/۴۶درصد) به میزان ۷/۲۶ برابر استان گیلان (۳/۷۸درصد) بوده است. از طرف دیگر حدود ۸۸ درصد تفاوت ژنتیکی بین دو گونه انگل لرنه‌آ مشاهده شد که می‌توان به اطمینان اعلام نمود که از لحاظ ژنتیکی گونه لرنه‌آ کتنوفارینگودونی یک گونه مستقل از لرنه‌آ سیپریناسه‌آ می‌باشد.

لغات کلیدی : RAPD، لرنه‌آ سیپریناسه‌آ، *Lernaea cyprinacea* ، لرنه‌آ کتنوفارینگودونی، *L. ctenopharyngodoni*

* نویسندهٔ مسئول

magiran.com

مقدمه

جنس لرنهآ (*Lernaea*) متعلق به شاخه بندپایان (Arthropoda)، رده سخت‌پوستان (Crustacea)، راسته کوپه‌پودا (Copepoda) و خانواده لرنئیده (Lernaeidae) می‌باشد. تاکنون ۴۰ گونه از این جنس در جهان شناسایی شده که ۳۲ گونه آن نامگذاری گردیده است (Hoffman & Meyer, 1976).

لرنهآ سیپرینا سهآ (*Lernaea cyprinacea*) و لرنهآ کتنو-فارینگودونی (*L. ctenopharyngodoni*) خصوصیات مورفولوژیک نزدیک بهم دارند و تنها در چند صفت با هم متفاوت هستند، گونه لرنه آ کتنوفارینگودونی از ماهی آمور جداسازی و معرفی شده است و لرنه آ سیپریناسه آ تعداد زیادی از کپور ماهیان را آلوده می‌سازد.

در ایران مطالعات متعددی در خصوص شناسایی و پراکنش انگل لرنهآ صورت گرفته است. آلودگی ماهی گامبوزیا به انگل لرنهآ در استان مازندران (Mokhayer, 1983)، گونه لئوسیسکوس (*Leusiscus sp.*) در دریاچه زریوار (Jazebizadeh, 1983)، در انواع کپور ماهیان شامل ماهی سیم، کپور سرگنده، کپور علفخوار در سه استان شمالی کشور و گونه‌های کپور معمولی، کپور نقره‌ای و کاراس در استان خوزستان (Jalali, 1987)، شیزوسیپریس (*Schizocypris altidorsalis*) و شیزوتوراکس (*Schizothorax zarudnyi*) در تالاب هامون (روحانی، ۱۳۷۴) و در گونه‌های کاراس، سیاه ماهی و آمور در آبگیرهای آذربایجان غربی (میرهاشمی نسب و پازوکی، ۱۳۸۱) گزارش شده است.

در گذشته روش‌های شناسایی و تشخیص قارچها، باکتریها، ویروس‌ها و انگل‌ها بر مبنای خصوصیات ظاهری آنها بوده که در بعضی از گونه‌ها با رنگ‌آمیزی اختصاصی و یا با استفاده از پروفیل آنزیم، مقاومت به آنتی‌بیوتیک و یا تجزیه اسیدهای چرب استفاده می‌گردید (Tang *et al.*, 1997). ولی در چند سال اخیر با ابداع و توسعه روشهای مولکولی، دریچه‌ای نو برای شناسایی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها بویژه باکتریها و انگلهای بیماریزا باز گردید (Leon *et al.* (1994); Huys & Swings (1999); Cerro *et al.* (2002); Jensen; Tiirola *et al.*(2002); Jinu & Goodwin, (2004) ; *et al.* (2002) ; Welker *et al.* (2005) در خصوص انگلها در سالهای اخیر تحقیقات متعددی انجام گرفته، Lo و همکاران در سال ۱۹۹۴ انگل تک یاخته بیماریزا گونه *Pleistophora anguillarum* در مار ماهی ژاپن (*Abguilla japonica*) را، به روش RAPD شناسایی و مطالعه کردند. در تحقیقی دیگر توالی DNA ریبوزمی (rDNA) در چهار گونه از انگلهای مونوژنهآ، جنس *Lamellodiscus* در سه گونه از ماهیان دریای مدیترانه تعیین شد (Desdevises *et al.*, 2000).

از سال ۱۹۹۴ میلادی تحقیقات گسترده‌ای نیز بر روی انگلهای میکسوسپوره آ انجام و نهایتا با آزمایشات مولکولی جایگاه طبقه‌بندی شاخه میکسوزوآ (Myxozoa) در بین انگل‌های پریاخته مشخص گردید. اغلب مطالعات روی ژن 18S rRNA انجام شده است و تقریبا ۲۰ توالی در بانک ژن میکسوبولوسها (*Myxobolus*) موجود می‌باشد (Smother *et al.*, 1994; Kent *et al.*, 2001; Bush *et al.*, 2001). در سال ۲۰۰۲ میلادی نیز ۱۱ گونه از انگلهای آسکاریده در ماهیان دریایی، آب شیرین و پرندگان ماهیخوار با روش مولکولی PCR-RFLP شناسایی شدند (Kijewska *et al.*, 2002).

بدلیل دامنه میزبانی وسیع، ویژگیهای متغیر مرفولوژیک، شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌های مختلف لرنهآ همواره با مشکلاتی روبرو بوده و برغم توسعه و گسترش روز افزون مطالعات مولکولی در شناسایی و تفکیک انواع باکتریهای بیماریزا، مطالعات مولکولی در خصوص انواع انگل‌های بیماریزا در آبزیان گزارش نشده و این مطالعه اولین گزارش مولکولی در تعیین تنوع و فاصله ژنتیکی دو گونه از انگل لرنهآ در ایران می‌باشد. هدف از این بررسی معرفی نشانگر ژنتیکی، امکان شناسایی مولکولی دو گونه انگل لرنهآ و تعیین میزان تنوع و فاصله ژنتیکی لرنهآ سیپریناسهآ (*Lernaea cyprinacea*) و انگل لرنهآ کتنوفارینگودونی (*Lernaea cetenopharyngodoni*) در استانهای گیلان و خوزستان با استفاده از روش مولکولی RAPD بوده است.

مواد و روش کار

در این بررسی جمعاً ۴۳ نمونه انگل لرنهآ مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد ۲۱ نمونه انگل لرنهآ کتنوفارینگودونی از ماهی آمور (۱۱ نمونه در استان گیلان و ۱۰ نمونه از استان خوزستان) و ۲۲ نمونه از لرنهآ سیپریناسهآ از گونه‌های کپور معمولی، کپور نقره‌ای و سس ماهی (۱۱ نمونه استان گیلان، ۱۱ نمونه استان خوزستان) به روش استریل جمع‌آوری (جدول ۱) و در الکل اتانول ۹۵درصد نگهداری و سپس به آزمایشگاه ژنتیک انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان (رشت) منتقل گردید.

DNA ژنومی انگل لرنهآ با استفاده از روش فنل کلروفرم (Hillis & Moritz, 1990) تعدیل شده توسط Pourkazemi, 1996) استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با

magiran.com

الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و همچنین با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Cecil model CE2040) ارزیابی گردید. برای یکسان‌سازی غلظت DNA نمونه‌ها، سه خزانه از DNA ژنومی لرنهآ با رقت مشابه تهیه گردید. در هر واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از ۲ میکرولیتر DNA (۰/۵ تا ۱ پیکامول)، ۲/۵ میکرولیتر محلول بافر 1 درصد PCR، ۱ میکرولیتر dNTP mix با غلظت µM ۲۰۰، ۰/۲ واحد آنزیم تک پلیمراز، ۲ میکرولیتر کلرید منیزیم (2 mM) (شرکت سیناژن)، ۱ میکرولیتر آغازگر (0.5 pM) (شرکت IBA آلمان) و۱۶/۳ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. در این بررسی در مجموع از ۴۲ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی با توالیهای مختلف استفاده گردید (جدول۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در تیوبهای ۰/۵ میلی‌لیتری و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Amersham Pharmacia، مدل TC341) انجام گرفت. برنامه تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر برای واسرشته سازی اولیه (Denaturation) بمدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد، سپس برای مرحله دوم برای اتصال (Annealing) در درجه حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه همراه با ۳۵ چرخه حرارتی، و در مرحله نهایی بسط (Extention) در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. برای ارزیابی و بررسی الگوی باندهای تولید شده، مقدار ۷ میکرولیتر از هر محصول PCR بر روی ژل پلی آکریلامید ۶ درصد (۱۵۰ ولت به مدت ۴ ساعت) الکتروفورز شد سپس ژل پلی‌آکریلامید با نیترات نقره با روش (Creste *et al.*, 2001) رنگ‌آمیزی گردید.

جدول ۱: پراکنش نمونه‌های جمع‌آوری شده از انگل لرنهآ کتنوفارینگودونی و لرنهآ سیپریناسهآ در استانهای گیلان و خوزستان برحسب گونه میزبان و محل آلودگی به انگل

ردیف	گونه انگل لرنهآ	گونه میزبان (ماهی)	محل آلودگی به انگل	استان		جمع
				گیلان	خوزستان	
۱	لرنهآ کتنوفارینگودونی	آمور	روی بدن	۰	۳	۳
		آمور	منطقه شکمی	۳	۰	۳
		آمور	باله دمی	۳	۵	۸
		آمور	باله پشتی	۱	۱	۲
		آمور	باله مخرجی	۱	۱	۲
		آمور	باله سینه‌ای	۳	۰	۳
جمع		-	-	۱۱	۱۰	۲۱
۲	لرنهآ سیپریناسهآ	کپور معمولی	روی بدن	۰	۵	۵
			باله دمی	۰	۳	۳
			باله مخرجی	۰	۱	۱
			باله پشتی	۱	۱	۲
		کپور نقره‌ای	دور چشم	۰	۱	۱
		سس ماهی	منطقه دهان	۲	۰	۲
			منطقه شکمی	۱	۰	۱
			باله مخرجی	۲	۰	۲
			باله پشتی	۳	۰	۳
			باله سینه‌ای	۲	۰	۲
جمع				۱۱	۱۱	۲۲

magiran.com

میزان تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای متفاوت بوده بطوریکه میزان آن در نمونه‌های جمع‌آوری شده گونه لرنهآ کتنو فارینگودونی در استان خوزستان صفر و در۳۹۷ نوار DNA بررسی شده ۱۰۰درصد تشابه ژنتیکی داشتند ولی در استان گیلان تنوع ژنتیکی اندکی در حد ۱/۵۱درصد مشاهده گردید و با ۳۹۷ نوار DNA بررسی شده ۹۸/۴۹ درصد تشابه ژنتیکی برآورد شده است. گونه کتنوفارینگودونی در دو استان گیلان و خوزستان از لحاظ ژنتیکی به میزان ۳ درصد با همدیگر اختلاف دارند و تنوع ژنتیکی در نمونه‌های بررسی شده در استان گیلان بیشتر از استان خوزستان بوده است.

از ۳۹۷ نوار DNA بررسی شده لرنهآ سیپریناسهآ در استان گیلان، به میزان ۳/۷۸ درصد تفاوت ژنتیکی مشاهده گردید ولی در استان خوزستان این مقدار خیلی بیشتر و به ۲۷/۴۶ درصد رسید. این امر بیانگر آن است که میزان تنوع ژنتیکی در نمونه لرنهآ سیپریناسهآ استان خوزستان بمیزان ۷/۲۶ برابر میزان تنوع ژنتیکی این گونه در استان گیلان می‌باشد. اما در مقایسه گونه‌ای از لحاظ ژنتیکی، با شمارش ۳۹۷ نوار DNA در دو گونه لرنهآ سیپریناسهآ و لرنهآ کتنوفارینگودونی، در ۳۴۹ مورد، حالت پلی‌مورفیسم (چندشکلی) مشاهده گردید که به میزان ۸۷/۹۱ درصد تفاوت ژنتیکی با یکدیگر داشته و این بیانگر آن است که در ژنوم دو گونه لرنهآ سیپریناسهآ و لرنهآ کتنوفارینگودونی، تمایز ژنتیکی بالایی وجود دارد.

تصاویر ژلهای بدست آمده نیز با استفاده از دستگاه مستند سازی ژل (شرکت Vilber Lourmat) ثبت و تعداد و اندازه باندها تعیین گردید.

جهت محاسبات آماری از روش امتیازدهی صفر (فاقد باند) و یک (دارای باند DNA) استفاده شد. فاصله ژنتیکی براساس روش Nei (1972) و میزان تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای با استفاده از برنامه ژنتیکی (Popgen Microsoft, Pop Gen 3.2 1999) محاسبه گردید.

نتایج

بررسی باند DNA پس از الکتروفورز برروی ژل آگارز نشان داد که کیفیت آنها برای آزمایشات PCR مناسب می‌باشد. از بین ۴۲ آغازگر استفاده شده در این مطالعه، دو آغازگر D2 و B2، الگوی باندی یکسان (Monomorph) در هر دو گونه نشان دادند.

از ۴۰ آغازگر دیگر، باند DNA در هر دو گونه و در دو منطقه مورد بررسی تکثیر شد که در مجموع ۳۴۹ نوار DNA چندشکلی (Polymorphism) شمارش گردید که بیشترین نوار حاصل مربوط به آغازگر D8 با ۲۸ باند DNA و کمترین نوار تولید شده مربوط به آغازگر D14 با ۸ باند بوده است (جدول ۲).

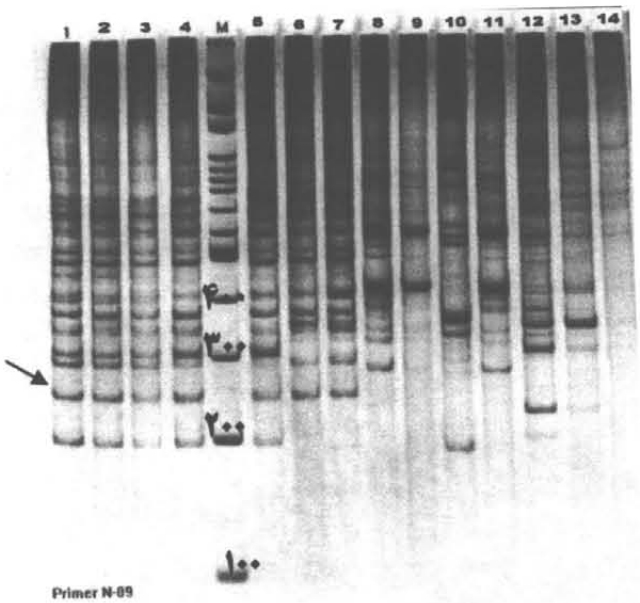
تعدادی از آغازگرها نوارهای DNA اختصاصی و مشخص جهت تفکیک دو گونه لرنهآ سیپریناسهآ و لرنهآ کتنوفارینگودونی تولید نمودند (شکل ۱) که از آنها می‌توان بعنوان نشانگر ژنتیکی جهت شناسایی گونه‌های فوق استفاده نمود.

magiran.com

جدول ۲: اسامی، توالی آغازگرها و تعداد باند DNA تولید شده پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل پلی‌آکریلامید

شماره	نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد باند شمارش شده
۱	B-01	5'- GTT TCG CTC C- 3'	۱۵
۲	B-03	5'-CAT CCC CCT G- 3'	۱۵
۳	B-04	5'-GGA CTG GAG T- 3'	۲۰
٤	B-05	5'-TGC GCC CTT C- 3'	١٤
۵	B-06	5'-TGC TCT GCC C- 3'	۱۲
٦	B-07	5'-GGT GAC GCA G- 3'	۱۵
۷	B-10	5'-CTG CTG GGA C- 3'	۲۰
۸	B-11	5'-GTA GAC CCG T- 3'	۲۱
۹	B-15	5'-GGA GGG TGT T- 3'	۱۵
۱۰	B-16	5'-TTT GCC CGG A- 3'	۱۱
۱۱	B-17	5'-AGG GAA CGA G- 3'	۲۱
۱۲	D-05	5'-TGA GCG GAC A- 3'	١٦
۱۳	D-07	5'-TTG GCA CGG G- 3'	۲۳
١٤	D-08	5'-GTG TGC CCC A- 3'	۲۸
۱۵	D-09	5'-CTC TGG AGA C- 3'	١٦
١٦	D-10	5'-GGT CTA CAC C- 3'	۱۳
۱۷	D-12	5'-CAC CGT ATC C- 3'	١٤
۱۸	D-13	5'-GGG GTG ACG A- 3'	۱۵
۱۹	D-14	5'-CTT CCC CAA G- 3'	۸
۲۰	D-15	5'-CAT CCG TGC T- 3'	۱۹
۲۱	D-16	5'-AGG GCG TAA G- 3'	۱۸
۲۲	D-18	5'-GAG AGC CAA C- 3'	١٤
۲۳	D-19	5'-CTG GGG ACT T- 3'	۲٤
۲٤	D-20	5'-ACC CGG TCA C- 3'	۲۱
۲۵	N-01	5'-CTC ACG TTG G- 3'	۱۲
۲٦	N-02	5'-ACC AGG GGC A- 3'	۲۳
۲۷	N-03	5'-GGT ACT CCC C- 3'	۹
۲۸	N-04	5'-GAC CGA CCC A- 3'	۲۱
۲۹	N-05	5'-ACT GAA CGC C- 3'	۱۵
۳۰	N-06	5'-GAG ACG CAC A- 3'	۲۳
۳۱	N-07	5'-CAG CCC AGA G- 3'	۲۲
۳۲	N-08	5'-ACC TCA GCT C- 3'	۱۹
۳۳	N-09	5'-TGC CGG CTT G- 3'	۲۱
۳٤	N-l0	5'-ACA ACT GGG G- 3'	۲۱

magiran.com



شکل ۱: محصول PCR الکتروفورز شده بر روی ژل پلی‌آکریلامید ٦درصد و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره با استفاده از آغازگر N-09 [ستونهای ۷-۱ مربوط به لرنهآ کتنوفارینگودونی، ستون M مارکر مولکولی (100 bp) و بقیه ستونها مربوط به لرنهآ سیپریناسهآ می‌باشد. مارکر اختصاصی شناسایی گونه با پیکان نشان داده شده است].

بحث

کیفیت و کمیت DNA بدست آمده از انگل‌های لرنهآ کتنو-فارینگودونی و لرنهآ سیپریناسهآ با استفاده از روش فنل - کلروفرم بیانگر آن است که می‌توان DNA ژنومی انگلها را بخوبی به روش فوق استخراج کرد و برروی ساختار ژنتیکی آنها مطالعات مولکولی انجام داد. استفاده از روش RAPD برای شناسایی و تفکیک انگل‌ها موفقیت‌آمیز بود و نتایج این بررسی نشان داد که آغازگرهای تصادفی (Random Primers) می‌توانند بخش‌هایی از DNA هسته را تکثیر و نوارهای DNA را تولید نمایند که در تشخیص گونه و یا جمعیت‌های مختلف آن کاربرد داشته باشند. استفاده از روشهای مولکولی در مورد شناسایی تک یاخته بیماریزای *P. anguillarum* در مار ماهی ژاپن موفقیت آمیز بوده است (Lo *et al.*, 1994) همچنین با استفاده از این روش تعداد زیادی از انگلهای پر یاخته مانند مونوژنه آ (Desdevises *et al.*, 2000)، میکسوسپورهآ (Smother *et al.*,1994; Bush *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2001) وآسکاریدها (Kijewska *et al.*, 2002) مطالعه شده اند و تغییرات زیادی در جایگاه طبقه بندی آنها مشاهده شده است. بطوریکه میکسوسپورهآ که مدتها در گروه تک یاخته‌ها طبقه بندی شده بودند، بعد از مطالعات مولکولی انجام شده به نظر گروهی از محققین مشخص گردیده که این انگلها به شاخه پر یاخته‌ها نزدیک هستند.

نتایج این بررسی نشان داده است که میزان تنوع ژنتیکی انگل لرنهآ کتنوفارینگودونی در استان گیلان (۱/۵۱درصد) بیشتر از استان خوزستان (صفر) است ولی در خصوص انگل لرنهآ سیپریناسهآ میزان تنوع ژنتیکی در نمونه‌های جمع‌آوری شده استان خوزستان (۲۷/۴۶درصد) به میزان ۷/۲۶ برابر بیشتر از استان گیلان (۳/۷۸درصد) بوده است. علت این تفاوت می‌تواند مربوط به میزان گسترش و پراکندگی انگل لرنهآ در استان خوزستان باشد. زیرا بچه ماهیان مورد نیاز پرورش خود را از استانهای مختلف تامین می‌نماید. علاوه بر پراکنش جغرافیایی، گونه میزبان می‌تواند مؤثر باشد اکثر نمونه‌های انگل لرنهآ سیپریناسهآ جداسازی شده در استان گیلان از گونه سس ماهی (۱۰ نمونه) بوده و ۱ نمونه انگل از ماهی کپور معمولی جداسازی

magiran.com

و مورد بررسی قرار گرفت و برای نتایج قطعی‌تر در مطالعات آتی، توصیه می‌گردد از نمونه انگل لرنهآ ماهی کپور معمولی بیشتری در استان گیلان جمع آوری گردد. انگل لرنهآ کتنوفارینگودونی از ماهی آمور جداسازی گردید.

در مقایسه ژنتیکی ۲ گونه انگل لرنهآ کتنوفارینگودونی و سیپریناسهآ مشخص گردید که به میزان ۸۷/۹ درصد تفاوت ژنتیکی دارند لذا به آسانی می‌توان با انجام PCR دو گونه را از همدیگر تفکیک نمود و از باندهای DNA تولید شده برای شناسایی هر گونه استفاده کرد.

روش RAPD استفاده شده در این بررسی با ۴۲ آغازگر، بعنوان اولین تحقیق در زمینه ژنتیک مولکولی انگلهای آبزیان در ایران است. برای تداوم مطالعات مولکولی می‌توان از آغازگر های بیشتر (۳۰۰ آغازگر)، و نمونه‌های انگل زیادتر در استانهای مختلف استفاده کرد و یا سایر روشهای مولکولی از قبیل Microsatellite ، RT-PCR ، RFLP وAFLP که حساسیت بیشتر و قابلیت تکرارپذیری دقیق‌تری دارند (Gil *et al.* 2004; Eisenstein, 1990 ; Tang *et al.* 1997) بکار برد.

با توجه به نوپا بودن بررسی مولکولی انگلها انجام مطالعات جامع ضروری است تا جایگاه تاکسونومی آنها مشخص گردد. مطمئناً با انجام مطالعات مولکولی در زمینه شناسایی انواع بیماریهای آبزیان علاوه بر دستیابی به دانش پایه و بنیادی، می‌توان از لحاظ کاربردی، نقش مؤثری درافزایش راندمان تولید در آبزی‌پروری کشور از طریق کاهش تلفات ماهی و میگو ایفاء نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات شیلات ایران در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان به انجام رسید. از مسئول و کارشناسان محترم بخش ژنتیک انستیتو تحقیقات و بخش آبزی‌پروری مرکز تحقیقات آبزی‌پروری جنوب کشور (استان خوزستان) که در آزمایشات مولکولی و جمع‌آوری نمونه‌ها کمک نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع

روحانی، م. ، ۱۳۷۴. بررسی آلودگیهای انگلی ماهیان تالاب هامون، مهندسین مشاور آبزی گستر، تهران.

میرهاشمی نسب، ف. و پازوکی، ج. ، ۱۳۸۱. شناسایی‌انگلهای سخت پوست برخی از ماهیان دریاچه مخزنی مهاباد. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۴، صفحات ۱۳۳ تا ۱۴۸.

Bush, A.O. ; Fernandez, J.C. ; Esch, G.W. and Seed, J.R. , 2001. Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. 516P.

Cerro, A.D. ; Marquez, I. and Guijarro, J.A. , 2002. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three Major Fish Pathogens, by Multiplex PCR. Applied and environmental microbiology. pp.5177-5180.

Creste, S. ; Tulmann Neto, A. and Figueira A. , 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Olant Molecular Biology Reporter 19:pp. 299-306.

Desdevises, Y.; Jovelin, R.; Jousson, O. and Morand, S. , 2000. Comparison of ribosomal DNA sequences of *Lamellodiscus spp.* (Monogenea, Diplectanidae) parasitsing *Pagellus* (Sparida, Teleostei) in the North Mediterranean Sea: species divergence and coevolutionary inter-action. International Journal of Parasitology, Vol.30, No. 6, pp.741-746.

Eisenstein, B.I. , 1990. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N. Engl. J. Med., Vol. 322, pp.78-183.

magiran.com

Gil, B.G. ; Rodrıguez, S. ; Gasca, A.G. ; Roque, A. ; Juarez, R.V. ; Fabiano, L. ; Mpson, T. and Swings, J. , 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi* related isolates associated with diseased aquatic organisms. Micro-biology. Vol. 150, pp.1769-1777.

Hillis, D.M. and Moritz, C. , 1990. Molecular taxonomy. Sinauer Association. Inc. Publishers. Massachusetts.

Hoffman, G.L. and Meyer, E.P. , 1976. Parasites of freshwater fishes. The anchor worm and related species. Fish disease leaflet. T.F.H. Publication, U.S.A.

Huys, G. and Swings, J. , 1999. Evaluation of a fluorescent amplified fragment length poly-morphism (FAFLP) methodology for the genotypic discrimination of *Aeromonas* taxa. FEMS Microbiology Letters 177, pp.83-92.

Jalali, B. , 1987. Lernaeasis in Cyprinid cultured fish in Iran. University of Goldolo, Hungary. Presented as a thesis as one year training course on fish disease. 39P.

Jazebizadeh, K. , 1983. Study on parasitic diseases in lake of Zarivar fishes (In Persian). Environmental Protection Organization of Iran.

Jensen, S. ; Bergh, O. ; Enger, O. and Hjeltnes, B. , 2002. Use of PCR-RFLP for genotyping 16s rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. Can. J. Microbiol. Vol. 48, pp.379-386.

Jinu, S. T.,and Goodwin, A. E. 2004. Morphological and genetic characteristics of *Flavobacterium columnare* isolates: correlations with virulence in fish. Journal of fish diseases. 27,pp. 29-35.

Kent, M.l. ; Andree, K.B. ; Bartholomew, J.L. ; El-Matbouli, M. ; Desser, S.S. ; Devlin, R.H. ; Stephen, W.F. ; Hedrik, R.P. ; Hoffmann, R.W. ; Khattra, J. ; Mallett, S.L. ; Siddall, M.E. ; Lester, R.J.G. ; Longshaw, M. ; Palenozeula, O. and Xiao, C. , 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. The Journal Eukaryotic Microbiology. Vol. 84, No. 4, pp.593-314.

Kijewska, A. ; Rokicki, J. ; Sitko, J. and Wegrzyn, G. , 2002. Ascariodea: A simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. Experimental Parasitology. Vol. 101, No. 1, pp.35-39.

Leon, G. ; Martinez, M.A. ; Etchegaray, J.P. ; Figueroa. M.I.V.J. and Krauskopf, M. , 1994. Specific DNA probes for the identification of the fish pathogen. *Renibacterium salmoninarum.* World J. Microbiol. Biotech. Vol. 10, pp.149-153.

Lo, CF. ; Lieu, J. ; Leu, J.H. ; Wang, C.H. and Kou, GH. , 1994. The molecular pathogenesis of *Pleistophora anguillarum* in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proceeding of the International Symposium on Biothechnology in Aquaculture, December 5-10th, Taipei, Taiwan.

Mokhayer, B. , 1983. Parasites and parasitic diseases of fish. The first international symposium of Ichthyoparasitology, Ceeske Budejovice, 8-13 Aug.

Nei, M. , 1972. Genetic distance between populations, American Naturalist. Vol. 106, pp.283-292.

Popgene Microsoft Window-based for Population Genetic Analysis , 1999. A joint Project

magiran.com

Development by Francis C. Yeh and Rong-cai Yang, University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research,

Pourkazemi, M. , 1996. Molecular and biochemical genetic analysis of sturgeon stocks from the South Caspian Sea. Ph.D. Thesis. 266P.

Smother, J.F. ; Von Dohlen, C.D. ; Smith, Jr. L. H. and Kent, M.L. , 1994. Molecular evidence that the Myxooan Protists are metazoan. Sciences. Vol. 265, pp.1719-1721.

Tang, Y.W. ; Procop, G.W. and Persing, D.H. , 1997. Molecular diagnostics of infectious diseases. Clinical chemistry. Vol. 43, pp.2021-2038.

Tiirola, M. ; Valtonen, E.T. ; Kinnunen, P.R. and Kulomaa, M.S. , 2002. Diagnosis of flavor-bacteriosis by direct amplification of rRNA genes. Dis. Aquat. Org. Vol. 51, pp.93-100.

Welker, T.L. ; Shoemaker, C.A. ; Arias, C.R. and Klesius, P.H. , 2005. Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus.* Dis. Aquat. Org. Vol. 63, pp.129-138.

magiran.com

Introducing molecular markers for *Lernaea cyprinacea* and *Lernaea ctenopharyngodoni* using RAPD technique

Pourkazemi M.[(1)*] ; Asadyan H.[(2)] ; Pazooki J.[(3)] ; Masoumian M.[(4)] and Ebrahimzadeh Mossavi H.A.[(5)]

pkazemi_m@yahoo.com

1- International sturgeon Research Institute, P.O.Box: 41635-3464 Rasht, Iran
2- Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch
3- Biological Science Faculty of Shahid Beheshti University, Tehran
4- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran
5- Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 14155-6453 Tehran, Iran

Received: May 2006 Accepted: September 2007

Keywords: RAPD, PCR, *Lernaea cyprinacea, Lernaea ctenopharyngodoni*, Guilan Province, Khouzestan Province

Abstract

Molecular comparison of two parasites *Lernaea cyprinacea* and *Lernaea ctenopharyngodoni* was carried out using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique. A total of 43 *Lernaea* specimens belonging to the two species were collected from the Guilan and Khouzestan Provinces. DNA was extracted using the Phenol-chloroform method. The quality and quantity of DNA was assessed using 1% Agarose gel electrophoresis and spectrophotometer. Polymerase Chain Reaction (PCR) was conducted on the target DNA under specific conditions and PCR products were subjected to electrophoresis on polyacrylamide gels (6%). Polyacrylamide gels were stained using silver nitrate and DNA bands were analyzed with BioCapt software. The genetic analysis was conducted using POP GEN 32 software.

Forty two primers, 10 nucleotides each were used for PCR reaction. Totally, 397 RAPD loci were counted on polyacrylamide gel where 349 identical loci were polymorphic of which some bands may be used as genetic markers for the identification of both *Lernaea* species. Data analysis on PCR products showed higher genetic variation (1.15%) of *Lernaea ctenopharyngodoni* in the Guilan Province as compared to that of the Khouzestan (0.0%). However, genetic variation (27.46%) of *Lernaea cyprinacea* in the Khouzestan province was 7.26 times higher than that of the Guilan province (3.78%). The two species showed a genetic differentiation of approximately 88%. Based on the observed molecular differences, we state that *Lernaea ctenopharyngodoni* is a genetically independent species from *Lernaea cyprinacea.*

* Corresponding author