مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۵، شماره ۳، ۱۳۹۹، ۳۱۹-۳۱۰
مقاله پژوهشی

بررسی مورفومتریک، مولکولی و فیلوژنی گونه‌های انگل داکتیلوژیروس در کپورنقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کپورسرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) پرورشی استان گیلان با استفاده از ژن 28SrDNA

جواد دقیق روحی[۱]، عبدالحسین دلیمی[۲]، محمد پورکاظمی[۳]، محدث قاسمی[۱]، شکوفه شمسی[۴]

[۱] *بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بندر انزلی، ایران*
[۲] *گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران*
[۳] *گروه ژنتیک و اصلاح نژاد آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، تهران، ایران*
[۴] *دانشکده علوم جانوری و دامپزشکی، دانشگاه چارلز استارت، نیو سالت ولز، استرالیا*

تاریخ دریافت: ۱ بهمن ماه ۱۳۹۸، **تاریخ پذیرش:** ۲۰ فروردین ماه ۱۳۹۹
10.22059/jvr.2019.274328.2892

چکیده

زمینهٔ مطالعه: داکتیلوژیروس از انگل‌های خارجی شایع در آبشش کپورماهیان است. این انگل‌ها از ویژگی میزبانی بالایی برخوردارند و بسیاری از گونه‌ها تنها واجد یک میزبان خاص می‌باشند.

هدف: با توجه به گزارشاتی از گونه‌های داکتیلوژیروس اختصاصی کپور نقره‌ای در کپور سرگنده و نیز حضور داکتیلوژیروس‌های کپورسرگنده در کپورنقره‌ای اقدام به بررسی داکتیلوژیروس‌های شایع در این دو گونه ماهی گردید.

روش‌کار: ۸۱ عدد کپور نقره‌ای و ۸۲ عدد کپور سرگنده از ۱۰ مزرعه پرورش ماهی در استان گیلان صید و پس از تهیه لام مرطوب انگل‌های داکتیلوژیروس با گلیسرین ژلاتین تثبیت شدند. به‌منظور ریخت‌سنجی نمونه‌ها از نرم افزار Image J برای ۷ اندازه‌گیری نقطه به نقطه بر روی تصاویر به‌دست آمده استفاده شد. ترسیم نمونه‌های انگلی بوسیله لوله انجام و با کلیدهای شناسایی مقایسه و شناسایی انگل‌ها صورت گرفت. جهت بررسی مولکولی استخراج DNA از یک انگل داکتیلوژیروس انجام و تکثیر ناحیه 28SrDNA با پرایمرهای مربوطه در دستگاه PCR انجام شد.

نتایج: توالی‌های بدست آمده پس از بلاست در بانک ژن نتایج بررسی مورفولوژیک و مورفومتریک انگل‌ها را تأیید نمود. توالی‌ها به‌ترتیب با شماره‌های MG825611 و MG825765 برای انگل‌های *داکتیلوژیروس هیپوفتالمایکتیس* و *داکتیلوژیروس ساچنگتای* جدا شده از کپور نقره‌ای و MH023397 و MH023399 برای انگل‌های *داکتیلوژیروس آریستایکتیس* و *داکتیلوژیروس نوبیلیس* جدا شده از کپور سرگنده در بانک‌ژن ثبت شدند. ترسیم درخت فیلوژنتیک قرابت ژنتیکی انگل‌های جدا شده از این ماهیان را نشان داد.

نتیجه‌گیری نهایی: به‌نظر می‌رسد گاهی بطور ناخواسته و یا سهوی در کارگاه‌های تکثیر کشور، ماهیان دورگه تولید می‌شوند. عدم خلوص‌نژادی موجب می‌گردد تا این ماهیان علاوه بر راندمان رشد و پرورشی ضعیف‌تر، میزبان طیف وسیع‌تری از داکتیلوژیروس‌های اختصاصی کپور نقره‌ای و کپور سرگنده باشند.

کلمات کلیدی: کپورنقره‌ای، کپورسرگنده، داکتیلوژیروس، مولکولی، ژن، 28SrDNA

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: *عبدالحسین دلیمی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران*
پست الکترونیکی: *dalimi_a@modares.ac.ir*

مقدمه

مونوژن‌ها انگل‌های سطحی بسیار رایج در ماهیان استخوانی هستند که اغلب پوست و آبشش ماهیان را آلوده می‌سازند. آلودگی شدید به این انگل‌ها منجر به بروز آسیب‌های قابل ملاحظه‌ای از جمله هایپرپلازی اپیتلیوم رشته‌های آبششی، اختلال در سیستم تنفسی، تأثیر منفی بر رشد و همچنین مرگ و میر بالا به‌ویژه در کپورماهیان کوچک می‌گردد (۲۱،۲۲). جنس داکتیلوژیروس با داشتن ۹۷۱ گونه بزرگ‌ترین جنس در این رده محسوب می‌گردد. تقریباً ۹۵ درصد از کرم‌های این جنس انگل آبشش کپورماهیان می‌باشند (۶،۱۰). این انگل‌ها از ویژگی میزبانی بالائی برخوردارند، یعنی بسیاری از گونه‌ها تنها واجد یک میزبان خاص می‌باشند (۲۱). آلودگی شدید ماهیان به انگل داکتیلوژیروس موجب افزایش حساسیت آن‌ها به عفونت‌های ثانویه می‌گردد و نقش مهمی در بیماریزایی این انگل‌ها دارند، که منجر به خسارات اقتصادی قابل ملاحظه‌ای می‌گردند (۶،۲۴).

کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) و کپور سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) دو گونه از کپورماهیان چینی هستند که پرورش جهانی آن‌ها از سال ۱۹۵۰ آغاز شده است. در ایران نیز این ماهیان از حدود ۴۰ سال قبل به منظور استفاده از کلیه سطوح تروفی به مزارع پرورش ماهیان گرمابی معرفی و پرورش آن‌ها در کنار دو گونه پرطرفدار کپور معمولی و آمور آغاز گردید. سهم این دو گونه در سیستم‌های کشت توام ایران از ۵۰ تا ۷۰ درصد برای کپور نقره‌ای و ۵ تا ۱۰ درصد برای کپور سرگنده متغیر است. براساس آخرین آمار منتشر شده معاونت آبزی پروری شیلات گیلان می‌توان حداکثر تولید کپور نقره‌ای و سرگنده را دراین استان به‌ترتیب ۳۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ تن در سال برآورد نمود. براساس مطالعات انجام شده در کشورتاکنون ۲ گونه داکتیلوژیروس از کپور نقره‌ای و ۳ گونه از کپور سرگنده جداسازی شده که موجب بروز تلفات و خسارات اقتصادی به‌ویژه در بچه ماهیان استخرهای پرورشی می‌گردند (۸).

شناسایی داکتیلوژیریدها اغلب بر اساس ریخت‌شناسی اندام تناسلی نر و بخش‌های مختلف هاپتور نظیر قلاب‌ها، میله رابط و قلاب مرکزی انجام می‌شود (۷). از آنجایی‌که جنس داکتیلوژیروس دارای گونه‌های زیادی است، استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی به تنهایی برای شناسایی گونه‌های نزدیک به هم دشوار و در برخی موارد گمراه کننده است (۴،۲۱).

در سال‌های اخیر استفاده از مارکرهای مولکولی به‌عنوان ابزاری جدید و جایگزینی مناسب برای شناسایی مونوژن‌ها مطرح شده است. اغلب مطالعات جدید با استفاده از مارکرهای مولکولی نواحی rDNA، V4 و ITS برای شناسائی و تمایز گونه‌های مونوژن‌ها صورت پذیرفته است (۵،۱۳،۱۹،۲۰،۲۵).

Chiary و همکاران در سال ۲۰۱۴ دو گونه انگل غیر بومی *Dactylogyrus extensus* و *Dactylogyrus lamellatus* را به‌ترتیب از دو میزبان غیر بومی وارداتی به هند، یعنی کپور معمولی و کپور علفخوار گزارش نمودند. آن‌ها در این بررسی ابتدا از ریخت‌شناسی اندام‌های جفت‌گیری نر و قلاب‌ها برای شناسایی اولیه انگل‌ها استفاده نمودند و در ادامه برای تأیید نهایی، از توالی‌یابی ژن‌های 18SrDNA و 28SrDNA استفاده کردند (۴).

Tu و همکاران در سال ۲۰۱۵ برای نخستین بار انگل *Dactylogyrus formosus* را از ماهی گلدفیش در بخش مرکزی چین گزارش نمودند. آن‌ها در بررسی خود علاوه بر روش ریخت‌شناسی با میکروسکپ نوری و الکترونی از توالی‌یابی ژن 18SrDNA و ITS1 نیز استفاده نمودند (۲۳).

Ling و همکاران در سال ۲۰۱۶ برای شناسایی و تفکیک دو گونه انگل *Dactylogyrus intermedius* و *Dactylogyrus vastator* که از نظر ظاهری بسیار به هم شبیه‌اند از دو روش بررسی مورفومتریک و توالی‌یابی ژن 18SrDNA و ITS1 استفاده نمودند. آن‌ها در پایان نتیجه گرفتند که تمایز این دو گونه با استفاده از اندازه‌گیری‌های مورفومتریک به مراتب آسان‌تر از روش مولکولی است (۱۰).

در کشور ما نیز مطالعات محدودی در زمینه بررسی مولکولی داکتیلوژیروس‌ها انجام شده است. Mozhdeganlou و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی امکان استفاده از DNA استخراجی از آبشش آلوده ماهیان گلدفیش به انگل داکتیلوژیروس به‌منظور شناسایی گونه‌ای آن انگل‌ها پرداختند. بدین منظور ایشان از ژن ITS1 استفاده و نتایج مثبتی بدست آوردند (۱۳).

Ahmadi و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ به بررسی انگل‌های جنس داکتیلوژیروس در دو گونه ماهی کپور معمولی و کپور علفخوار پرورشی در مزارع گرمابی مشهد پرداختند. آن‌ها در بررسی خود علاوه بر روش ریخت‌شناسی با میکروسکپ نوری از توالی‌یابی ژن28SrDNA نیز استفاده نمودند. در پایان انگل‌های

Dactylogyrus extensus، *Dactylogyrus anchoratus* و *Dactylogyrus* sp. از ماهی کپور و *Dactylogyrus lamellatus* را از کپور علفخوار شناسایی نمودند. ایشان در پایان نتیجه گرفتند که استفاده از روش مولکولی برای شناسایی انگل‌های مونوژن موجب اطمینان بخشی به تشخیص مورفولوژیک آن‌ها می‌گردد (۱).

در این تحقیق ابتدا پس از جداسازی انگل‌های داکتیلوژیروس از دو گونه ماهی کپور نقره‌ای و کپور سرگنده اقدام به شناسایی آن‌ها به روش ریخت‌شناسی و مورفومتریک گردید و در ادامه با توالی‌یابی ژن 28SrDNA در این انگل‌ها روابط فیلوژنیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

این بررسی از شهریور ۹۴ تا آذرماه ۹۶ انجام گرفت. در مجموع ۱۶۳ عدد ماهی شامل ۸۱ عدد کپور نقره‌ای و ۸۲ عدد کپور سرگنده یک تابستانه از ۱۰ مزرعه پرورش ماهی گرمابی در کانون‌های اصلی پرورش ماهی استان گیلان در شهرهای رشت، بندر انزلی، فومن، سنگر، شفت، صومعه‌سرا با استفاده از تور محاصره‌ای و یا تور پرتابی (ماشک) صید و همراه با آب همان مزرعه به همراه دبه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه انگل‌شناسی بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی بندرانزلی منتقل و در تعدادی آکواریوم مجهز به هواده نگهداری شدند.

برای بررسی این ماهیان ابتدا آن‌ها را زیست سنجی نموده و در ادامه از پوست و باله آن‌ها گسترش مرطوب تهیه و توسط میکروسکوپ نوری با لنزهای 4X و 10X از نظر آلودگی به داکتیلوژیروس بررسی گردید. در صورت مشاهده انگل داکتیلوژیروس ابتدا نمونه توسط سوزن انسولین برداشته و روی یک لام با استفاده ازگلیسرین ژلاتین تثبیت شد. به‌منظور ریخت سنجی نمونه‌ها از اپیست‌هاپتور انگل‌های مونته شده با استفاده از یک دستگاه میکروسکوپ مدل Nikon Eclipse 50i مجهز به دوربین دیجیتال Nikon Digital Sight DS-SM تصویر برداری شد. به‌منظور ریخت سنجی نمونه‌ها از نرم افزار Image J برای ۷ اندازه‌گیری نقطه به نقطه بر روی تصاویر بدست آمده استفاده شد. ترسیم نمونه‌های انگلی نیز بوسیله یک دستگاه لوله ترسیم مدل Nikon Y-IDT Japan انجام شد. در نهایت ترسیم‌های صورت گرفته از نمونه‌ها به‌همراه داده‌های بدست آمده از اندازه‌گیری‌ها با کلیدهای شناسایی (۲،۷) مقایسه و شناسایی انگل‌ها صورت گرفت.

جدول۱. مقایسه شاخص‌های مورفومتریک (میکرومتر) دو گونه داکتیلوژیروس جدا شده از ماهی کپورنقره‌ای.

گونه	*D. suchengtaii* (n=5)		*D. hypophthalmichthys* (n=5)	
شاخص	مطالعه حاضر	BykhovskayaPavlovskaya (1962)	مطالعه حاضر	BykhovskayaPavlovskaya (1962)
طول بدن	۲۶۰/۴۵±۲/۹۹ (۲۵۸/۳۳-۲۶۲/۵۷)	تا ۳۲۰	۳۸۷/۶۳±۱۰۷/۶۸ (۲۶۳/۴۵-۴۵۵/۱۶)	تا ۴۲۰
عرض بدن	۸۷/۸۷±۹/۳۹ (۷۲/۶۸-۹۷/۴۳)	تا ۸۰	۸۹/۳۲±۱۱/۲۷ (۷۴/۳۲-۱۰۴/۶۸)	تا ۱۱۰
طول قلاب‌های حاشیه‌ای	۲۵/۱۵±۲/۳۲ (۲۱/۷۲-۲۸/۶۷)	۱۹-۳۷	۲۹/۹۸±۳/۷۱ (۲۱/۹۹-۳۵/۰۶)	۲۳-۵۲
طول قلاب‌های میانی	۳۶/۳۶±۱/۵۴ (۳۴/۴۹-۳۸/۳۶)	۳۲-۳۸	۳۰/۵۰±۰/۵۸ (۲۹/۸۹-۳۱/۰۸)	۲۵-۴۶
طول میله رابط	۲۱/۴۵±۰/۰۷ (۲۱/۳۶-۲۱/۵۰)	۲۰-۳۰	۲۴/۵۶±۰/۸۰ (۲۳/۶۴-۲۵/۵۵)	۲۳-۳۱
عرض میله رابط	۴/۳۴±۰/۲۸ (۴/۰۶-۴/۶۳)	۴-۶	۳/۸۸±۰/۳۵ (۳/۵۸-۴/۲۹)	۲-۶
طول اندام جفت‌گیری نر	۲۹/۷۲±۳/۲۱ (۲۷/۴۵-۳۲/۰۰)	تا ۳۰	۲۹/۷۴±۰/۴۶ (۲۹/۴۸-۳۰/۲۸)	۲۹-۳۵

n: تعداد نمونه انگل‌های زیست سنجی شده. دامنه سایز نمونه‌ها داخل پرانتز آورده شده است.

جدول۲. مقایسه شاخص‌های مورفومتریک (میکرومتر) دو گونه داکتیلوژیروس جدا شده از ماهی کپورسرگنده.

گونه شاخص	*D. aristichthys* (n=6)		*D. nobilis* (n=8)	
	مطالعه حاضر	Gussev (1985)	مطالعه حاضر	Gussev (1985)
طول بدن	۳۸۶/۹۹±۱۰۳/۸۱ (۳۱۸/۴۴-۵۰۶/۴۳)	تا ۶۰۰	۴۴۳/۸۷±۱۱۸/۸۸ (۲۹۶/۴۳-۵۹۷/۱۵)	تا ۷۲۰
عرض بدن	۸۷/۹۹±۱/۱۳ (۸۷/۱۹-۸۸/۷۹)	تا ۱۴۰	۱۰۳/۲۳±۱۶/۲۹ (۷۶/۴۶-۱۳۰/۳۸)	تا ۱۷۰
طول قلاب‌های حاشیه‌ای	۲۸/۰۹±۱/۱۶ (۲۴/۲۹-۳۱/۲۲)	۲۴-۳۹	۳۵/۳۶±۲/۹۸ (۳۰/۶۲-۴۰/۸۰)	۳۱-۴۹
طول قلاب‌های میانی	۴۴/۶۱±۰/۸۲ (۴۳/۰۴-۴۶/۲۵)	۴۰-۴۵	۴۴/۴۸±۰/۹۱ (۴۳/۰۴-۴۶/۲۵)	۳۶-۴۹
طول میله رابط	۲۶/۰۹±۱/۰۶ (۲۴/۰۸-۲۷/۴۶)	۲۷-۳۱	۲۹/۸۷±۱/۳۸ (۲۸/۳۷-۳۲/۲۲)	۳۲-۳۵
عرض میله رابط	۵/۶۰±۰/۳۴ (۵/۲۵-۶/۰۰)	۴-۷	۶/۵۳±۱/۲۶ (۴/۹۲-۷/۷۴)	۷-۱۹
طول اندام جفت‌گیری نر	۲۷/۶۳±۱/۵۳ (۲۶/۰۹-۲۹/۸۸)	۲۳-۲۶	۳۵/۸۸±۱/۷۸ (۳۳/۴۸-۳۸/۹۲)	۳۵-۳۸

n: تعداد نمونه انگل‌های زیست سنجی شده. دامنه سایز نمونه‌ها داخل پرانتز آورده شده است.

جدول۳. تخمین فواصل ژنتیکی بین گونه‌های داکتیلوژیروس جداسازی شده از ماهیان کپور نقره‌ای و کپور سرگنده با سایر کپورماهیان پرورشی بر مبنای28SrDNA.

گونه‌های داکتیلوزیروس	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
۱-*داکتیلوژیروس اکستنسوس* (MF288785.1)									
۲-*داکتیلوژیروس مینوتوس* (MF926269.1)	۰/۰۴۴								
۳-*داکتیلوژیروس آکمرووی* (MF979966.1)	۰/۰۶۱	۰/۰۴۹							
۴-*داکتیلوژیروس واستاتور* (MF928712.1)	۰/۱۲۹	۰/۱۳۲	۰/۱۱۴						
۵-*داکتیلوژیروس انکوراتوس* (MF975788.1)	۰/۱۱۵	۰/۱۰۳	۰/۰۹۵	۰/۱۴۰					
۶-*داکتیلوژیروس لاملاتوس* (MG657261.1)	۰/۲۱۲	۰/۲۰۸	۰/۲۱۴	۰/۲۶۵	۰/۲۱۹				
۷-*داکتیلوژیروس هیپوفتالم‌ایکتیس* (MG825611.1)	۰/۲۲۵	۰/۲۳۹	۰/۲۳۴	۰/۲۵۵	۰/۲۳۷	۰/۰۸۶			
۸-*داکتیلوژیروس نوبیلیس* (MH023399.1)	۰/۲۱۵	۰/۲۲۷	۰/۲۳۶	۰/۲۳۵	۰/۲۱۹	۰/۰۸۲	۰/۰۵۵		
۹-*داکتیلوژیروس آریست ایکتیس* (MH023397.1)	۰/۲۱۹	۰/۲۳۴	۰/۲۳۴	۰/۲۳۲	۰/۲۲۵	۰/۰۷۲	۰/۰۵۱	۰/۰۱۷	
۱۰-*داکتیلوژیروس ساچنگتای* (MG825765.1)	۰/۲۳۴	۰/۲۴۳	۰/۲۳۱	۰/۲۵۸	۰/۲۲۸	۰/۰۷۹	۰/۰۲۴	۰/۰۴۶	۰/۰۴۶

جهت بررسی مولکولی از هر نمونه ماهی آلوده یک عدد انگل داکتیلوژیروس در یک میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری محتوی الکل ۷۵ درصد قرار داده و تا زمان استخراج DNA در یخچال ۵ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۸). جهت استخراج DNA ژنومیک از کیت استخراج شرکت یکتا تجهیز آزما (YTA Genomic DNA Extraction Mini Kit, Iran) استفاده شد. جهت تکثیر ناحیه 28SrDNA از پرایمر رفت (5’-TCTAGTAACGGCGAGTGAACG-3’)(۴) و پرایمر برگشت اصلاح شده (5’-AD.Da GTGGGAAGGTCTACCTCAGC-3’) استفاده شد. سپس محلول‌ها در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر آماده شد که شامل ۱۲/۵ مایکرولیتر مسترمیکس، ۱ مایکرولیتر از هر پرایمر (Macrogen, South Korea) و ۲ مایکرولیتر ازDNA الگو بود. واکنش زنجیره‌ای

پلی‌مراز در ترموسایکلر (BIO-RAD, USA) و براساس برنامه ذیل انجام شد، دناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ دقیقه و متعاقب آن ۳۵ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۵۹ درجه سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و گسترش نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. جهت بررسی، محصول روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و سپس توسط یک دستگاه UV-الومیناتور بررسی، عکس‌برداری و ثبت گردید.

به‌منظور توالی‌یابی از هریک از محصولات PCR مقدار ۲۵ مایکرولیتر در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و به‌همراه ۲۰ مایکرولیتر از هریک از پرایمرهای بالادست و پایین‌دست با غلظت ۱۰ مایکرومول که در تیوب‌های مجزا ریخته شده برای شرکت Macrogen, Korea ارسال گردید. نتایج دریافتی از توالی‌یابی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و پس از BLAST در بانک ژن NCBI گونه‌های جداسازی شده شناسایی و ثبت ژن انجام شد. در این بررسی توالی‌های بدست آمده از ژن 28SrDNA پس از هم‌ترازی با Clustal W جهت ترسیم درخت فیلوژنتیک به روش Maximum likelihood (ML) نرم افزار Mega 6.0 مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه تخمین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های داکتیلوژیروس جداسازی شده با استفاده از نرم افزار BioEdit انجام شد.

نتایج

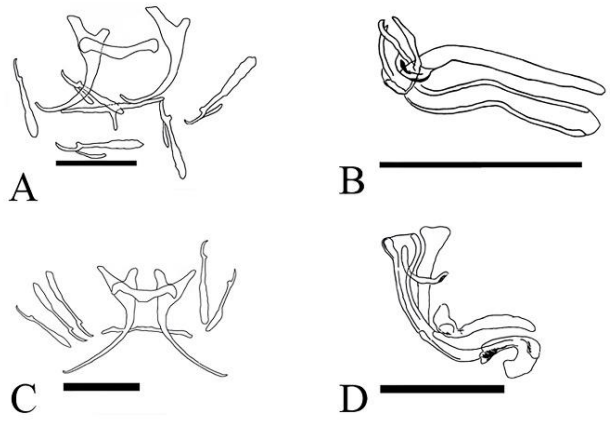
در این بررسی از ۸۱ عدد کپور نقره‌ای ۹۵۶ عدد و از ۸۲ عدد ماهی سرگنده ۳۴۴۹۲ عدد انگل داکتیلوژیروس جداسازی شد. انگل‌های جداسازی شده ابتدا از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفتند. ترسیم اپیستوهاپتور و اندام جفت‌گیری نمونه‌های نر بوسیله لوله ترسیم انجام شد (تصاویر ۱،۲). زیست سنجی نمونه‌ها بوسیله نرم‌افزار Image J از روی تصاویر تهیه شده از نمونه‌های مونته شده انجام گرفت. نتیجه زیست سنجی نمونه‌ها با کلیدهای شناسایی (۳،۸) مقایسه و حضور دو گونه انگل متفاوت در هریک از دو گونه ماهی مورد بررسی، تأیید گردید (جداول ۱،۲).

در این بررسی میزان شیوع آلودگی به انگل‌های *D. hypophthalmichthys* و *D. suchengtaii* در ماهیان کپور نقره‌ای مورد مطالعه به‌ترتیب ۸۱/۴۸ درصد و ۲۹/۶۲ درصد بود.

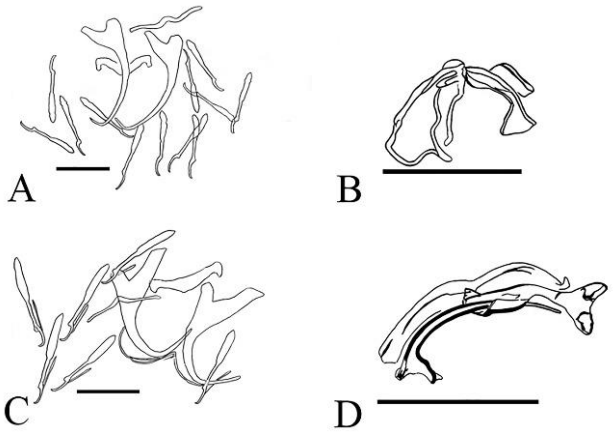
در این بررسی میزان شیوع آلودگی به انگل‌های *D. aristichthys* و *D. nobilis* در ماهیان کپورسرگنده مورد مطالعه به‌ترتیب ۷۴/۳۹ درصد و ۷۵/۶۰ درصد بود.

پس از استخراج DNA و انجام PCR براساس پروتکل مذکور، محصولPCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد (تصویر۳).

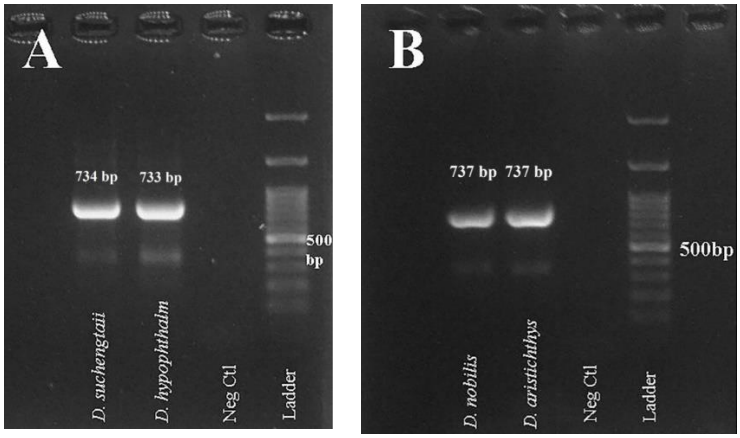
با توجه به نتایج مطلوب به‌دست آمده، از هرگونه ۳ نمونه جهت توالی‌یابی ارسال و نتایج دریافتی از توالی‌یابی پس از پردازش اولیه در بانک ژن NCBI موردBLAST قرار گرفت. نتایج توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده از انگل‌های جدا شده از این ماهیان پس از مقایسه با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن نتایج بررسی مورفولوژیک را تایید نمود. توالی‌های به‌دست آمده، با شماره‌های Accession numberMG825611 برای انگل *D. hypophthalmichthys* و Accession numberMG825765 برای انگل *D. suchengtaii* جدا شده از ماهی کپورنقره‌ای و Accession numberMH023397 برای انگل *D. aristichthys* و Accession numberMH023399 برای انگل *D. nobilis* جدا شده از کپور سرگنده در بانک ژن NCBI ثبت شدند.



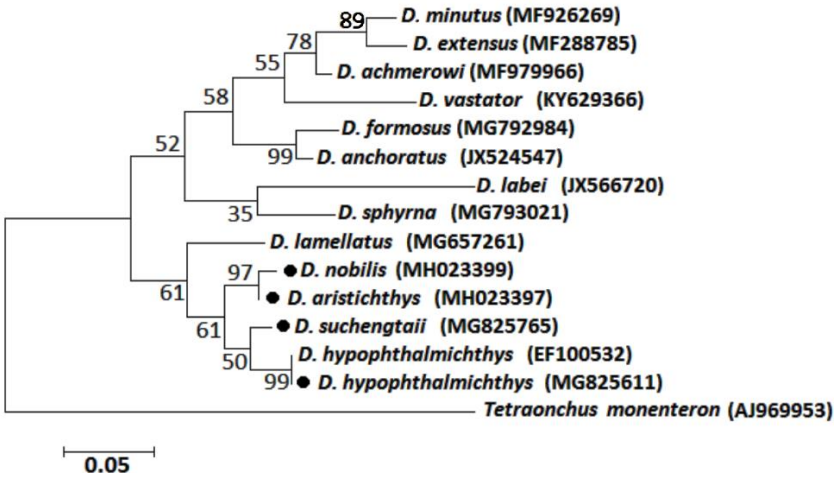
تصویر۱. ترسیم قلاب مرکزی و اندام جفت‌گیری نر انگل‌های جداسازی شده از ماهی کپور نقره ای. در این بررسی A و B: *Dactylogyrus hypophthalmichthys* , C و D: *Dactylogyrus suchengtaii* نوار مقیاس۲۵ میکرومتر).



تصویر۲. ترسیم قلاب مرکزی و اندام جفت‌گیری نر انگل‌های جداسازی شده از ماهی کپور سرگنده در این بررسی A و B: *Dactylogyrus aristichthys* , C و D: *Dactylogyrus nobilis* (نوار مقیاس۲۵ میکرومتر).



تصویر ۳. الکتروفورز محصول PCR حاصل از DNA استخراجی از انگل: A) *D. hypophthalmichthys* و *D. suchengtaii* جدا شده از کپور نقره‌ای B) *D. aristichthys* و *D. nobilis* جدا شده از کپور سرگنده.



تصویر ۴. درخت فیلوژنتیک ترسیم شده به روش Maximum likelihood بر مبنای توالی‌یابی ژن 28SrDNA برای گونه‌های منتخب *Dactylogyrus*، توالی‌های به‌دست آمده در این بررسی با ستاره مشخص شده‌اند و از گونه *T. Monenteron* به‌عنوان Outgroup استفاده شده است. در ابتدای هر شاخه درصد پشتیبانی بوت استرپ بر اساس ۱۰۰۰ تکرار آورده شده است.

درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش Maximum likelihood ترسیم و توالی‌های بدست آمده در این بررسی با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید.

فاصله ژنتیکی بین گونه‌های داکتیلوژیروس شناسایی شده در این بررسی با سایر گونه‌های شایع در کپور ماهیان پرورشی کشور با استفاده از نرم افزار BioEdit محاسبه گردید که در قالب جدول ۳ ارائه شده است.

بحث

در این مطالعه از ماهیان کپور نقره‌ای گونه‌های داکتیلوژیروس *D. hypophthalmichthys* و *D. suchengtaii* و از کپور سرگنده نیز دو گونه *D. nobilis* و *D. aristichthys* به روش ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی شناسایی و در ادامه با استخراج DNA توالی یابی ژن 28SrDNA انجام و ضمن تأیید مطالعات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی، برای نخستین بار از ایران ثبت ژن این انگل‌ها در بانک ژن NCBI انجام گردید. مطالعه حاضر برای نخستین بار در ایران انگل داکتیلوژیروس را در ماهیان کپور نقره‌ای و کپور سرگنده با هردو روش ریخت شناسی و مولکولی مورد بررسی قرار می‌دهد.

اگرچه جنس *Dactylogyrus* دارای حدود ۱۰۰۰ گونه هست اما هنوز داده‌های مولکولی کمی از آن‌ها در دسترس است. استفاده توام از دو روش مولکولی و ریخت شناسی می‌تواند جزیی‌ترین اطلاعات لازم برای فیلوژنی جنس داکتیلوژیروس را فراهم سازد (۱۵). تاکنون مطالعات زیادی با استفاده از ژن 28SrDNA برای شناسایی گونه‌ای و بررسی فیلوژنی جنس

Dactylogyrus انجام شده است. Chiary و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی خصوصیات ریخت شناسی و ژن 28SrDNA گونه *Dactylogyrus labei* را از ماهی کاتلا *Catla catla* از هند به‌عنوان یک میزبان جدید معرفی کردند (۳).

Chiary و همکاران در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۴ دو گونه انگل غیربومی *Dactylogyrus extensus* و *Dactylogyrus lamellatus* را به‌ترتیب از دو میزبان غیربومی وارداتی به هند، یعنی کپور معمولی و کپور علفخوار گزارش نمودند. آن‌ها در این بررسی ابتدا از ریخت‌شناسی اندام‌های جفت‌گیری نر و قلاب‌ها برای شناسایی اولیه انگل‌ها استفاده نمودند و در ادامه برای تایید نهایی، از توالی‌یابی ژن‌های18SrDNA و28SrDNA استفاده کردند (۴).

Nitta و Nagasawa در سال ۲۰۱۶ گونه جدیدی از داکتیلوژیروس را بنام *Dactylogyrus bicorniculus* ازآبشش ماهی بیترلینگ *Rhodeus atremius atremius* که در کشور ژاپن در معرض خطر انقراض بود، شناسایی و سپس با بررسی ژن 28SrDNA جایگاه فیلوژنتیک این انگل را تعیین نمودند (۱۵).

Ahmadi و همکاران درسال ۲۰۱۷ نیز به بررسی انگل‌های جنس داکتیلوژیروس در دو گونه ماهی کپور معمولی و کپور علفخوار پرورشی در مزارع گرمابی مشهد پرداختند. آن‌ها در بررسی خود علاوه بر روش ریخت‌شناسی با میکروسکوپ نوری از توالی‌یابی ژن28SrDNA نیز استفاده نمودند. در پایان انگل‌های *Dactylogyrus extensus*، *Dactylogyrus anchoratus* و *Dactylogyrus* sp. از ماهی کپور و *Dactylogyrus lamellatus* را از کپور علفخوار شناسایی نمودند. ایشان در پایان نتیجه گرفتند که استفاده از روش مولکولی برای شناسایی انگل‌های مونوژن موجب اطمینان بخشی به تشخیص مورفولوژیک آن‌ها می‌گردد (۱).

در مطالعات گذشته انگل‌های داکتیلوژیروس در ماهیان کپور نقره‌ای و کپور سرگنده به روش ریخت شناسی در کشور بررسی شده بود و علاوه بر گونه‌های گزارش شده در این بررسی گونه *D. taihuensis* نیز از کپور سرگنده مزارع پرورش ماهی کشور گزارش شده بود (۱۸). در مطالعه مشابهی در بلغارستان نیز از ماهیان کپور نقره‌ای و کپور سرگنده همین گونه‌های داکتیلوژیروس گزارش و در بررسی ماهیان دورگه حاصل از آن‌ها سه گونه *D. aristichthys*، *D. nobilis* و *D. suchengtaii* شناسایی شدند (۱۱).

در این بررسی ترسیم درخت فیلوژنی (تصویر ۴) و محاسبه فاصله ژنتیکی (جدول۳) نشان داد که داکتیلوژیروس‌های شایع در کپور ماهیان چینی (کپور علفخوار، کپور نقره‌ای و کپور سرگنده) دارای قرابت ژنتیکی زیادی می‌باشند؛ بطوریکه همگی با هم در یک خوشه قرار می‌گیرند. مقایسه توالی ایزوله *D. hypophthalmichthys* در این بررسی با توالی ثبت شده از کشور چین نشان داد که این انگل‌ها از نظر ژنتیکی کاملاً مشابه هم می باشند. لذا با توجه به اینکه کپور نقره‌ای بومی ایران نبوده و حدود چهل سال قبل به‌منظور توسعه آبزی پروری به کشور معرفی شده احتمالاً این انگل نیز به همراه میزبان خود به کشور راه یافته است. متاسفانه برای سایر گونه‌های شناسایی شده در این بررسی توالی ثبت شده‌ای در بانک ژن NCBI وجود نداشت تا مورد مقایسه قرار گیرد.

مطالعات محققین بر روی دو گونه کپور نقره‌ای و سرگنده نشان داد در انتقال آزمایشی انگل داکتیلوژیروس از یک گونه ماهی به گونه دیگر امکان بقاء انگل در میزبان جدید و غیر تخصصی آن تا چند روز نیز وجود دارد. در این آزمایشات تلاش برای انتقال انگل‌های کپور سرگنده (*D. nobilis* و *D. aristichthys*) به دو گونه ماهی کپور معمولی و کاراس با شکست مواجه گردید در حالی‌که همین انگل‌ها در ماهی کپور نقره‌ای استقرار یافته و برای یک دوره کوتاه زنده ماندند (۱۲). در بررسی دیگری چندین نمونه از *D. aristichthys* استثنائا در نمونه‌های کپور نقره‌ای صید شده از استخر نیز مشاهده گردید که می‌توان آن را نتیجه یک آلودگی طبیعی عنوان نمود (۱۴). در ایران نیز انگل *D. hypophthalmichthys* که انگل اختصاصی کپور نقره‌ای است، از ماهی سرگنده صید شده در دریاچه وحدت کردستان گزارش شده و دلیل آن را دورگه بودن احتمالی کپور سرگنده مورد بررسی عنوان نمودند (۹). همچنین در مطالعه‌ای گونه‌های *D. nobilis*، *D. aristichthys* و *D. taihuensis* که از انگل‌های اختصاصی کپور سرگنده محسوب می‌گردند از آبشش ماهی کپور نقره‌ای در دریاچه سد حسنلو از استان آذربایجان غربی گزارش شده است (۲۶).

درخت فیلوژنی حاصل از بررسی حاضر (تصویر ۴) قرابت ژنتیکی بسیار زیاد گونه‌های داکتیلوژیروس شایع در دو گونه کپور نقره‌ای و سرگنده را نشان داد. محاسبه فاصله ژنتیکی بین گونه‌های داکتیلوژیروس جداسازی شده از کپور نقره‌ای و کپور سرگنده (جدول ۳) نیز نشان داد که فاصله ژنتیکی بین این گونه‌ها از ۰/۰۱۷ لغایت ۰/۰۴۶ است که رقم بسیار ناچیزی محسوب می‌گردد. شاید بتوان این قرابت ژنتیکی را یکی از دلایل اصلی موفقیت انتقال موقت گونه‌های داکتیلوژیروس بین کپور نقره‌ای و کپور سرگنده و عدم موفقیت این انتقال به ماهیان کاراس و کپور معمولی دانست که در مطالعات Molnar و همکاران در سال۱۹۸۴ به آن اشاره شده است.

به‌منظور بررسی قابلیت انتقال آلودگی‌های انگلی از والدین خالص به ماهیان دورگه در مرکز تکثیر کپور ماهیان سارواش مجارستان ابتدا هیبریدهای مختلفی از کپور ماهیان تولید شد. مواجه سازی ماهیان دورگه با انگل‌های شایع در والدین آن‌ها نشان داد در اغلب موارد انگل‌های اختصاصی گونه مادری با سهولت بیشتری به فرزندان دورگه انتقال می‌یابند. در این بررسی دورگه‌های حاصل از کپور نقره‌ای ماده و کپور سرگنده نر علیرغم قرار گرفتن در معرض گونه‌های مختلف داکتیلوژیروس تنها به دو گونه *D. hypophthalmichthys* و *D. suchengtaii* آلوده شدند. هیبریدهای حاصل از آمیختگی سرگنده ماده و کپور نقره‌ای نر به چهار گونه داکتیلوژیروس *D. aristichthys*، *D. hypophthalmichthys* ، *D. suchengtaii* و *D. skrjabini* آلوده شدند. زمانی که از ماهی سرگنده یا کپور نقره‌ای نر برای تولید دورگه با کپور علفخوار ماده استفاده شد هیبریدهای حاصله تنها به گونه *D. lamellatus* آلوده شدند. هنگامی که از کپور معمولی ماده و کپور نقره‌ای نر برای دورگه‌گیری استفاده شد هیچ یک از انگل‌های داکتیلوژیروس والدین به فرزندان منتقل نشد (۱۲).

بررسی حاضر را می‌توان تأییدی بر نتایج مطالعات Molnar و همکاران در سال ۱۹۸۴، Musselius در سال ۱۹۶۸ و Jalali و Barzegar درسال ۲۰۰۴ دانست. همان‌طور که پیشتر عنوان شد درخت فیلوژنی حاصل از این بررسی قرابت ژنتیکی زیاد گونه‌های داکتیلوژیروس در کپور ماهیان چینی (کپور نقره‌ای، کپور سرگنده و کپور علفخوار) را نشان داد و انگل‌های این گروه از ماهیان با هم در یک کلاستر و داکتیلوژیروس‌های ماهیانی نظیر کپور معمولی و کاراس نیز در خوشه‌ای مجزا قرار گرفتند. با استناد به این درخت فیلوژنتیک و جدول ۳ و نتایج مطالعات سایر محققین بنظر می‌رسد که گاهی انگل‌های اختصاصی کپور نقره‌ای ممکن است در کپور سرگنده بروز نماید و البته عکس این موضوع نیز صادق است. در توجیه چنین مواردی با توجه به قرابت ژنتیکی داکتیلوژیروس‌های جدا شده از کپور نقره‌ای و کپور سرگنده (جدول ۳) می‌توان دو استدلال را عنوان نمود اول اینکه امکان حضور موقت انگل در میزبان غیر اختصاصی آن تا زمان دستیابی به میزبان اصلی وجود دارد و دوم اینکه احتمالاً گاهی به‌طور ناخواسته و یا در اثر غفلت و یا به‌دلیل کمبود مولد در برخی از کارگاه‌های تکثیر کشور ماهیان دورگه تولید می‌شوند. عدم خلوص نژادی موجب می‌گردد تا این ماهیان علاوه بر راندمان پرورشی ضعیف‌تر، میزبان طیف وسیع‌تری از داکتیلوژیروس‌های اختصاصی کپور نقره‌ای و سرگنده باشند. لذا توجه به تولید بچه‌ماهیان خالص امری ضروری بنظر می‌رسد. از سوی دیگر به منظور اجتناب از بروز هرگونه سوءتفاهمی الزامی است در گزارش حضور برخی از داکتیلوژیروس‌ها علاوه بر خصوصیات ظاهری میزبان پیشینه ژنتیکی آن را نیز در نظر داشت.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مدیریت گروه انگل شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران و مدیریت پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی بندرانزلی صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Ahmadi, A., Borji, H., Naghibi, A., Nasiri, M.R., Sharifiyazdi, H. (2017). Morphologic and molecular (28S rDNA) characterization of *Dactylogyrus* spp. In *Cyprinus carpio* and *Ctenopharyngodon idella* in Mashhad, Iran. Can J Vet Res, 81, 280-284. PMID: 29081585
2. Bykhovskaya-Pavlovskaya, I.E., Gusev, A.V., Dubinina, M.N., Izyumova, N.A., Smirnova, T.S., Sokolovskaya, A.L., Schtein, G.A., Shulman, S.S., Epshtein, V.M. (1962). Key to parasites of freshwater fishes of the USSR. (1th ed.) Academy of Science of the USSR, Zoology Inst. Leningrad, USSR. p. 919.
3. Chiary, H.R., Chaudhary, A., Singh, H.S. (2014a). Morphological redescription and molcular characterization of *Dactylogyrus labei* (Monogenea: Dactylogyridae) from *Catla catla* a new host record in India. Vestnik zool, 48, (5), 451-456. https://doi.org/10.2478/vzoo-2014-0053
4. Chiary, H.R., Chaudhary, A., Singh, H.S., Goswami, U.C. (2014b). Molcular characterization of two non-native species of Dactylogyrus (Monogenea: Dactylogyridae) recovered from introduced hosts in India. BioInvasions Rec, 3, (4), 297-300. http://doi.org/10.3391/bir.2014.3.4.12
5. Cunningham, C.O., McGillivray, D.M., MacKenzie, K. (1995). Phylogenetic analysis of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 based on the small subunit (18S) ribosomal RNA gene. Mol Biochem Parasitol, 71, (1), 139-142. http://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00043-z PMID: 7630378
6. Dove A.D., Ernst, I. (1998). Concurrent invaders—four exotic species of Monogenea now established on exotic freshwater fishes in Australia. Int J Parasitol, 28, (11), 1755–1764.
7. Gussev, A.V. (1985). Parasitic Metazoan: Class Monogenea. In: Key to the Parasites of Freshwater Fishes Fauna of the U.S.S.R. Bauer, O.N. (ed.). (1th ed). Nauka publication, Leningrad, USSR. p. 424.

8. Jalali Jafari, B. (1998). Parasites and Parasitic Diseases of Freshwater Fishes of Iran. (1th ed). Iran Fisheries Company Publication. Tehran, Iran. p. 564.
9. Jalali, B., Barzegar, M. (2004). Parasites of the gills of introduced and native fishes of Vahdat reservoir-Kurdistan. Irn Vet Sci J, 1, (3), 41-50.
10. Ling, F., Tu, X., Huang, A., Wang, G. (2016). Morphometric and Molecular characterization of *Dactylogyrus vastator* and *D. intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol Res, 115, 1755-1765. https://doi.org/10.1007/s00436-016-4913-9
11. Margaritov, N., Nguen, V.T. (1985). Study of the parasitic status and morphometry of monogenea the breeding stock of herbivorous fishes in Bulgaria. Helmintologia, 20, 50-59.
12. Molnar, K., Bakos, J., Krasznai, Z. (1984). Parasites of hybrid fishes. Parasit Hung, 17, 29-34.
13. Mozhdeganlou, Z., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Shayan, P., Soltani, M., Ebrahimzadeh, E., Rostami, M. (2011). Detection of single *Dactylogyrus* spp. in DNA extracted from infected gill tissue of fishes using polymerase chain reaction. Int J Vet Res, 5, (2), 77-80.
14. Musselius, V. A. (1968). On the biology of *Dactylogyrus aristichthys* (Monogenoidea, Dactylogyridae). Parazitologiia, 2, (3), 227-231.
15. Nitta, M., Nagasawa, K. (2016). A new species of *Dactylogyrus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on an endangered freshwater fish, *Rhodeus atremius atremius*, endemic to Japan. Parasitol Int, 65, 483-478. http://doi.org/10.1016/j.parint.2016.06.014
16. Omidzahir, Sh., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Soltani, M., Shayan, P., Ebrahimzadeh, E., Hoseini, M. (2012). Identification of *Gyrodactylus gurleyi* in *Carassius auratus* using morphometric and molecular characterization. J Vet Med, 6, (1), 41-46. http://doi.org/10.22059/ijvm.2012.24624
17. Plaisance, L., Timothy, D., Littlewood, J., Olson, P. D., Morand, S. (2005). Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and colonization of Indo-West Pacific butterflyfish hosts (Perciformes, Chaetodontidae). Zool Scr, 34, (4), 425–436. http://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00191.x
18. Shamsi, S., Jalali, B., Aghazadeh Mesghi, M. (2009). Infection with *Dactylogyrus* spp. among introduced cyprinid fishes and their geographical distribution in Iran. Iran J Vet Res, 10, (1), 70-74.
19. Sharma, P., Agarwal, N., Kumar, S. (2011). Ribosomal DNA and morphological analysis of *Dactylogyrus* species from freshwater fishes of India. J Parasit Dis, 35, (2), 210-214. http://doi.org/10.1007/s12639-011-0060-5
20. Simková, A., Morand, S., Jobet, E., Gelnar, M., Verneau, O. (2004). Molecular phylogeny of congeneric monogenean parasites (Dactylogyrus): a case of intrahost speciation. Evolution, 58, 1001–1018. http://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb00434.x
21. Simkova, A., Pekinkova, M., Rehulkova, E., Vyskocilova, M., Ondrackova, M. (2007). *Dactylogyrus* species parasitizing European *Barbus* species: Morphometric and Molecular variability. Parasitology, 134, 1751-1765.
22. Tu, X., Ling, F., Huang, A.G., Zhang, Q.Z., Wang, G.X. (2013). Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. Parasitol Res, 112, 2839-2845.
23. Tu, X., Ling, F., Huang, A., Wang, G. (2015). The first report of *Dactylogyrus formosus* Kulwiec, 1927 (Monogenea: Dactylogyridae) from goldfish (*Carassius auratus*) in central China. Parasitol Res, 114, 2689-2696. http://doi.org/10.1007/s00436-015-4474-3
24. Woo, P.T., Bruno, D.W., Lim, L.S. (2002). Diseases and Disorders of Finfish in Cage Culture. (1th ed). CABI Publication, Kuala Lumpur, Malaysia, p. 354.
25. Wu, X.Y., Xie, M.Q., Li, A.X. (2007). Initial radiation of *Dactylogyrus* and coevolution with the dactylogyrid-cyprinid association. Curr Zool, 53, 651-658.
26. Yakhchali, M., Aliali, P. (2019). Ectoparasite infestation in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) of Hassanlu dam, West Azarbaijan Province, Iran. Vet Res and Biol Products, 121(4), 73-90. http://doi.org/10.22092/VJ.2018.115958.1374

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 75, Number 3, 2020
Original Article

Morphometric, Molecular and Phylogenic Analysis of *Dactylogyrus* Parasites in Cultivated Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and Big Head Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in Guilan Province Using 28SrDNA Gene

Javad Daghigh Roohi[1], Abdolhossein Dalimi[2], Mohammad Pourkazemi[3], Mohaddes Ghasemi[1], Shokoofeh Shamsi[4]

[1] *Department of Health and Disease of Aquatic Animals, Inland water Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Anzali, Iran*
[2] *Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
[3] *Department of Genetic and Breeding of Aquatic Animals, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran*
[4] *School of Animal and Veterinary Sciences & Graham Centre for Agricultural Innovations, Charles Sturt University, NSW 2650, Australia*

10.22059/jvr.2019.274328.2892
Received: *21 January 2020,* ***Accepted:*** *8 April 2020*

Abstract

BACKGROUND: *Dactylogyrus* is one of the most common external parasites on the gills of Cyprind fish. These parasites are highly host specific and many species only have a specific host.
OBJECTIVES: Since there are reports of silver carp specific *Dactylogyrus* species isolated from big head carp and vice versa, the investigation of Dactylogyrids have been done in these two fish species.
METHODS: 81 silver carp and 82 big head carp were caught from 10 fish farms in Guilan province and after preparing wet mounts of body surface *Dactylogyrus* parasites divided and fixed by glycerin jelly. In order to perform morphometric assessments on captured images, Image J software was used for 7 point to point distances. Drawing of parasites was done by drawing tube and then compared by identification keys and parasites identified. For molecular investigation the genomic DNA was extracted from one parasite specimen and 28S rDNA region of *Dactylogyrus* specimens were amplified by related primers in PCR.
RESULTS: Sequences were deposited in GenBank with accession numbers MG825611 and MG825765 respectively for *D. hypophthalmichthys* and *D. suchengtaii* isolated from *Hypophthalmichthys molitrix*, and also MH023397 and MH023399 respectively for *D. aristichthys* and *D. nobilis isolated* from *Hypophthalmichthys nobilis*. The phylogenetic tree shows the genetic affinity of isolated parasites from these two fish.
CONCLUSIONS: It seems hybrid fish are sometimes produced accidentally in fish reproduction centers of Iran. Racial impurity of silver carp and big head carp is not only the reason of poorer breeding efficiency in fish farms but also these hybrid fish are hosts of more parasitic species.

Keywords: *Hypophthalmichthys molitrix*, *Hypophthalmichthys nobilis*, *Dactylogyrus*, Gene, 28SrDNA

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: dalimi_a@modares.ac.ir Tel/Fax: 021-82883838/021-82883568

How to cite this article:

Daghigh Roohi, J., Dalimi, A., Pourkazemi, M., Ghasemi, M., Shamsi, S. (2020). Morphometric, Molecular and Phylogenic Analysis of *Dactylogyrus* Parasites in Cultivated Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and Big Head Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) in Guilan Province Using 28SrDNA Gene. J Vet Res, 75(3), 310-319. https://doi.org/10.22059/jvr.2019.274328.2892

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Comparison of morphometric (µm) characteristics in two *Dactylogyrus* species recovered from *Hypophthalmichthys molitrix.*
Table 2. Comparison of morphometric (µm) characteristics in two *Dactylogyrus* species recovered from *Hypophthalmichthys nobilis.*
Table 3. Estimation of genetic distances between *Dactylogyrus* species recovered from *H. molitrix* and *H. nobilis* with other farmed carp based on 28SrDNA.
Figure 1. Drawing of opisthaptoral central hook and male copulatory organ of parasites isolated from silver carp in this survey: A & B) *Dactylogyrus hypophthalmichthys* C & D) *Dactylogyrus suchengtaii*.
Figure 2. Drawing of opisthaptoral central hook and male copulatory organ of parasites isolated from Big head carp in this survey: A & B) *Dactylogyrus aristichthys* C & D) *Dactylogyrus nobilis*.
Figure 3. Electrophoresis of PCR products resulted from parasite extracted DNA. A) *D. hypophthalmichthys* & *D. suchengtaii* isolated of silver carp. B) *D. aristichthys* & *D. nobilis* isolated of Big head carp.
Figure 4. Phylogenetic tree constructed by Maximum likelihood method based on partial 28S rDNA sequences for selected species, the sequences derived in this survey are specified by bold points, with *Tetraonchus monenteron* used as the outgroup. The numbers along the branches indicate bootstrap values obtained from 1000 bootstrap replications.