



مقاله پژوهشی

مطالعه میزان آلودگی ماهیان سیم (*Abramis brama* (Berg, 1905) رودخانه  
سیاه‌درویشان استان گیلان به سستود (*Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) و  
بررسی تنوع مولکولی آنها با استفاده از ارزیابی ناحیه ریبوزومی ITS2

عماد احمدی آرا<sup>۱\*</sup>، علی نیک‌پی<sup>۱</sup>

DOI: 10.22124/japb.2023.24804.1501

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۲

چکیده

*Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) یکی از شایع‌ترین انگل‌های ماهیان آب شیرین است. این مطالعه با هدف بررسی آلودگی احتمالی ماهیان سیم (*Abramis brama*) صید شده از رود سیاه‌درویشان به سستود *L. intestinalis* و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی آنها انجام شد. تعداد ۷۵ قطعه ماهی سیم پس از کالبدگشایی، تمام بخش‌های محوطه شکمی آنها از نظر وجود آلودگی به پلوسرکوئیدهای *L. intestinalis* به طور کامل مورد بررسی قرار گرفت. سپس مشخصات مورفومتریک انگل‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد تایید تشخیص قطعی جنس و گونه نمونه‌های انگلی توسط کلیدهای شناسایی انجام شد. برای بررسی مولکولی، تعدادی از نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس بررسی‌های مولکولی از ۱۰ پلوسرکوئید به دست آمده از ۱۰ ماهی با بررسی ژن ITS2 انجام شد. از ۷۵ قطعه ماهی تهیه شده ۱۸ قطعه (۲۴ درصد) آلوده به پلوسرکوئید *L. intestinalis* بودند. در این بررسی کمترین، میانگین و بیشترین اندازه پلوسرکوئیدهای جدا شده به ترتیب ۸، ۲۶ و ۷۴ سانتی‌متر بود. تعیین توالی ژن ITS2 جدایه‌های *L. intestinalis* با نمونه‌های بانک جهانی ژن نشان داد که این جدایه‌ها در میزبان‌های مختلف و بر اساس مقایسه لکوس ژنی ITS2 دارای تفاوت‌های ژنتیکی هستند و حضور گونه‌های وابسته به میزبان در جنس *Ligula* محتمل است.

واژگان کلیدی: *Ligula intestinalis*، ITS2، سیاه‌درویشان، گیلان، PCR.

۱- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

\* نویسنده مسئول: [e.ahmadi@ausmt.ac.ir](mailto:e.ahmadi@ausmt.ac.ir)

## مقدمه

ماهی‌خوار، کرم در روده این پرندگان بالغ می‌شود و تخم‌گذاری می‌کند که در صورت ورود تخم به داخل منابع آبی، چرخه زندگی این انگل از سرگرفته می‌شود (Ahmadiara, 2017). رودخانه سیاه‌درویشان در شمال شهرستان صومعه‌سرا و در فاصله ۲۸ کیلومتری شهرستان رشت به عنوان یکی از مهم‌ترین حوضه‌های آبی تامین‌کننده تالاب انزلی، نقش مهمی را در بازسازی طبیعی ذخایر ماهیان مهاجر دریای خزر ایفا می‌کند. ماهی سیم *Abramis brama* (Berg, 1905) از خانواده کپور ماهیان که به فراوانی در حوضه‌های آبی کشور یافت می‌شود، به علت طعم خوب گوشت و قیمت مناسب، مصرف این ماهی نسبتاً رایج است (Vossoughi and Mostajeer, 2004). با آن که این ماهی از مهم‌ترین ماهیان اقتصادی شیلات در شمال کشور به حساب می‌آید ولی در سال‌های اخیر میزان ذخایر آن در شمال کشور به شدت کاهش یافته و در خطر انقراض قرار گرفته است. لیگولوز (*Ligulosis*) ناشی از پلروسرکوئید *L. intestinalis* یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌های ماهیان آب شیرین بویژه دریاچه‌ها و مخازن آب در بیشتر نقاط دنیا است و گزارش‌های متعددی از لیگولوز گونه‌های

بیماری‌های انگلی از بیماری‌های رایج ماهیان بوده که همواره زیان‌های بهداشتی و اقتصادی قابل توجهی را برای انسان به همراه داشته است. سستود *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) یکی از شایع‌ترین و از نظر اقتصادی از مهم‌ترین انگل‌های بیماری‌زای ماهیان آب شیرین در سراسر دنیا است. چرخه زندگی *L. intestinalis* که نقش مهمی در شیوع و همه‌گیری این آلودگی انگلی دارد، در سه میزبان متفاوت کامل می‌شود. تخم انگل همراه با مدفوع مرغان ماهی‌خوار در حوضه‌های آبی پراکنده می‌شود. در مرحله اول، ابتدا کوراسیدیومی که از تخم خارج شده است وارد بدن سخت‌پوستان میکروسکوپی موجود در آب به عنوان میزبان واسط اول شده و در آنجا تبدیل به نوزاد مرحله اول (پروسرکوئید) می‌شود. این پروسرکوئید، توانایی آلوده کردن ماهیان به عنوان میزبان واسط دوم را خواهند داشت (Eslami, 2006). در مرحله بعد، نوزاد مرحله دوم (پلروسرکوئید) در محوطه شکمی ماهیان تشکیل شده و باعث تورم شکم ماهیان، پارگی آن و افزایش احتمال شکار شدن ماهی توسط پرندگان ماهی‌خوار به عنوان میزبان نهایی می‌شود. بعد از شکار ماهیان آلوده توسط مرغان

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری

در شهریور ماه سال ۱۴۰۰، تعداد ۷۵ قطعه ماهی سیم (*Abramis brama*) صید شده از رودخانه سیاه‌در ویشان همراه با یخ به آزمایشگاه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل منتقل شدند. برای بررسی ریخت‌شناسی، نمونه‌ها در الکل ۷۰ درصد و فرمالین ۱۰ درصد و برای بررسی مولکولی، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### بررسی ریختی و مورفومتری انگل‌های جدا شده

پس از انجام مشاهدات اولیه و ثبت مشخصات ماهی‌ها، جنس و گونه نمونه‌های جمع‌آوری شده با بهره‌گیری از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بر اساس کلیدهای تشخیصی موجود همانند بدن برآمده و فشرده از طرفین، قاعده باله مخرجی به طول دو برابر باله پشتی و داشتن دندان حلقی یک ردیفی، عنوان ماهی سیم (*Abramis brama* (Berg, 1905) تایید شد (Vossoughi and Mostajeer, 2004).

مختلف کپورماهیان از پنج درصد تا آلودگی‌های شدیدتر و نزدیک به سی درصد گزارش شده است (Kennedy and Burrough, 1981; Arme, 1997; Loot et al., 2002; Koyun, 2006; Rahmati-Holasoo et al., 2011; Barson and Marshall, 2013; Rouis et al., 2016; Sac et al., 2016). در مطالعات صورت گرفته بر روی شیوع و پراکندگی لیگولوز در ایران بیشتر گزارش‌های آلودگی از مناطق غرب و شمال غرب کشور بوده است (Jalali and Barzegar, 2006; Hajirostamloo, 2008).

در مطالعه حاضر به بررسی آلودگی احتمالی ماهیان سیم صید شده از تالاب سیاه‌در ویشان به پلروسرکوئید *L. intestinalis* پرداخته شد و پس از جداسازی پلروسرکوئیدها از محوطه شکمی ماهیان آلوده، ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌تواند به درک بهتر تفاوت‌ها یا شباهت‌های احتمالی پلروسرکوئیدهای جدا شده از ماهیان این حوضه آبی با یکدیگر و نمونه‌های موجود در بانک جهانی ژن کمک کند و پیش زمینه‌ای را برای ادامه پژوهش‌ها در این باره در کشور فراهم کند.

استفاده از کیت استخراج DNA (MBST، ایران) و طبق دستور العمل شرکت سازنده صورت پذیرفت. پس از مشاهده قطعات استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد و تخلیص آن، لکوس ژنی ITS2 از کمپلکس ریپوزومی DNA با روش PCR تکثیر و تعیین توالی شد. برای انجام این مطالعه از آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه Ahmadiara و همکاران (۲۰۱۳) برای تکثیر توالی با طول ۴۲۱ باز شامل ITS2 استفاده شد (جدول ۲). نهایتاً فرایند PCR برای ۱۰ نمونه انجام گرفت و بعد از ارزیابی محصولات PCR، خالص سازی آنها و ارزیابی محصول خالص سازی شده PCR صورت پذیرفت. به منظور تعیین توالی هر یک از نمونه ها به طور جداگانه به میکروتیوب های استریل ۱/۵ میلی لیتری انتقال یافت و ضمن بستن درب تیوب ها با پارافیلیم در مجاورت یخ برای خوانش دو طرفه به شرکت زیست فناوری کوثر انتقال یافت.

برای بررسی احشای داخلی، کالبدگشایی ماهی ها انجام شد. تمام بخش های محوطه شکمی برای بررسی حضور یا عدم حضور انگل با استفاده از اسکالپل شکاف داده شد و از نظر وجود آلودگی به پلروسکوئیدهای جنس *Ligula* به طور کامل مورد بررسی قرار گرفت. در صورت یافتن نمونه های آلوده، انگل ها جدا و تعداد آنها یادداشت شد. برای بررسی ریخت شناسی نمونه ها در الکل ۷۰ درصد حفظ و نگهداری شدند. با استفاده از کلید شناسایی (Chubb et al., 1987) و میکروسکوپ نوری، بررسی بیشتر و کامل تر و تایید تشخیص جنس و گونه نمونه های انگلی انجام شد (جدول ۱).

#### بررسی مولکولی، استخراج DNA

برای انجام بررسی های مولکولی از ۱۰ پلروسکوئید به دست آمده از ۱۰ ماهی که در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شدند، استفاده شد. استخراج DNA پلروسکوئیدها با

جدول ۱: کلید شناسایی پلروسکوئیدهای *Ligula intestinalis* و *Diagramma interrupta*

ویژگی ها	گونه
بوتریای ناواضح؛ قابل تفکیک نبودن بندها از هم؛ داشتن یک سری اندام تناسلی در هر بند	<i>Ligula intestinalis</i>
بوتریای ناواضح؛ قابل تفکیک نبودن بندها از هم؛ داشتن دو سری اندام تناسلی در هر بند	<i>Diagramma interrupta</i>

جدول ۲: آغازگرهای رفت و برگشت به منظور تکثیر توالی لکوس ITS2

آغازگر	توالی	طول (bp)
<b>LigIr2</b>	F: 5'-TGGCGGGAAAACCTCGGGCTT-3'	۴۲۱
<b>LigIr2</b>	R: 5'-GCCGCCAACCACCAACAG-3'	۴۲۱

نتایج مربوط به توالی‌های به دست آمده هم‌ردیف‌سازی و مقایسه شد و در صد شباهت یا تفاوت بین توالی‌های نوکلئوتیدهای مشخص شد. نهایتاً ترسیم درخت فیلوژنتیکی با نرم‌افزار MEGA انجام شد. برای پشتیبانی آماری گره‌ها، رسم درخت از روش بوت استرپ با ۵۰۰ تکرار استفاده شد.

### نتایج

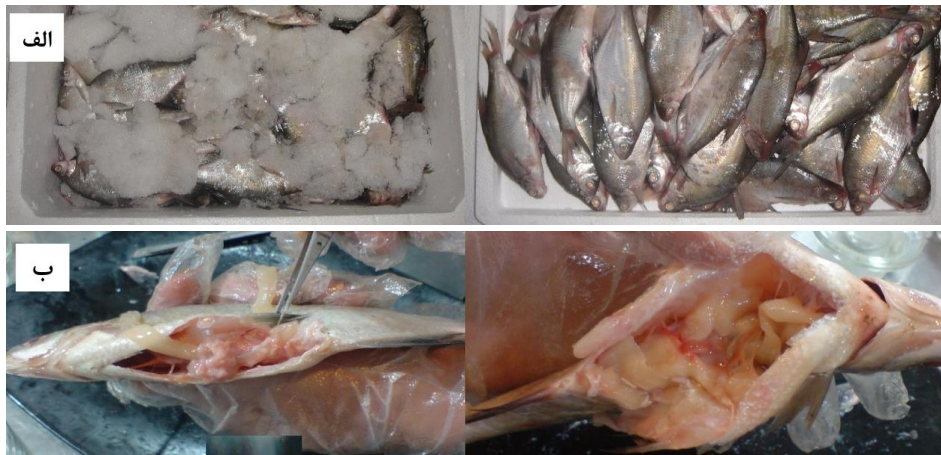
از تعداد ۷۵ قطعه ماهی تهیه شده ۱۸ قطعه (۲۴ درصد) آلوده به پلروسرکوئید *Ligula intestinalis* بودند. بیشترین آلودگی در سه قطعه ماهی با تعداد پنج پلروسرکوئید و کمترین آلودگی در دو قطعه از ماهیان تنها با یک پلروسرکوئید مشاهده شد. به طور میانگین دو تا سه پلروسرکوئید از محوطه شکمی ماهیان آلوده جدا شد (شکل ۱ و جدول ۳).

### بررسی‌های مورفومتریک

در هر قطعه ماهی آلوده از یک تا پنج عدد پلروسرکوئید جدا شد. میانگین طول و وزن پلروسرکوئیدهای *Ligula* جدا شده از ماهی سیم به ترتیب ۲۶ سانتی‌متر و ۱۷/۳۶ گرم ثبت شد. میانگین طول پلروسرکوئیدهای جدا شده از ماهیان آلوده ۲۶ سانتی‌متر بود. در این بررسی کمترین، میانگین و بیشترین اندازه پلروسرکوئیدهای جدا شده به ترتیب ۸، ۲۶ و ۷۴ سانتی‌متر بوده است.

### ریخت‌شناسی نمونه‌ها

بعد از مونته کردن نمونه‌ها تشخیص تفریقی گونه‌های جدا شده با استفاده از کلید تشخیصی سستوها صورت گرفت. تمامی پلروسرکوئیدها از لحاظ ظاهری *L. intestinalis* شناسایی شدند.



شکل ۱: بررسی محوطه شکمی ماهیان سییم. الف) ماهیان سییم تهیه شده قبل از انجام کالبدگشایی و بررسی محوطه شکمی. ب) کالبدگشایی و مشاهده پلوسرکوئیدهای *Ligula intestinalis* در محوطه شکمی ماهیان سییم.

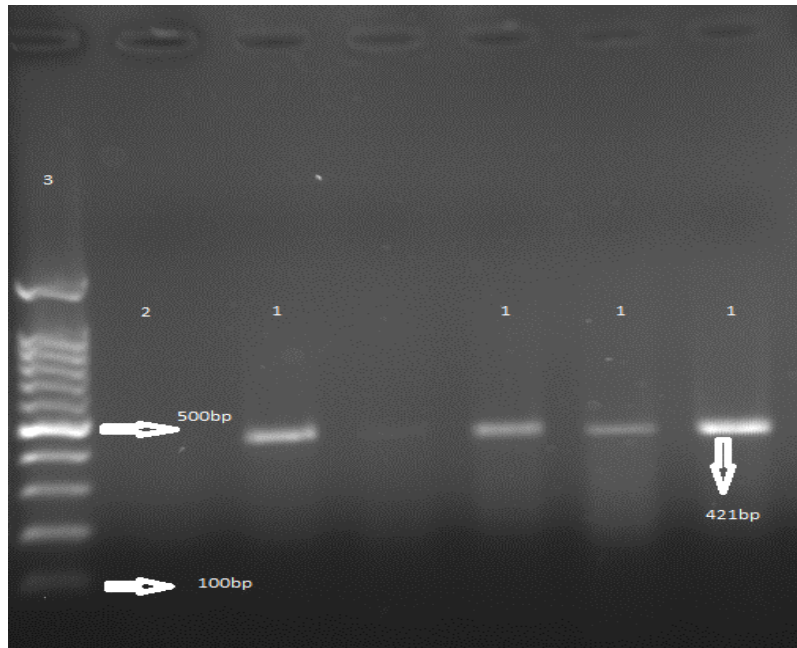
جدول ۳: طول پلوسرکوئیدهای *Ligula intestinalis* جدا شده از ماهیان سییم آلوده

تعداد	طول پلوسرکوئیدها	تعداد	طول پلوسرکوئیدها
۲	بین ۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متر	۱	کمتر از ۱۰ سانتی‌متر
۲	بین ۵۰ تا ۶۰ سانتی‌متر	۲	بین ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر
۱	بین ۶۰ تا ۷۰ سانتی‌متر	۶	بین ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر
۱	بین ۷۰ تا ۸۰ سانتی‌متر	۳	بین ۳۰ تا ۴۰ سانتی‌متر

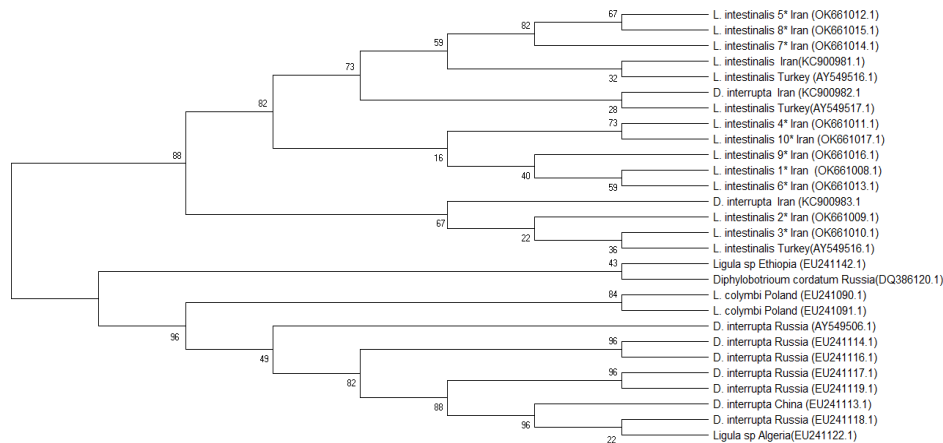
درخت فیلوژنتیک رسم شده مربوط به ۱۰ جدایه *L. intestinalis* در بررسی حاضر در کنار ۱۸ جدایه ثبت شده در بانک جهانی ژن (شکل ۳) نشان داد که ۱۰ جدایه *L. intestinalis* تعیین توالی شده در این مطالعه همگی در یک خوشه اصلی و در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. ۱۰ جدایه

نتایج PCR و ترسیم درخت فیلوژنتیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) لکوس ژنی ITS2 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی LigIr R و LigIr F ضمن بهینه‌سازی شرایط PCR صورت پذیرفت. در شکل ۲ باند مربوط به تکثیر لکوس ژنی ITS2 به خوبی قابل مشاهده و شناسایی است.

*L. intestinalis* در بررسی حاضر با یکدیگر و همچنین در مقایسه با ۱۸ جدایه ثبت شده در بانک جهانی ژن تفاوت‌هایی داشتند. ۲ جدایه از ۱۰ مورد مطالعه حاضر، ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشابه جدایه‌های دیگر *Ligula* را نشان دادند، ولی از لحاظ مولکولی تفاوت‌هایی را با ۸ جدایه دیگر نشان دادند. این دو جدایه *L. intestinalis* 2 (OK661009.1) و *L. intestinalis* 3 (OK661010.1) بیشترین شباهت را با یک جدایه *D. interrupta* (KC900983.1) جدا شده از ماهی سیم داشتند. *L. intestinalis* *Ligula colymbi* و *Diagramma interrupta* باقی ۱۸ جدایه موجود در بانک ژن همگی با فاصله در شاخه‌هایی جدا و دورتر از نمونه‌های مطالعه کنونی و در یک خوشه مستقل قرار گرفته بودند.



شکل ۲: نتایج PCR لکوس ژنی ITS2. الکتروفورز محصول به طول ۴۲۱ جفت باز با زوج آغازگر **LigIr F** و **LigIr R**. ۱: PCR لکوس ژنی ITS2. ۲: شاهد منفی. ۳: مارکر وزنی ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز.



شکل ۳: شماره پذیرش‌های (OK66108-17) مربوط به جدایه‌های *Ligula intestinalis* در مطالعه حاضر با ۱۸ نمونه موجود در بانک جهانی ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X 10.0.5 هم‌ردیف‌سازی شدند. رسم درخت فیلوژنتیک به روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood Method) صورت گرفت.

اندام‌های تناسلی در برخی از بندهای خود بودند

که این پدیده را به سویه‌زایی *L. intestinalis* در هماهنگی با یک میزبان جدید (ماهی سیم) مرتبط دانست. این گونه که وقتی ماهیان سیم برای اولین بار وارد دریاچه‌ای در روسیه شدند، این ماهیان میزبان بسیار مناسبی برای پلوسرکوئیدهای *L. intestinalis* شدند و این پلوسرکوئیدها برای افزایش تولیدمثل، به مضاعف کردن اندام‌های تناسلی خود پرداختند (Dubinina, 1980). Logan و همکاران (۲۰۰۴) به بررسی رابطه تبارشناسی بین سستودهای خانواده Diphyllbothriidae در ماهیان مختلف در مناطق مختلف جغرافیایی بر

بحث

طی بررسی Ahmadiara و همکاران (۲۰۱۳) بر روی کیپورماهیان سد ارس و مراغه در شمال غرب کشور به ترتیب آلودگی به انگل‌های *D. interrupta* و *L. intestinalis* به ترتیب به میزان ۱۶ و ۶۳/۱۹ درصد گزارش شد (Ahmadiara et al., 2013). Pazooki و همکاران (۲۰۰۷) نیز در ماهیان سیم سد ارس آذربایجان غربی شیوع (۳۳/۳ درصد) لیگولوز را گزارش کردند.

Dubinina در سال ۱۹۸۰ از ماهیان سیم پلوسرکوئیدهای *L. intestinalis* را جدا کرد که بر خلاف حالت عادی دارای دو ردیف



اساس مقایسه ژن ITS2 پرداختند. در این مطالعه نمونه‌های *L. intestinalis* آب‌های ترکیه با نمونه‌های اروپایی و نمونه‌هایی که از چین گرفته شده بود از لحاظ مولکولی بسیار متفاوت بودند و به احتمال بسیار زیاد گونه‌ای دیگر از جنس *Ligula* بودند (Logan et al., 2004). همچنین تشابه مولکولی بالای جنس‌های *Ligula* و *Diagramma* مشاهده شد و این نتایج موید این می‌تواند باشد که جنس *Ligula* می‌تواند حاوی سویه‌ها یا گونه‌های مختلف بسته به گونه میزبان و موقعیت جغرافیایی باشد و از طرف دیگر جنس *Diagramma* نیز می‌تواند یکی از همین گونه‌ها بوده و تعریف جنس مستقلی به نام جنس *Diagramma* همسو با نظر عده دیگری از پژوهشگران بی‌اعتبار باشد. جنس *Diagramma* تنها بر اساس داشتن دو سری اندام تناسلی در هر بند بر خلاف *Ligula* که در هر بند یک سری دستگاه تناسلی دارد، متمایز شده است. اما انواع چند شکلی *Diagramma* جای بحث فراوانی دارد و باعث تردید فراوان در پذیرش این جنس تنها با تکیه بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی شده است. از لحاظ ظاهری موارد متفاوتی از جنس *Diagramma* گزارش شده است. مطابق مطالعات بعضی از پژوهشگران به نظر می‌رسد *Diagramma* بیشتر یک مورد غیرمعمول و دارای دستگاه تناسلی مضاعف از جنس *Ligula* باشد تا یک جنس مستقل. Dubinina در سال ۱۹۸۰ حالت دو شکلی را در جنس *Diagramma* گزارش کرد. او در ماهی سیم اشکال دارای یک سری اندام تناسلی را مشاهده کرد، در حالی که جنس *Diagramma* را از کپور معمولی و ماهی طلایی در همان مطالعه با یک سری اندام تناسلی در سراسر طول پلوسرکوئید گزارش کرد (Dubinina, 1980). Liao و Liang (۱۹۸۷) نیز به بررسی جدایی‌هایی از پلوسرکوئیدهای *Diagramma* پرداختند که اشکال متفاوتی را نشان می‌دادند، به گونه‌ای که این پلوسرکوئیدها در قسمت پیشین خود حاوی یک سری اندام تناسلی و در قسمت پسین همان پلوسرکوئید حاوی دو سری اندام تناسلی بودند (Liao and Liang, 1987). با توجه به موارد گفته شده تفکیک و شناسایی گونه‌های پلوسرکوئید بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی دشوار بوده و نیاز به روش‌های تکمیلی است. از این رو، بررسی مولکولی نمونه‌ها به عنوان یک روش مناسب در تشخیص در حد گونه و سویه، در مناطق بومی ضروری به نظر می‌رسد. Luo و همکاران (۲۰۰۳) به بررسی قرابت ژنتیکی

آمده مشخص شد که می‌توان از لکوس ژنی ITS2 در بررسی‌های تبارشناسی در سستوهای این خانواده استفاده کرد. همان‌طور که پیش‌تر بدان اشاره شد *L. intestinalis* از مهم‌ترین و شایع‌ترین کرم‌های نواری آلوده کننده کپورماهیان در آب‌های داخلی است که می‌تواند تاثیر بسزایی در کاهش جمعیت طبیعی و جمعیت استخرهای پرورشی این ماهیان داشته باشد.

در مجموع، با توجه به اثرات منفی *L. intestinalis* بر صنعت آبی‌پروری و بروز آلودگی‌های انسانی، تهدید جدی برای سلامت عمومی جامعه و اکوسیستم‌های آبی کشور به شمار می‌رود. از این رو، ضرورت شکستن چرخه زندگی انگل در حوضه‌های آبی و ورود سازمان‌های بهداشتی ذی‌ربط در راستای پیشگیری و کنترل آلودگی و همچنین ضرورت انجام بررسی‌های جامع‌تر در این زمینه به شدت احساس می‌شود.

#### تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنه) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شده است.

*D. interrupta* و *L. intestinalis* بر اساس ژن ITS پرداختند. نتایج این مطالعه شباهت‌های بسیار زیادی را بین دو گونه *L. intestinalis* و *D. interrupta* نشان داد. درجات بسیار پایین تغییرات نوکلئوتیدی بین این دو جنس ممکن است تایید کند که جدایه‌های *D. interrupta* متعلق به همان جنس *Ligula* باشد و پیشنهاد داده شد که ممکن است دو گونه متفاوت از یک جنس باشند و این نتیجه توسط پژوهشگران دیگری در چین، فرانسه و ایران نیز تایید شده است (Li and Liao, 2003; Bouzid et al., 2008; Ahmadiara et al., 2017). در مطالعه حاضر مشاهده شد که اختصاصی بودن میزبان در مناطق مختلف جغرافیایی ایران احتمالاً وجود دارد. چنان که همانند بررسی Pazooki و همکاران (۲۰۰۷) از آذربایجان غربی، از ماهیان سیم تنها پلوسرکوئیدهای *L. intestinalis* جدا شد. تفاوت توالی‌های *L. intestinalis* جدا شده در این پژوهش با نمونه‌های گزارش شده از نقاط دیگر دنیا که در بانک جهانی ژن به ثبت رسیده است، می‌تواند بیانگر تاثیر جغرافیا بر ایجاد تنوع ژنتیکی در سستوهای این خانواده باشد. با توجه به توالی‌های نوکلئوتیدی به دست

## منابع

- Ahmadiara E. 2017.** Is *Ligula intestinalis* really a probable threat to public health? *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 4: 36–36.
- Ahmadiara E., Hosseini S.H., Jalousian F., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Sakhaifar S. and Gerami Sadeghiyan A. 2013.** The study of the plerocercoid of Diphyllbothriidae (Cestoda, Pseudophyllidea) in two cyprinid hosts, *Abramis brama* and *Alburnoides bipunctatus* from north and northwest of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 7(2): 103–109. doi: 10.22059/IJVM.2013.35060
- Arme C. 1997.** Ligulosis in two cyprinid hosts: *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Journal of Helminthology*, 34: 191–196. doi: 10.1079/JOH2002101
- Barson M. and Marshall B.E. 2013.** The occurrence of the tapeworm, *Ligula intestinalis* (L.), in *Barbus paludinosus* from a small dam in Zimbabwe. *African Journal of Aquatic Science*, 28: 1–4. doi: 10.2989/16085910309503782
- Bouزيد W., Sovan Lek M., Mace O., Ben Hassine R., Etienne R., Legal L. and Loot G. 2008.** Genetic diversity of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Diphyllbothriidae) based on analysis of inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46: 289–296. doi: 10.1111/j.1439-0469.2008.00471.x
- Chubb J.C., Pool D.W. and Weltkamp C.J. 1987.** A key to species of cestodes (tapeworms) parasitic in British and Irish freshwater fishes. *Journal of Fish Biology*, 31(4): 517–543. doi: 10.1111/j.1095-8649.1987.tb05256.x
- Dubinina M.N. 1980.** Tapeworms (Cestoda, Ligulidae) of the Fauna of the USSR. Amerind Publishing Company, UK. 320P.
- Eslami A. 2006.** Veterinary Helminthology, Vol.: Cestoda (In Persian). University of Tehran Press, Iran. 328P.
- Hajirostamloo M. 2008.** The occurrence and parasite host of *Ligula intestinalis* in Sattarkhan Lake (East Azerbaijan-Iran). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7: 221–225.
- Jalali B. and Barzegar M. 2006.** Fish parasite in Zarivar Lake. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 8: 47–59.
- Kennedy C.R. and Burrough R.J. 1981.** The establishment and subsequent history of a population of *Ligula intestinalis* L. in roach *Rutilus rutilus* (L.). *Journal of Fish*

- Biology, 19: 105–126. doi: 10.1111/j.1095-8649.1981.tb05815.x
- Koyun M. 2006.** The seasonal effects of *Ligula intestinalis* L. (Cestodes: Pseudophyllidea) on *Alburnus alburnus* (Cyprinidae). International Journal of Zoological Research, 2: 75–76. doi: 10.3923/ijzr.2006.73.76
- Li J. and Liao X. 2003.** The taxonomic status of *Digramma* (Pseudophyllidae: Ligulidae) inferred from DNA sequences. Journal of Parasitology, 89: 792–799. doi: 10.1645/GE-3078
- Liao X.H. and Liang Z.X. 1987.** Distribution of ligulid tapeworms in China. Journal of Parasitology, 73: 36–48. doi: 10.2307/3282341
- Logan F.J., Horak A., Stefka J., Aydogdu A. and Scholz T. 2004.** The phylogeny of diphylobothriid tapeworms (Cestoda: Pseudophyllidea) based on ITS-2 rDNA sequences. Parasitology Research, 94(1): 10–15. doi: 10.1007/s00436-004-1164-y. Epub 2004 Jul 27. PMID: 15278441
- Loot G., Lek S., Dejean D. and Guegan J.F. 2002.** Parasite-induced mortality in three host populations of the roach *Rutilus rutilus* (L.) by the tapeworm *Ligula intestinalis* (L.). Journal of Ecology of Freshwater Fish, 11: 168–177. doi: 10.1051/limn/2001010
- Luo H.Y., Nie P., Yao W.J., Wang G.T. and Gao Q. 2003.** Is the genus *Digramma* synonymous to the genus *Ligula* (Cestoda: Pseudophyllidea)? Parasitology Research, 89: 419–421. doi: 10.1007/s00436-002-0802-5
- Pazooki J., Masoumian M., Yahyazadeh M. and Abbasi J. 2007.** A Report on occurrence and parasite-host of *Ligula intestinalis* in Sattarkhan Lake (East Azerbaijan-Iran). Journal of Agricultural Science and Technology, 9: 25–33. doi: 10.5281/zenodo.1331091
- Rahmati-Holasoo H., Hajimohammadi B., Ahmadiara E., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Rostami-Bashman M., Haghghi Khiabani Asl A., Haghdoost I.S., Shokrpour S. and Ghorbanalipour A.A. 2011.** Study of infestation of *Alburnoides bipunctatus* with *Ligula intestinalis* in Latian Reservoir Dam Lake, Tehran Province, Iran: A histopathological study. Human and Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society, 3: 18–24.
- Rouis S.O., Rouis A.O., Dumont H.J., Magellan K. and Arab A. 2016.** Dynamics and effects of *Ligula intestinalis* (L) infection in the native fish *Barbus callensis* Valenciennes, 1842 in Algeria. Acta Parasitologica, 61: 307–318. doi: 10.1515/ap-2016-0041
- Sac G., Serezli E.E. and Okgerman H. 2016.** The Occurrence of *Ligula*

*intestinalis* in its fish host *Rutilus rutilus* (L) and the effects of parasite on the fish growth (Buyukckmece Reservoir, Turkey). Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries

Research, 2: 142–150. doi: 10.3153/JAEFR16016

**Vossoughi G.H. and Mostajeer M.S. 2004.** Freshwater Fish (In Persian). Tehran University Press, Iran. 334P.



Research Paper

**Study of *Abramis brama* (Berg, 1905) infection with *Ligula intestinalis* (Linnaeus, 1758) in Siah Darvishan River and survey of them molecular diversity by evaluation of the ribosomal ITS2 region**

Emad Ahmadiara<sup>1\*</sup>, Ali Nikpay<sup>1</sup>

DOI: 10.22124/japb.2023.24804.1501

Received: July 2023

Accepted: August 2023

**Abstract**

*Ligula intestinalis* (Linnaeus 1758) is one of the most common parasites of freshwater fish. This study was conducted to survey the possibility of infection of freshwater breams (*Abramis brama*) caught from Siahdarvishan River and their morphological and molecular characteristics were investigated. 75 breams, after dissection, all parts of their abdominal cavity completely were examined for the presence of the *L. intestinalis* plerocercoids. Then, the morphometric characteristics of parasites were investigated. In the next step, the definitive identification of the genus and species of parasitic samples was confirmed by identification keys. For molecular analysis, the samples were stored at -20°C. Then, molecular studies were done on 10 plerocercoids obtained from 10 separate fish by analysis of ITS2 gene. From 75 *A. brama* samples, 18 fish (24%) were infected by *L. intestinalis*. In this study, the minimum, mean and maximum size of the isolated plerocercoids were 8, 26 and 74cm, respectively. Sequencing of the ITS2 gene of *L. intestinalis* isolates with GenBank samples showed that these isolates had genetic differences in different hosts and based on the comparison of the ITS2 gene locus, and the presence of host-dependent species in the genus *Ligula* is probable.

**Key words:** *Ligula intestinalis*, ITS2, Siahdarvishan, Guilan, PCR.

1- Assistant Professor in Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

\*Corresponding Author: [e.ahmadi@ausmt.ac.ir](mailto:e.ahmadi@ausmt.ac.ir)