13 (3) 13-20, Autumn 2021

**Journal of Animal Environment**

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

## Original Research Paper

# Study of morphology and phylogeny of *Mosgovoyia pectinata* (Cestoda; Anoplocephalidae) from European wild hares (*Lepus europaeus*) in Northwestern Iran

***Abbas Imani Baran* *, Ghadir Alvandi, Masoumeh Firouzamandi, Rogayyeh Norouzi, Farzad Katiraee***

*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran*

**Key Words**

*Lepus europaeus*
*Mosgovoyia pectinata*
18S rRNA
Phylogeny
Iran

**Abstract**

**Introduction:** One of the most important and common endoparasites in wild rabbits is a cestode known as *Mosgovoyia*. This study was aimed to identify *Mosgovoyia pectinata* in the wild rabbits (*Lepus europaeus*) from northwestern Iran based on microscopic and molecular methods and determine its phylogenetic position. For this purpose, the intestines of 45 hunted wild rabbits were examined and cestodes were collected.

**Materials & Methods:** The morphological characteristics of cestodes were recorded microscopically (optical and Scanning Electron Microscope). For molecular analysis, after DNA extraction, approximately a 324-347 bp specific-species fragment of 18S rRNA gene were amplified by the designed primers. PCR products were sequenced. To determine the relationship between the obtained sequence and the sequences deposited to the GenBank, the phylogenetic tree was constructed with maximum likelihood method using MEGA X software.

**Result:** On microscopic examination, 17% of rabbits were infected with cestodes. Microscopic analyses were confirmed *M. pectinata* morphology characterizations. In molecular analysis, approximately 324-347 bp bands were visualized. The sequencing of PCR products confirmed 333 bands specific to *M. pectinata*. The alignment of the amplified fragment with the two isolates from Finland (AY752650.1) and United Kingdom (AY752648.1) showed significant intraspecific variations. The Iranian isolate revealed high homology with the British isolate (approximately 96%). To determine the phylogenetic relatedness, the Iranian isolate was placed in the same clade with the Finland and British isolates, as well as with a species of *Schizorchis* sp.

**Conclusion:** Due to the limited information on this cestode, further studies are needed, especially with other gene regions.

* Corresponding Author's email: a.imani@tabrizu.ac.ir

Received: 7 July 2020; Reviewed: 17 September 2020; Revised: 21 October 2020; Accepted: 25 November 2020

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.256724.2406

**مقاله پژوهشی**

# مطالعهٔ ریخت‌شناسی و فیلوژنی سستود *موسگوویا پکتیناتا* از خرگوش‌های وحشی

***عباس ایمانی‌باران*، قدیر الوندی، معصومه فیروزامندی، رقیه نوروزی، فرزاد کتیرایی***

*گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران*

**کلمات کلیدی**

*موسگوویا پکتیناتا*
*لپوس یوروپئوس*
18S rRNA
فیلوژنی
ایران

## چکیده

**مقدمه:** یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین انگل‌های داخلی در خرگوش‌های وحشی، سستودی بنام موسگوویا (خانوادهٔ آنوپلوسفالیده) است. هدف از مطالعهٔ حاضر شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی گونهٔ موسگوویا پکتیناتا در خرگوش‌های وحشی شمال‌غرب ایران و تعیین جایگاه فیلوژنی آن بود. در این مطالعه رودهٔ ۴۵ خرگوش وحشی شکار شده بررسی شدند.

**مواد و روش‌ها:** مشخصات مورفولوژی سستودهای موجود در مشاهدات میکروسکوپی (نوری و الکترونی) ثبت شدند. برای آنالیز مولکولی، پس از استخراج DNA، قطعهٔ تقریباً ۳۴۷-۳۲۴ جفت بازی اختصاصی گونه از ژن 18S rRNA توسط پرایمرهای طراحی شده تکثیر شد. محصولات PCR تعیین توالی شدند. برای مشخص نمودن رابطهٔ خویشاوندی توالی مذکور با توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعات ژنی بین‌المللی (GenBank)، درخت فیلوژنی با حداکثر درست‌نمایی و با استفاده از نرم‌افزار MEGA X ترسیم شد.

**نتایج:** در بررسی میکروسکوپی ۱۷٪ از خرگوش‌ها آلوده به سستود بودند. آنالیزهای میکروسکوپی جزئیات مورفولوژی، تأییدی برای آلودگی خرگوش‌ها با گونهٔ موسگوویا پکتیناتا بود. در آنالیز مولکولی باندهایی تقریبی ۳۴۷–۳۲۴ جفت بازی تشکیل شدند. تعیین توالی محصولات PCR قطعهٔ ۳۳۳ جفت بازی اختصاصی موسگوویا پکتیناتا را تأیید کرد. هم‌ترازی قطعهٔ تکثیر شده با دو ایزولهٔ فنلاند (AY752650) و انگلستان (AY752648) تفاوت‌های داخل گونه‌ای قابل توجهی را نشان داد. ایزولهٔ ایرانی شباهت بالایی با ایزولهٔ انگلستان (تقریباً ۹۶٪) داشت. در بررسی رابطهٔ خویشاوندی، ایزولهٔ ایرانی با ایزوله‌های فنلاند و انگلستان، هم‌چنین با گونه‌ای از سستود شیزورکیس (*Schizorchis* sp.) در یک شاخه قرار گرفتند.

**نتیجه‌گیری و بحث:** با توجه به محدود بودن اطلاعات مربوط به این سستود، مطالعات بیش‌تر، به‌ویژه با سایر نواحی ژنی، ضروری است.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: a.imani@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۷ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲۷ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۳۰ مهر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۵ آذر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.256724.2406

## مقدمه

خرگوش‌ها پستاندارانی کوچک در خانوادهٔ لپوریده از راستهٔ لاگومورفا هستند. تاکنون ۱۱ جنس برای خانوادهٔ لپوریده شناسایی شده‌اند و جنس *لپوس* (*Lepus*) خرگوش‌های واقعی را شامل می‌شود. یکی از مهم‌ترین گونه‌های جنس *لپوس*، خرگوش اروپایی (*Lepus europaeus*) است که با اسامی خرگوش وحشی قهوه‌ای، خرگوش دراز گوش شرقی و خرگوش مرغزار شرقی نیز معروف است و دارای گسترده‌ترین پراکنش جغرافیایی در منطقهٔ پالئارکتیک است. پراکنش جهانی این گونه در اروپای شمالی، مرکزی و غربی و آسیای غربی از جمله شمال فلسطین اشغالی، شمال عراق و غرب ایران است (Rewatkar و همکاران، ۲۰۱۳؛ Tavassoli و Bakht، ۲۰۱۴؛ بهداروند و همکاران، ۱۳۹۶). خرگوش‌ها، به‌عنوان میزبان‌های واسط یا نهایی، در طول زندگی خودشان با طیف وسیعی از اکتوپارازیت‌ها و اندوپارازیت‌ها آلوده می‌شوند. شایع‌ترین اندوپارازیت‌ها در خرگوش‌ها انگل‌های کرمی دستگاه گوارش هستند. این گروه از انگل‌ها عموماً در مواد مغذی میزبان سهیم می‌شوند و هم‌چنین از بافت‌های میزبان تغذیه کرده و یا از سلول‌های دستگاه گوارش برای تکمیل سیر تکاملی خودشان استفاده می‌کنند. آلودگی‌های شدید با اندوپارازیت‌های کرمی در خرگوش‌ها با تأثیر منفی بر شرایط طبیعی بدن باعث کاهش بقای میزبان، افزایش صید آن‌ها توسط صیادان، کاهش باروری خرگوش‌های ماده، مرگ و میر در تمام گروه‌های سنی می‌شوند و بدون تردید چنین پیامدهای منفی در مختل شدن موازنهٔ طبیعی جمعیت خرگوش‌های یک منطقه نقش مهمی دارند (Rewatkar و همکاران، ۲۰۱۳؛ Marhoon و همکاران، ۲۰۱۸؛ Tanjung و Ranjkut، ۲۰۱۹؛ Ball و همکاران، ۲۰۲۰). سستودهای تحت خانوادهٔ آنوپلوسفالینه (ردهٔ سیکلوفیلیده آ، خانوادهٔ آنوپلوسفالیده) گروه وسیعی از اندوپارازیت‌های کرمی آلوده‌کنندهٔ پستانداران کیسه‌دار و پرندگان را تشکیل می‌دهند. هم‌چنین، پستانداران خشک‌زی با دامنهٔ خویشاندی خیلی گسترده، میزبان‌های اصلی برای طیف وسیعی از سستودهای سیکلوفیلد شناخته می‌شوند (Hoberg و همکاران، ۱۹۹۹). براساس تعداد جنس‌های شناخته شده از این میزبان‌ها، مهم‌ترین طیف میزبانی برای سستودهای آنوپلوسفالین مربوط به جوندگان و خرگوش‌ها (لاگومورف) هستند (Spasskii، ۱۹۵۱؛ Beveridge، ۱۹۹۴). در میان سستودهای آنوپلوسفالین، گونه‌های *موسگوویا* (Spasskii، ۱۹۵۱) دارای پراکندگی وسیع با شیوع خیلی بالا در بین جمعیت‌های خرگوش‌های دنیا، به‌ویژه در نیم‌کرهٔ شمالی، هستند (Tanjung و Ranjkut، ۲۰۱۹). سستود *موسگوویا* ابتدا از خرگوش‌های اهلی و وحشی، تحت گونه‌ای به نام *موسگوویا سیتوتنیا* (*M. cittotaenia*) (Goeze, 1782)، معرفی شد (Spasskii، ۱۹۵۱). در بازنگری جامع تاکسونومیکی توسط Beveridge به‌صورت سه گونهٔ *موسگوویا پکتیناتا* (*Mosgovoyia pectinata*)، *موسگوویا کتنوئیدس* (*M. ctenoides*) و *موسگوویا واریابیلیس* (*M. variabilis*) در اعضای خانوادهٔ لپوریده برای این سستود نامگذاری گردید (Beveridge، ۱۹۷۸)، درحالی‌که این سستود قبلاً به‌طرق مختلف به جنس‌های *موسگوویا*، *کتنوتنیا*، *سیتوتنیا* و *نئوکتنوتنیا* اختصاص داده می‌شدند (Haukisalmi و همکاران، ۲۰۱۰). در طبقه‌بندی اولیه از مورفولوژی رحم برای تفکیک گونه‌ها استفاده می‌کردند، ولی بررسی‌های تخصصی بعدی مبنای ریخت‌شناسی رحم را که معیار اصلی و اولیه برای تفاوت‌های فیلوژنی عمیق در درون سستودهای آنوپلوسفالینه درنظر گرفته می‌شد، رد کردند. هم‌چنین، نقش اندام‌های تناسلی مضاعف به‌عنوان راهکاری برای واگرایی ژنتیکی، نتوانست از یک الگوی ثابت و یکسان، که در فرضیه‌های اولیه پیشنهاد شده بود، پیروی کند. نقشه‌های فیلوژنی برای سستودهای آنوپلوسفالید توسط Baer (۱۹۲۷)، Spasskii (۱۹۵۱)، Tenora (۱۹۷۶) و Beveridge (۱۹۹۴) پیشنهاد شده‌اند، ولی هیچ‌کدام از این نقشه‌ها مبتنی بر روش‌های مرسوم برای ترسیم فیلوژنی نبودند. Spasskii (۱۹۵۱) از طریق تشخیص تفریقی تحت خانوادهٔ آنوپلوسفالینه با یک رحم لوله‌ای ابتدائی و تحت خانوادهٔ مونیزی اینه با یک رحم منشعب یا رتیکولار ابتدائی، الگوهای تکامل رحم را در طبقه‌بندی سیستماتیک آنوپلوسفالیده مدنظر قرار داد. این نوع طبقه‌بندی بعداً توسط Tenora (۱۹۷۶) پذیرفته شد ولی مورد قبول Yamaguti (۱۹۵۹)، Schmidt (۱۹۸۶) و Beveridge (۱۹۹۴) واقع نشد (Wickstrom و همکاران، ۲۰۰۵). مشخصات میکروسکوپ الکترونی *موسگوویا پکتیناتا* در خرگوش‌های وحشی در دنیا، با استفاده از روش SEM، نشان داده نشده است. هم‌چنین روابط سیستماتیک مربوطه به گونه‌های *موسگوویا* و سستودهای با خویشاوندی نزدیک در دنیا کم‌تر مطالعه شده و در ایران هیچ بررسی در این ارتباط وجود ندارد. اخیراً مشخص شده است که ژن اسیدریبونوکلئیک ریبوزومی تحت‌واحد کوچک 18S (18S rRNA) یک ابزار خوب برای اثبات روابط خویشاندی در انواع موجودات ازجمله کرم‌های پهن انگلی در سطوح تاکسونومی بالا محسوب می‌شود (Mariaux، ۱۹۹۶؛ Littlewood و Bray، ۲۰۰۱). هم‌چنین، نشان داده شده است که توالی‌های DNA میتوکندریایی و تغییرات تکاملی خیلی بالای آن‌ها برای بررسی روابط خویشاوندی خیلی نزدیک جانوری، نواحی ژنی مناسب و کارا هستند (Brown و همکاران، ۱۹۸۲). به‌طور کلی، محققان ثابت کرده‌اند مطالعات انگل‌شناسی در شفاف‌سازی خصوصیات بیولوژیکی مربوط به لاگومورف‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند (Segovia و همکاران، ۲۰۱۴). بررسی منابع نشان می‌دهند در گزارش آلودگی به گونه‌های *موسگوویا* در انواع خرگوش‌ها در نقاط مختلف دنیا، شناسایی گونه‌ها عمدتاً بر اساس مورفولوژی انگل‌ها انجام شده است و به‌جز تعیین موقعیت

فیلوژنی آن‌ها، شناسایی براساس روش مولکولی تاکنون صورت نگرفته است. بنابراین، هدف از مطالعهٔ حاضر فراهم نمودن اطلاعاتی جامع درخصوص *موسگوویا پکتینای* (سستود خرگوش‌وحشی) جمع‌آوری‌شده از خرگوش‌های وحشی شمال‌غرب ایران با استفاده از روش میکروسکوپ نوری، میکروسکوپ الکترونی و آنالیز مولکولی مبتنی بر توالی ژنی 18S rRNA و تعیین جایگاه فیلوژنی *موسگوویا پکتینا* در بین سستودهای آنوپلوسفالینه با استفاده از تعیین توالی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نمونه‌های انگل و ترسیم درخت فیلوژنی بود.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری نمونه:** در این مطالعه تعداد ۴۵ نمونهٔ دستگاه گوارش خرگوش‌های وحشی شکار شده از شمال‌غرب ایران (استان‌های آذربایجان‌شرقی و غربی) در فصل شکار از شکارچیان جمع‌آوری شد. برای جلوگیری از اتولیز، نمونه‌ها در اسرع وقت به دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تبریز منتقل شدند و پس از باز نمودن روده‌ها و جداسازی انگل‌ها در صورت آلوده بودن، نمونه‌های انگل به اقتضای نوع بررسی (مورفولوژیک و مولکولی) به شیوهٔ مناسب نگه‌داری شدند.

**بررسی ریخت‌شناسی *مسگوویا پکتیناتا*:** برای این منظور، ابتدا قسمت‌های مختلف سستود با استفاده از روش اختصاصی رنگ‌آمیزی اشنایدر استوکارمین، رنگ‌آمیزی شدند (Eslami و Ranjbar Bahadori، ۲۰۰۴) و در زیر میکروسکوپ نوری، جزئیات ریخت‌شناسی سستود ثبت شدند. برای بررسی ریخت‌شناسی سستود با استفاده از میکروسکوپ الکترونی به‌روش SEM، نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی مرکز تحقیقات علوم پایهٔ دانشگاه تبریز ارسال شدند و تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه‌ها به‌دست آمد.

**آزمایش مولکولی برای شناسایی گونهٔ *مسگوویا پکتیناتا*:** در این مرحله با استفاده از روش تغییر یافتهٔ فنل-کلروفرم (Campos و Gilbert، ۲۰۱۲)، DNA مورد نیاز از ۵۰ میلی‌گرم از بافت انگل استخراج شد. برای شناسایی گونهٔ *موسگوویا پکتیناتا*، از توالی ژنی 18S rRNA مربوط به این گونه (شماره دسترسی AY752650.1 و AY752648.1) ثبت شده در بانک اطلاعات ژنتیکی جهانی (NCBI)، استفاده شد. توالی پرایمرهای طراحی شده با برنامهٔ نرم‌افزار طراحی پرایمر (Primer 3) برای تکثیر قطعهٔ به‌طول تقریبی ۳۴۷-۳۲۴ جفت باز به‌شرح زیر می‌باشند:

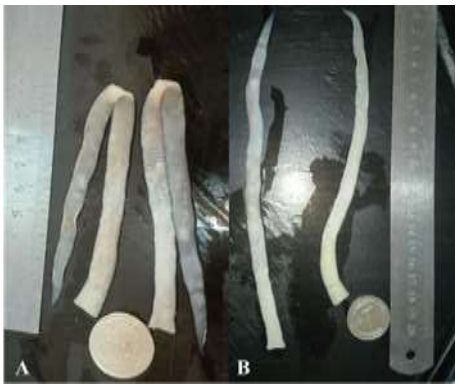
Forward: F-MosG 5'-AGAGTAGTGCACCGGTAGCC-3'
Reverse: R-MosG 5'-CTTCATCGACACACGAGCCGA-3'

هر واکنش PCR در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر نمونهٔ DNA، پنج میکرولیتر بافر PCR (10x)، چهار میکرولیتر $MgCl_2$ (25 mM)، دو میکرولیتر از هر dNTP (10 mM)، یک میکرولیتر از هر پرایمر پیش‌ران و معکوس (10 µM)، ۰/۶ میکرولیتر (5U/µl) آنزیم پلی‌مراز Taq، و ۲۹/۴ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر (ddH2O) انجام شد. برنامهٔ زمان‌بندی برای انجام PCR با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (MWG Biotech Inc Primus 96, 220 VAC thermal cycler, Primus, Germany) به‌ترتیب زیر بود: یک چرخه برای شروع دناتوره شدن دو رشته DNA در دمای ۹۴°C به‌مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل: ۳ چرخهٔ متوالی، ۹۴°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷°C به‌مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۶۰ و در آخر توسعهٔ نهایی در دمای ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه. پس از انجام واکنش، محصولات PCR به‌دست آمده بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ تهیه‌شده با بافر استاندارد TAE که با اتیدیوم بروماید نیز رنگ‌آمیزی شده بود، الکتروفورز شدند. پس از مرحلهٔ الکتروفورز باندهای تشکیل شده بر روی ژل آگارز با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده و عکس‌برداری شدند.

**تعیین توالی محصول PCR و ترسیم درخت فیلوژنی:** برای به‌دست آوردن توالی قطعهٔ تکثیر شدهٔ ژن 18S rRNA، حدود ۲۰ میکرولیتر از محصولات PCR به‌دست آمده همراه با ۱۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (غلظت pmol/ul ۵) برای توالی‌یابی به شرکت مورد نظر (Bioneer, southern Korea) ارسال شدند. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Bioedit sequence alignment editor, version 7.0.5.3 هم‌تراز شدند. هم‌ترازی با توالی‌های مشابه ثبت شده در GenBank با استفاده از برنامهٔ CLUSTAL X version 1.8 (Thompson و همکاران، ۱۹۹۷) انجام شد. برای مشخص نمودن رابطهٔ خویشاوندی توالی مذکور با توالی‌های ثبت شده در GenBank، درخت فیلوژنی با حداکثر درست‌نمایی و با استفاده از نرم‌افزار MEGA X به روش Maximum Likelihood ترسیم شد.

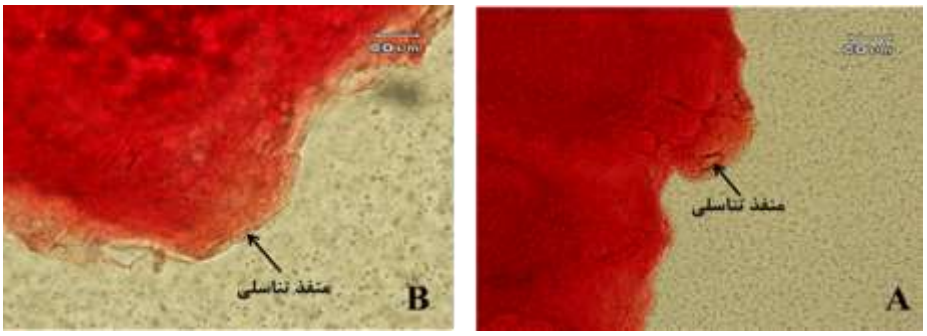
## نتایج

از ۴۵ نمونه رودهٔ خرگوش، تعداد ۸ نمونه آلوده به سستود *موسگوویا پکتیناتا* بودند. سستودهای خارج شده از رودهٔ باریک به‌طور میانگین ۲۰ سانتی‌متر طول و ۱/۴ سانتی‌متر عرض داشتند (شکل ۱). در بررسی میکروسکوپ نوری، تخم‌ها در بند بارور مثلثی یا هرمی شکل و خیلی شبیه به تخم مونیزیا اکسپانزا بودند (شکل ۲). هر بند بالغ دارای یک زوج منافذ تناسلی بود که در یک سوم میانی لبهٔ جانبی هر بند قرار داشتند (شکل ۳: A و B). در تمام طول سستود، عرض بندها خیلی بیش‌تر از طول آن‌ها بود (بیش‌تر از ۴ برابر) و این تفاوت در بندهای نابالغ خیلی بیش‌تر بود (Haukisalmi و همکاران، ۲۰۱۰؛ Eslami و همکاران، ۲۰۰۹).



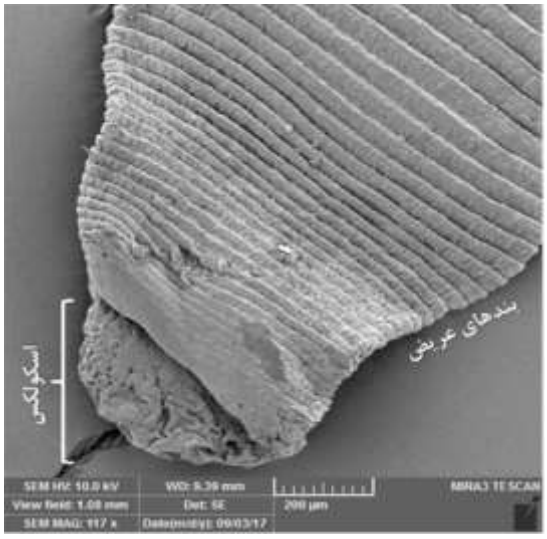

شکل ۱: شکل کامل *موسگوویا پکتیناتا* (A, B)

شکل ۲: تخم‌های مثلثی شکل در بندهای بارور

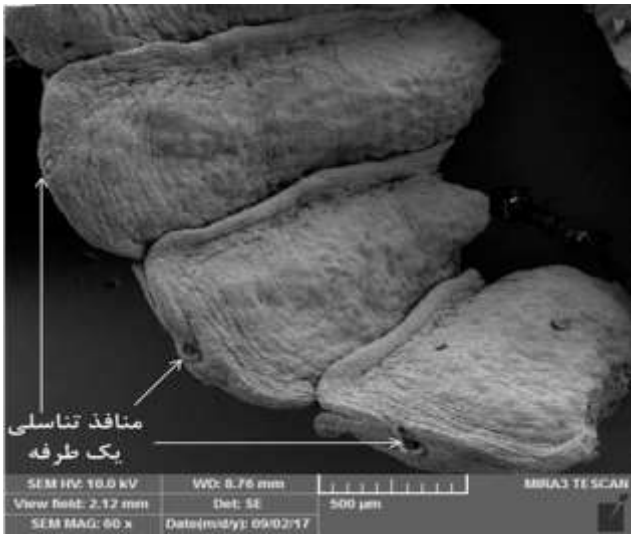



شکل ۳: منافذ تناسلی در بند بالغ (A و B)

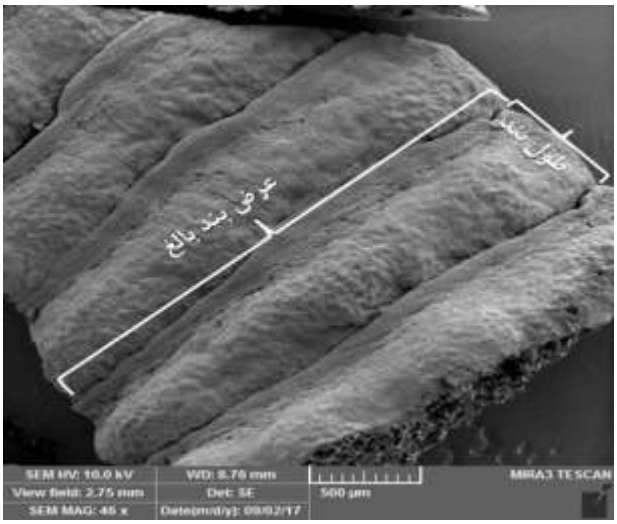
در بررسی اشکال میکروسکوپ الکترونی، در قسمت قدامی که متشکل از بندهای نابالغ است، عرض بندها بسیار بیش‌تر از طول آن‌هاست (شکل ۴). شکل ۵ وضعیت منافذ تناسلی را در هر بند بالغ نشان می‌دهد که هر بند دارای یک جفت منفذ تناسلی در موقعیت یک سوم میانی لبهٔ جانبی هر بند است. شکل ۶ موقعیت ۴ بادکش را بر روی یک اسکولکس کوچک نشان می‌دهد. به‌دلیل چروکیده بودن این قسمت بادکش‌ها به‌خوبی قابل مشاهده نیستند، ولی محدودهٔ آن‌ها تا حدودی معلوم است. اسکولکس بدون روستلوم می‌باشد و با فلش نشان داده شده است. شکل ۷، بندهای بالغ را نشان می‌دهد که در این بندها نیز عرض بندها طویل‌تر از طول (بیش‌تر از ۴ برابر) آن‌هاست.



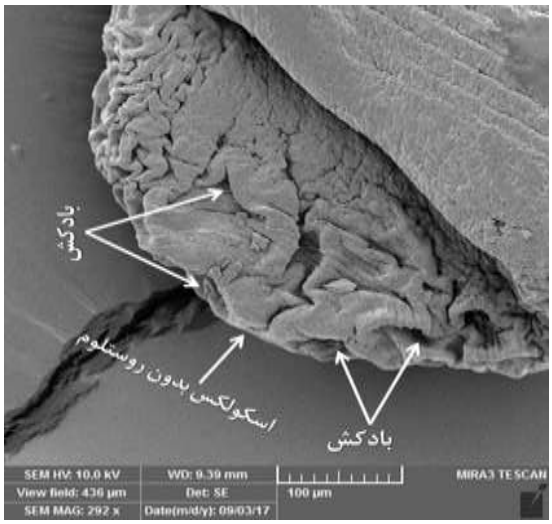

شکل ۴: اسکولکس کوچک، بندهای نابالغ و خیلی عریض (SEM)




شکل ۵: منافذ تناسلی در لبهٔ جانبی و در موقعیت میانی هر بند



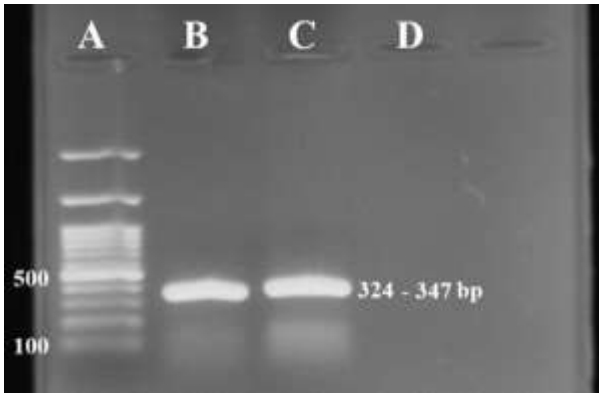

**شکل ۶: اسکولکس، موقعیت چهار بادکش و عدم وجود روستلوم**



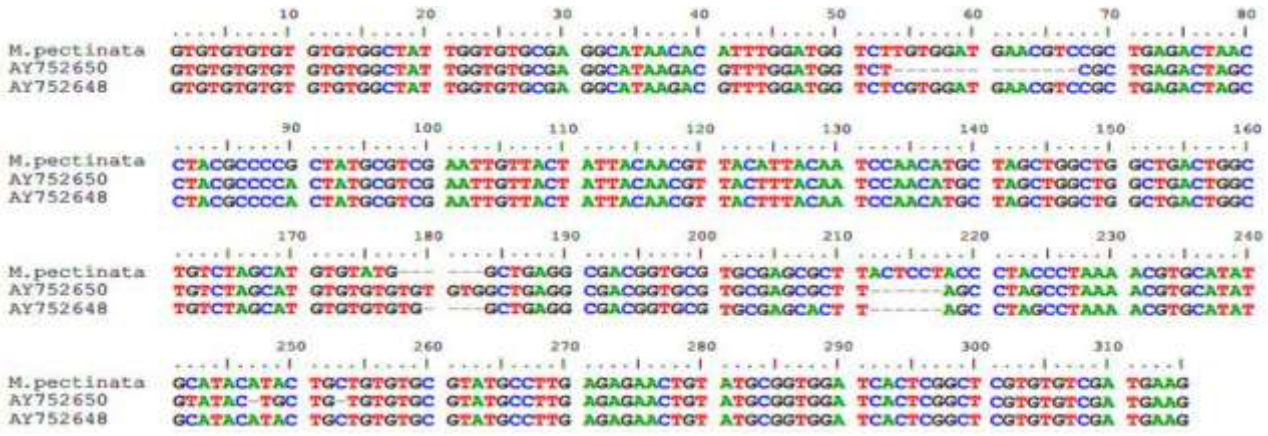

**شکل ۷: بندهای بالغ، تناسب عرض نسبت به طول هر بند**

**آنالیز PCR:** طبق شکل ۸، قطعهٔ تکثیر شده به طول تقریبی ۳۲۴-۳۴۷ جفت بازی از ژن 18S rRNA اختصاصی گونهٔ *موسگوویا* پکتینا با کیفیت بسیار خوب پس از الکتروفورز و عکس‌برداری بر روی ژل آگارز نمایان شد.

**تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی:** توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده از توالی‌یابی قطعهٔ تکثیر شدهٔ ژن 18S rRNA، به‌صورت توالی جدید در BLAST بانک‌ژنی NCBI با توالی‌های قبلی ثبت‌شده‌در آن مقایسه شد و توالی‌های مشابه آن شناسایی شدند. نکتهٔ جالب در نمونهٔ *موسگوویا پکتیناتای* جدا شده از خرگوش‌های‌وحشی شمال‌غرب ایران این بود که تعداد نوکلئوتیدهای قطعهٔ تکثیر شده پس از تعیین توالی ۳۳۳ جفت‌باز بودند، به‌طوری‌که تعداد نوکلئوتید در ایزولهٔ ایرانی کم‌تر از تعداد نوکلئوتیدهای قطعهٔ مذبور در ایزولهٔ انگلستان (AY752648.1)، ۳۴۷ جفت باز، ولی بیش‌تر از تعداد نوکلئوتیدهای قطعهٔ مربوطه در ایزولهٔ فنلاند (AY752650.1)، ۳۲۴ جفت باز، بود. توالی ایزولهٔ ایرانی خیلی شبیه به توالی ایزولهٔ انگلستان می‌باشد (شکل ۹).

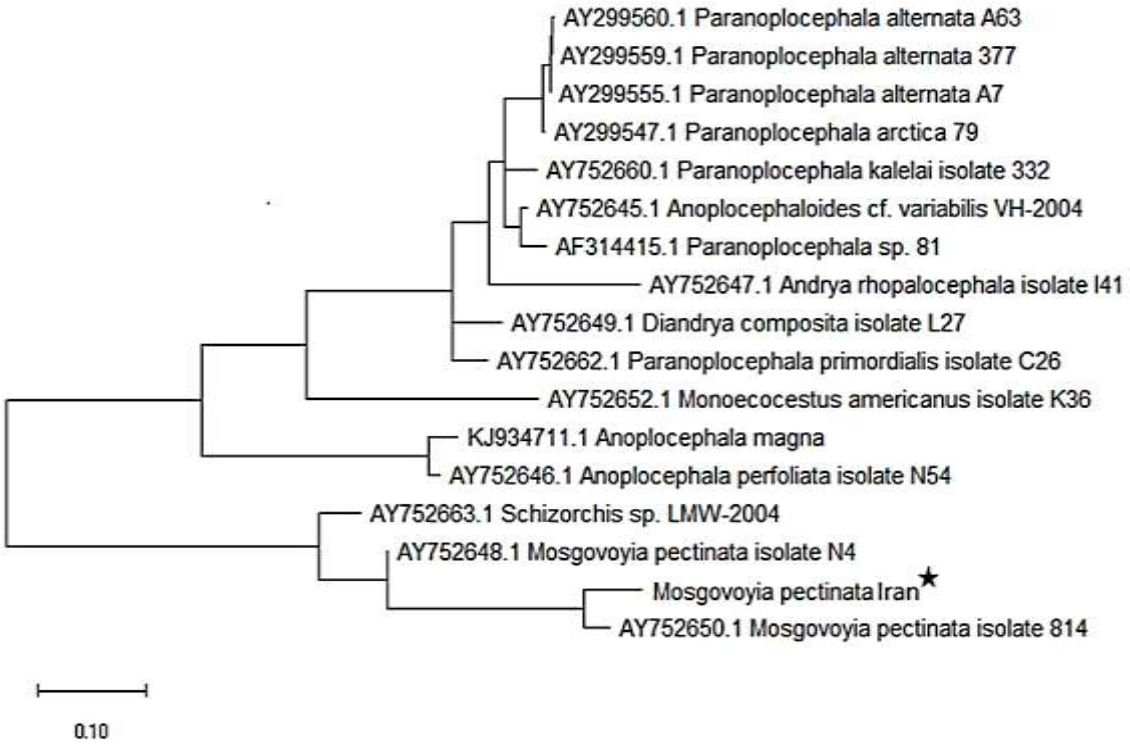



**شکل ۸: الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های *موسگوویا پکتیناتا*: B و C: باندهای مربوط به قطعهٔ ۳۴۷-۳۲۴ جفت‌بازی تکثیرشده‌از توالی ژنی 18S rRNA *موسگوویا پکتیناتا*؛ A: ماکر ۱۰۰ جفت باز؛ D: کنترل منفی**




**شکل ۹: هم‌ترازی ایزولهٔ *M. pectinata* جدا شده از خرگوش‌های شمال‌غرب ایران با دو ایزولهٔ فنلاند (AY752650) و انگلستان (AY752648)**

نتایج به‌دست آمده از ترسیم درخت فیلوژنی نشان داد که ایزوله‌های مشابه *موسگوویا پکتیناتا*، همراه با ایزوله‌ای از سستود شیزورکیس (Schizorchis sp.LMW-2004, AY752663.1)، دارای رابطهٔ فیلوژنی مونوفیلی بوده و در یک کلاد یا شاخه قرار گرفتند.




**شکل ۱۰: درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس توالی ژنی 18S rRNA به‌دست آمده از GenBank، ارتباط فیلوژنی ایزولهٔ *موسگوویا پکتیناتای* جدا شده از خرگوش وحشی ایران را با ایزوله‌های *موسگوویا پکتیناتای* جدا شده از خرگوش‌های وحشی فنلاند (AY752650) و انگلستان (AY752648) و هم‌چنین سایر گونه‌های سستودهای آنوپلوسفالید از کشورهای مختلف نشان می‌دهد. ایزولهٔ ایرانی *موسگوویا پکتیناتا* با ستاره نشان داده شده است.**

## بحث

به‌طور کلی *موسگوویا پکتیناتا*، به‌عنوان انگل شایع خانوادهٔ لپوریده، عمدتاً در گونه‌های جنس *لپوس* یافت می‌شود، ولی *اوریکتولاگوس کانیکولوس* (*Oryctolagus cuniculus*) را نیز آلوده می‌کند و این واقعیت در بررسی آلودگی‌های انگلی خرگوش‌های *اوریکتولاگوس کانیکولوس*، *لپوس یوروپئوس* و *لپوس گراناتنسیس* (*L. granatensis*) در منطقهٔ تماس این سه میزبان (ایبریان پنینسولا) به اثبات رسید (Casanova و همکاران، ۲۰۰۰). هم‌چنین، آلودگی *اوریکتولاگوس کانیکولوس* در ایبریان پنینسولای اسپانیا با دو گونهٔ *موسگوویا کتنوئیدس* و *موسگوویا پکتیناتا* گزارش شده است (Cordero و همکاران، ۱۹۹۴). از طرفی، *موسگوویا کتنوئیدس* انگل شایع در بین خرگوش‌های *اوریکتولاگوس کانیکولوس* در قارهٔ اروپاست، ولی چون این گونهٔ خرگوش در جزایر بریتانیا حضور ندارد، بنابراین گونهٔ *موسگوویا کتنوئیدس* در منطقهٔ مربوطه مشاهده نمی‌شود و به سبب حضور گونهٔ *لپوس کاپنسیس*، شایع‌ترین گونه در این منطقه *موسگوویا پکتیناتا* است (Foronda و همکاران، ۲۰۰۳a). در بررسی شیوع آلودگی‌های انگلی خرگوش صحرایی در ایران (۱/۶٪) (Eslami و همکاران، ۲۰۰۰)، خرگوش ایبری (*Lepus granatensis*) در اسپانیا (۱۷/۲٪) (Segovia و همکاران، ۲۰۱۴)، خرگوش‌های پرورشی کشتارشده در لهستان (۷۲٪) فقط گونهٔ *موسگوویا پکتیناتا* (Szkuciket و همکاران، ۲۰۱۴)، درصورتی‌که در خرگوش وحشی *اوریکتولاگوس کانیکولوس* در انگلستان (Allan و همکاران، ۱۹۹۹)، اسکاتلند (Boag و همکاران، ۲۰۰۱)، اسپانیا (Foronda و همکاران، ۲۰۰۳a،b) و ایرلند جنوبی (Butler، ۱۹۹۴) فقط گونهٔ *موسگوویا کتنوئیدس* گزارش شده است. در مطالعهٔ حاضر میزان آلودگی در ۴۵ نمونهٔ دستگاه گوارش خرگوش ۱۷/۸٪ بود. با توجه به جزئیات ریخت‌شناسی توصیف شده برای *موسگوویا پکتیناتا* (Haukisalmi و همکاران، ۲۰۱۰) و مطابقت برخی ویژگی‌های مورفولوژی مشاهده

شده در نتایج بررسی‌های میکروسکوپ نوری و الکترونی ازجمله اسکولکس کوچک، عرض بسیار زیاد بندها نسبت به طول آن‌ها، وجود دو منفذ تناسلی در هر بند که حاکی از وجود یک جفت اندام تناسلی ماده در هر بند می‌باشد، تخم‌های مثلثی یا هرمی شکل، می‌توان ثابت نمود که حداقل به لحاظ بررسی اولیه با معیارهای میکروسکوپ نوری و الکترونی، سستودهای آلوده کنندهٔ خرگوش‌های مطالعه شده گونهٔ *موسگوویا پکتینا* می‌باشد. در بررسی روابط سیستماتیک و موقعیت فیلوژنی سستود موسگوویا و جنس‌های مربوطه، براساس توالی‌های ژن‌های 28S rRNA و NADH dehydrogenase subunit 1 (Nad1)، وجود دو گونهٔ مجزا و مستقل *موسگوویا پکتیناتا* و *موسگوویا کتنوئیدس* در خرگوش‌ها به‌اثبات رسیده است (Haukisalmi و همکاران، ۲۰۱۰). علی‌رغم دور بودن زیستگاه‌های جغرافیایی جمعیت‌های میزبان، *موسگوویا پکتیناتا* (نمونه‌های انگلستان، فنلاند و سیبری شرقی) و *موسگوویا کتنوئیدس* (نمونه‌های فنلاند و جزایر قناری) انشعاب داخل گونه‌ای خیلی محدودی را نشان دادند. آنالیز داده‌های 28S rRNA نشان داد که *موسگوویا پکتینات* و *موسگوویا کتنوئیدس* ازجمله گونه‌های پایه‌ای در جمعیت سستودهای *آنوپلوسفالینه* هستند، ولی دو گونهٔ موسگوویا به‌وضوح غیرمونوفیل بودند و گونهٔ خواهر *موسگوویا پکتیناتا*، گونهٔ *شیزورکیس کابالەروئی* (*Scizorchis caballeroi*) بود. هم‌چنین آنالیز دو سری از داده‌های توالی NAD1 به‌طور خیلی واضح وضعیت گونهٔ خواهر *موسگوویا پکتیناتا* و *شیزورکیس کابالەروئی*، و مستقل و غیرمونوفیلی بودن دو گونهٔ موسگوویا را تأیید کردند. همین‌طور، ارتباط گروه خواهری قوی بین *موسگوویا پکتیناتا* و *شیزورکیس کابالەروئی* با آنالیز داده‌های توالی ITS1 rRNA در یک مطالعهٔ مشابه قبلی (Wickstrom و همکاران، ۲۰۰۵) تأیید شده است. بنابراین، مطالعات جداگانه در ارتباط با فیلوژنی، به‌طور خیلی واضح نشان می‌دهند که موسگوویا یک گروه غیرمونوفیل است و این یافته‌ها قویاً معتبر بودن وجود جنس *نئوکتنوتنیا* (*Neoctenotaenia*) را که توسط Tenora (۱۹۷۶) بنام *سیتوتنیا کتنوئیدس* مطرح شده بود و بعداً توسط Beveridge (۱۹۷۸) با موسگوویا مترادف شد، تأیید می‌کنند.

در مطالعهٔ حاضر، در بررسی رابطهٔ خویشاوندی بر پایهٔ توالی ژنی 18S rRNA، علاوه بر این‌که توالی جدید به‌دست آمده با توالی‌های دو ایزولهٔ ۸۱۴ (AY752650.1) و N4 (AY752648.1) *موسگوویا پکتیناتا* در یک شاخه و داخل یک گروه قرار گرفتند، ایزولهٔ جدا شده از خرگوش‌های وحشی ایران به‌لحاظ خویشاوندی قرابت خیلی بالایی را با ایزولهٔ *موسگوویا پکتیناتای* جدا شده از خرگوش‌های انگلستان (AY752648.1) در مقایسه با ایزولهٔ فنلاند (AY752650.1) نشان داد. از طرفی مطابق با مطالعات قبلی (Wickstrom و همکاران، ۲۰۰۵؛ Haukisalmi و همکاران، ۲۰۱۰)، در مطالعهٔ حاضر نیز گونهٔ خواهر *موسگوویا پکتیناتا*، یک گونهٔ *شیزورکیس* (AY752663.1) بود. از پیوستگی فیلوژنی بین *موسگوویا پکتیناتا* و *شیزورکیس کابالەروئی* استنباط می‌شود که انشعاب آن‌ها با تغییر در تعداد اندام تناسلی در هر بند (در *موسگوویا* زوج و در *شیزورکیس* منفرد) همراه بوده است. نشان داده شده است که سستودهای *آنوپلوسفالینه* با دو اندام تناسلی از سستودهای مربوطه با یک اندام تناسلی به‌وجود آمده‌اند. ارتباطات پایه‌ای آنوپلوسفالینه‌های پستانداران تا حدودی حل نشده است ولی در آنالیز داده‌های توالی 28S rRNA، *موسگوویا پکتیناتا* و *نئوکتنوتنیا کتنوئیدس* متعلق به دودمان‌های پایه‌ای هستند. بنابراین استنباط می‌شود که *شیزورکیس* با یک اندام تناسلی منفرد از جد شبه *موسگوویا* با دو اندام تناسلی، مغایر با فرض کلی، به‌وجود آمده است (Baer، ۱۹۵۵؛ Beveridge، ۱۹۹۴).

در بررسی فیلوژنی سستودهای سیکلوفیلیدهآ با استفاده از توالی 12S rRNA میتوکندریایی، *موسگوویا پکتیناتا* در گروه خواهری *مونیزیا اکسپانزا* مشخص شده است (von Nickisch-Rosenegk و همکاران، ۱۹۹۹). در نتایج میکروسکوپ الکترونی و نوری مطالعهٔ حاضر نیز تا حدودی مشاهده شد که شکل تخم و وضعیت بندها و منافذ تناسلی *موسگوویا پکتینا* با گونهٔ *مونیزیا اکسپانزا* شباهت دارد، ولی این نتایج برای تأیید نهایی نیاز به بررسی‌های بیش‌تری دارد.

سستودهای جدا شده از خرگوش‌های وحشی شمال‌غرب ایران صرفاً گونهٔ *موسگوویا پکتیناتا* بودند و این یافتهٔ مبتنی بر آنالیز مولکولی، از طریق تعیین توالی محصولات PCR مربوط به سستود هم تأیید شد. تاکنون فقط دو ایزوله از این گونه از خرگوش‌های وحشی فنلاند و انگلستان گزارش شده‌اند و در سایر نقاط دنیا، به‌ویژه کشورهای همسایهٔ ایران، اطلاعات راجع به این سستود وجود نداشت تا مطالعهٔ حاضر به‌طور اساسی با آن‌ها مقایسه و مورد بحث واقع شود. تفاوت داخل گونه‌ای سه ایزوله قابل توجه بود، بنابراین، بررسی مولکولی و تعیین وضعیت فیلوژنی این گونهٔ سستودی در خیلی از کشورها، به‌ویژه با استفاده از سایر جایگاه‌های ژنی، ضروری است.

## تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح به شمارهٔ ۴۳/۱۰۱۹۴/د می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه تبریز و نیز از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به‌خاطر مساعدت در تأمین اعتبار مالی و امکانات مورد نیاز در به ثمر رسیدن این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

# منابع

۱. **بهداروند، ن.؛ رضایی، ح.؛ ایگدری، س.؛ قنبری، ف.؛ نصرتی، م. و شهریاری، ب.، ۱۳۹۶.** بررسی مقدماتی دوشکلی جنسی جمجمه خرگوش غربی (*Lepus europaeus*) در ایران. فصلنامهٔ محیط زیست جانوری. سال ۹، شمارهٔ ۲، صفحات ۳۷ تا ۴۲.

2. **Allan, J.C.; Craig, P.S.; Sherington, M.T.; Rogan, M.T.; Storey, D.M.; Heath, S. and Iball, K., 1999.** Helminthparasites of the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* near Malham Tarn, Yorkshire, UK. J Helminthol. Vol. 73, pp: 289-294.
3. **Baer, J.G., 1927.** Monographie des cestodes de la famille des Anoplocephalidae. Bulletin Biologique de la France et de la Belgique (Supplement). Vol. 10, pp: 1-241.
4. **Baer, J.G., 1955.** Incidence de la specificite´ parasitaire sur la taxonomie. Problemes d'evolution chez les cestodes cyclophyllidiens. Bulletin de la Societe´ Zoologique de France. Vol. 30, pp: 275-287.
5. **Ball, S.; Kelly, T.C. and Butler, F., 2020.** Endoparasites of the endemic Irish hare *Lepus timidus hibernicus*. Wildlife Biol. wlb.00717. doi: 10.2981/wlb.00717.
6. **Beveridge, I., 1978.** A taxonomic revision of the genera Cittotaenia Riehm, 1881, *Ctenotaenia*, *Railliet*, 1893, *Mosgovoyia Spasskii*, 1951 and *Pseudocittotaenia Tenora*, 1976. (Cestoda: Anoplocephalidae). Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle, Serie A, Zoologie. Vol. 107, pp: 1-64.
7. **Beveridge, I., 1994.** Family Anoplocephalidae Cholodkovsky, 1902. In Keys to the cestode parasites of vertebrates. Edited by LF Khalil, A Jones and RA Bray. CAB International, Cambridge, UK. 751 p.
8. **Boag, B.; Lello, J.; Fenton, A.; Tompkins, D.M. and Hudson, P.J., 2001.** Patterns of parasite aggregation in the wild european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Int J Parasitol. Vol. 31, pp: 1421-1428.
9. **Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A. and Wilson, A.C., 1982.** Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. J Mol Evol. Vol. 18, pp: 225-239.
10. **Butler, F.T., 1994.** Arthropod and helminth parasites from rabbits *Oryctolagus cuniculus* in south-west Ireland. The Irish Naturalists' J. Vol. 24, No. 10, pp: 392-395.
11. **Campos, P.F. and Gilbert, T.M., 2012.** DNA extraction from formalin-fixed material. Methods Mol Biol. Vol. 840, pp: 81-85.
12. **Casanova, J.C.; Feliu, C.; Molina, X.; Villa, T.; Santalla, F. and Laplana, N., 2000.** Helminths in a contact zone of *Lepus europaeus* and *L. granatensis* (Leporidae) in Iberian Peninsula. Acta Parasitologica. Vol. 45, pp: 176.
13. **Cordero, D.E.L.; Campillo, M.; Castanon, L. and Reguera, A., 1994.** Indice-Catalogo de Zooparasitos Ibericos, 2nd ed. Secretariado de Publicaciones, Leon, Spain. 650 p.
14. **Eslami, A., 2009.** Veterinary Helminthology (Cestoda). Vol II, 2 edn., Tehran University Press, Tehran, Iran. 328 p.
15. **Eslami, A. and Ranjbar-Bahadori, S., 2004.** Laboratory methods to diagnose helminthic diseases: Ruminants, carnivores, equines, birds, laboratory animals, pig and human. 1st edn., Noorbakhsh press, Tehran, Iran. 304 p.
16. **Eslami, A.; Changizy, E. and Moghadam, M., 2000.** Prevalence of helminth infections in the cape hare (*Lepus capensis*) in Iran. Vet Res Commun. Vol. 24, pp: 455-458.
17. **Foronda, P.; Del Castillo, A.; Abreu, N.; Figueruelo, E.; Piñero, J. and Casanova, J.C., 2003b.** Parasitichelminths of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in different bioclimatic zones in Tenerife, Canary Islands. J Helminthol. Vol. 77, pp: 305-309.
18. **Foronda, P.; Valladares, B.; Lorenzo-Morales, J.; Ribas, A.; Feliu, C. and Casanova, J.C., 2003a.** Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Macaronesia. J Parasitol. Vol. 89, No. 5, pp: 952-957.
19. **Haukisalmi, V.; Hardman, L.M.; Foronda, P.; Feliu, C. and Henttonen, H., 2010.** Systematic relationship of Mosgovoyia Spasskii, 1951 (Cestoda: Anoplocephalidae) and related genera inferred from mitochondrial and nuclear sequence data. Syst Parasitol. Vol. 77, pp: 71-79.
20. **Hoberg, E.P.; Jones, A. and Bray, R.A., 1999.** Phylogenetic analysis among the families of the Cyclophyllidea (Eucestoda) based on comparative morphology, with new hypotheses for co-evolution in vertebrates. Syst Parasitol. Vol. 42, pp: 51-73.
21. **Littlewood, D.T.J. and Bray, R.A., 2001.** Interrelationships of Platyhelminthes. Taylor and Francis, London. 353 p.
22. **Marhoon, I.A.; Mattar, K.T. and Mohammad, F.I., 2018.** Parasitic infection in wild rabbits *Oryctolagus cuniculus*. Eurasian J Anal Chem. Vol. 13, No. 5, em55.
23. **Mariaux, J., 1996.** Cestode systematics: any progress? Int J Parasitol. Vol. 26, pp: 231-243.
24. **Schmidt, G.D., 1986.** CRC handbook of tapeworm identification. Boca Raton, CRC Press Inc. 675 p.
25. **Rewatkar, S.G; Deshmukh, S.S.; Prem Kumar, G.; Maske, D.K. and Bhangale, G.N., 2013.** Occurrence of gastrointestinal helminths in rabbits with special reference to importance of Giardia spp. as parasitic zoonoses. Sci Tech Arts Res J. Vol. 2, No. 3, pp: 142-143.
26. **Segovia, J.M.; Vila, T.; Vargas, J.M.; Fuentes, M.V. and Feliu, C., 2014.** The helminth community of the Iberian hare, *Lepus granatensis* (Lagomorpha: Leporidae), in the province of Granada, Spain. Helminthologia. Vol. 51, No. 4, pp: 281- 287.
27. **Spasskii, A.A., 1951.** Anoplocephalate tapeworms of domestic and wild animals. In Essentials of cestodology. Edited by KI Skrjabin, Vol. 1. Moscow: The Academy of Sciences of the USSR. Translated from Russian for the U.S. National Science Foundation and Department of Agriculture by the Israel Program for Scientific Translations, 1961. Washington: Office of Technical Services, U.S. Department of Commerce. 783 p.
28. **Szkuciket, K.; Pyz-Łukasik, R.; Szczepaniak, K.O. and Paszkiewicz, W., 2014.** Occurrence of gastrointestinal parasites in slaughter rabbits. Parasitol Res. Vol. 113, pp: 59-64.
29. **Tanjung, M. and Rangkuti, P., 2019.** Species and prevalence of rabbit gastrointestinal parasites in Berastagi Farm Karo District, North Sumatra, Indonesia. In proceedings of the International Conference on Natural Resources and Technology (ICONART 2019). pp: 193-198.
30. **Tavassoli, M. and Bakht, M., 2014.** Occurrence of *Linguatula Serrata* in European hare in Iran. J Zoonoses, Vol. 1, No. 1 pp: 64-67.
31. **Tenora, F., 1976.** Tapeworms of the family Anoplocephalidae Cholodkowsky, 1902. Evolutionary implications. Acta Scientiarum Naturalium Brno. Vol. 10, pp: 1-37.
32. **Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. and Higgins, D.G., 1997.** The CLUSTALX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. Vol. 25, pp: 4876-4882.
33. **Von Nickisch-Rosenegk, M.; Lucius, R. and Loos-Frank, B., 1999.** Contributions to the phylogeny of the Cyclophyllidea (Cestoda) inferred from Mitochondrial 12S rDNA. J Mol Evol. Vol. 48, pp: 586-596.
34. **Wickstrom, L.M.; Haukisalmi, V.; Varis, S.; Hantula, J. and Henttonen, H., 2005.** Molecular phylogeny and systematics of anoplocephaline cestodes in rodents and lagomorphs. Syst Parasitol. Vol. 62, pp: 83-99.
35. **Yamaguti, S., 1959.** Systema helminthum. The cestodes of vertebrates, Vol. II. Interscience Publishers Inc. New York, USA. 860 p.