

## اولین گزارش و شناسایی مولکولی گونه *Rhadinorhynchus sp*

### (*Acanthocephala*)، بر اساس توالی ژن *SSrDNA*

گیلان عطاران فریمان<sup>۱\*</sup>، الهام نظری جعفرلو<sup>۲</sup>

#### چکیده

اکانتوسفال‌ها گروهی از انگل‌های گوارشی مهره‌داران و بندپایان هستند که انتشار جهانی دارند. این انگل‌ها در مهره دارانی چون ماهی باعث ایجاد بیماری می‌شوند. بررسی این انگل‌ها برای شناسایی و پیشگیری از آلودگی حایز اهمیت می‌باشد. از روش‌های شناسایی و تاکسونومی موجودات، استفاده از روش شناسایی مولکولی در کنار شناسایی ریخت شناسی است. در این تحقیق کرم‌های انگلی دستگاه گوارش ۵۴ ماهی تون گیدر *Thunnus albacares* در سال ۱۳۹۱ بررسی شد. آکانتوسفال‌ها که از گونه‌های انگلی غالب در این ماهیان بودند، از دستگاه گوارش جدا شدند و DNA گونه‌های اکانتوسفال بر اساس روش CTAB استخراج گردید و توالی نوکلئوتیدها در بخشی از ناحیه SSU-rRNA مطالعه شد. توالی گونه ایرانی با توالی ۲۱ گونه متعلق به شاخه اکانتوسفال موجود در بانک ژن مقایسه شد. روابط فیلوژنتیکی استخراج شده از طریق آنالیز Maximum Likelihood در مطالعه حاضر بیانگر مونوفایلی در میان رده‌های شاخه اکانتوسفال است و رابطه بسیار نزدیک (sister group) گونه ایرانی با *Rhadinorhynchus sp* با ۹۹٪ بوت استرپ (boot strap) حمایت می‌شود. در این مطالعه گونه ایرانی در راسته Echinorinchida واقع شد. نتایج بررسی ریخت شناسی گونه مورد مطالعه با نتایج مولکولی مطابقت نشان داد. این اولین گزارش گونه انگلی اکانتوسفالی ماهیان تن دریای عمان است.

واژگان کلیدی: آکانتوسفال؛ فیلوژنی؛ انگل گوارشی؛ ماهی تون؛ *SSU\_rRNA*

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۱۶

#### مقدمه

نیازهای تغذیه‌ای انسان به خصوص نیاز به پروتئین حیوانی باعث شده است که انسان از دیرباز به تکثیر و پرورش آنها همت گمارد، در این میان آبیانی مانند ماهی و میگو از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. با وجود کنترل بهداشتی و اقدامات پیشگیری کننده از وقوع آلودگی، همواره امکان بروز آلودگی مختلف وجود دارد. آلودگی انگلی ماهیان در این بین اهمیت ویژه‌ای دارد، چرا که باعث کاهش رشد، عقیم شدن ماهی،

تغییر رنگ و شکل بدن آن می‌شود. همچنین برخی انگل‌های ماهی قادرند در صورت مصرف ماهی بصورت خام یا نیمه پخت به انسان منتقل شده و ایجاد بیماری در انسان کنند (۳). انگل‌های گوارشی، از انگل‌های درونی می‌باشند که ماهیان را آلوده می‌کنند. نماتودها و آکانتوسفال‌ها انواعی از انگل‌های گوارشی هستند که به ماهیان آسیب می‌رسانند (۲). آکانتوسفال‌ها (*Acanthocephala*) یا کرم‌های خاربر سر حداقل ۱۰۰۰ گونه دارند. این انگل‌های داخلی برای تکمیل چرخه زندگی‌شان از بندپایان و مهره‌داران بهره می‌برند (۱۸). مهره داران میزبان‌های نهایی آنها هستند گرچه یافته‌های اخیر اشاره به این دارد که گونه‌های انگلی ماهیان دریایی در اسکویدها (squid) به بلوغ می‌رسند (۱۲). این انگل سبب تخریب پرزهای روده است (۲). در طبقه‌بندی سنتی این شاخه سه رده دارد که این رده‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی مانند وجود کیسه‌های لیگامنتی در ماده‌ها، تعداد و نوع غدد سیمانی در جنس نر، تعداد و اندازه قلاب موجود در خرطوم و نوع میزبان قابل تشخیص می‌باشند (۸). یکی از رده‌ها پالا اکانتوسفال (*Palaeacanthocephala*) می‌باشد. پالا اکانتوسفال‌ها دارای دو راسته *Echinorhynchida* (Southwell, Macfie, 1925) و *Polymorphida* (Petrochenko, 1956) است که به ترتیب دارای ۱۰ و ۳ خانواده می‌باشند. این خانواده‌ها با ترکیبی از ویژگی‌هایی مانند پوشش خرطوم، شکل خرطوم، تعداد و شکل غدد سیمانی، وجود خارهای بدنی و ترتیب قرار گرفتن آنها، شکل تخم و نوع میزبان‌شان شناخته می‌شوند (۶). تنوع پالا اکانتوسفال‌ها بخوبی در مطالعات

\*۱- عضو هیئت علمی و عضو گروه پژوهشی علوم زیستی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران. (g.attaran@cmu.ac.ir)

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد جانوران دریایی، دانشکده علوم دریایی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

حاضر به منظور شناسایی انگل‌های گوارشی ماهیان تون در ایران که از جمله ماهیان بسیار مهم تجاری است به بررسی فیلوژنتیکی گونه انگلی آکانتوسفالی متعلق به جنس *Rhadinorhynchus* با استفاده از توالی 18SrRNA پرداخته شده است.

## مواد و روش کار

### جمع‌آوری نمونه‌ها

تعداد ۵۴ نمونه ماهی تون گیر در سال ۱۳۹۱ از اداره دامپزشکی و بازار ماهی بندر چابهار تهیه گردید و به منظور جداسازی انگل غالب دستگاه گوارش، بررسی شدند. نمونه‌های انگلی غالب، آکانتوسفال بودن که از دستگاه گوارش ماهیان تون گیر ایران جدا شد. کرم‌ها پس از جداسازی در سرم فیزیولوژی شسته شدند و برخی در اتانول ۹۶٪ و تعدادی در دمای ۲۰- و ۸۰- فریز شد.

### استخراج DNA

DNA ژنومی انگل با تغییراتی در روش CTAB توضیح داده شده در مطالعه Thlleson و همکاران استخراج شد (۱۹). پس از له نمودن نمونه در ویال ۱/۵ سی سی، ۵۰۰ میکرولیتر از CTAB buffer (۲٪ CTAB، ۱/۴M NaCl، ۱ mM EDTA، ۲۰ mM TRIS-HCl با pH=۸) و ۳ میکرولیتر پروتین کیناز (۲۰mg/ml) به آن افزوده شد. به DNA استخراج شده، بسته به اندازه پلت ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز افزوده شد و در دمای ۲۰- نگهداری گردید. جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده، الکتروفورز انجام شد. از بافر TBE و ژل آگارز ۱/۵٪ در الکتروفورز نمونه استفاده گردید و برای رنگ آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید استفاده شد. کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر eppendorf مدل RS۲۳۲C و کیفیت باندها با استفاده از دستگاه ژل داگ Viber Lourmat مدل VX۲ ارزیابی گردید.

فیلوژنتیکی آزموده نشده است، گرچه نمونه‌برداری تاکسونومیکی گسترده‌تری جهت دانستن الگوهای تکاملی این گروه لازم است (۹). ازدیگر روش‌های رده‌بندی روش مولکولی است. بررسی‌های مولکولی در طبقه‌بندی گونه‌های جانوری، اصلاح نژاد و حفظ گونه‌های زیستی حائز اهمیت هستند. پیشرفت تکنیک‌های مولکولی امکانات جدیدی برای طبقه‌بندی فراهم ساخت و باعث شد اکثر گونه‌ها که از نظر مورفولوژیکی خیلی متفاوت نیستند، طبقه‌بندی و شناسایی شوند (۱۰). در بسیاری تحقیقات زیستی ابزار مولکولی برای ارائه مباحث فیلوژنتیکی و شناسایی تاکسون‌ها استفاده می‌شوند. شاخه آکانتوسفال‌ها در تقسیم‌بندی سستی دارای سه رده *Archiacanthocephala* (Meyer, 1931) *Eoacanthocephala* و *Palaeacanthocephala* (Meyer, 1931)، *Van Cleve*, 1936) می‌باشند (۶). در طبقه‌بندی سستی آکانتوسفال‌ها سه رده داشتند که بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی *Eoacanthocephala*، *Paleacanthocephala* و *Archiacanthocephala* در شاخه آکانتوسفال حضور داشتند و *Polyacanthocephala* اخیراً در این شاخه قرار گرفته است (۸). گرچه رده جدید *Polyacanthocephala* با یک راسته، یک خانواده، یک جنس و ۴ گونه اخیراً پیشنهاد شده است (۷). بر اساس شناسایی‌های مورفولوژیکی در برخی ماهیان خزر و خلیج فارس، گونه‌های مختلفی از آکانتوسفال‌ها شناسایی شده‌اند که اکثر گونه‌ها از رده *Palaeacanthocephala* هستند، اما آکانتوسفال‌های ماهی تون بررسی نشده است و ماهیان دریای عمان کمتر مورد مطالعه بوده‌اند. داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی رابطه بسیار نزدیکی میان روتیفر (*rotifer*) و آکانتوسفال نشان می‌دهد (۲۰). بیشتر بررسی‌های فیلوژنتیکی توالی ۱۸S نشان داده است که آکانتوسفال‌ها یک گروه مونوفایلیتیک می‌باشد (۸). در مطالعه‌ای، آکانتوسفال‌ها، گروهی مونوفایلیتیک (*monophyletic*) (دارای یک جد مشترک) و مستقل می‌باشند که دارای سه زیر گروه است (۶). در مطالعه

آنالیز فیلوژنی استفاده شده به همراه شماره ثبت آنها در بانک ژنی ذکر شده است.

جدول ۱- اسامی گونه‌ها و شماره ثبت آنها در بانک ژنی که در آنالیز مولکولی این تحقیق استفاده شده است

نام گونه	GenBank No
<i>Rhadinorhynchus sp</i>	مطالعه حاضر
<i>Rhadinorhynchus sp</i>	AY۰۶۲۴۳۳
<i>Pararhadinorhynchus sp</i>	HM۵۴۵۹۰۳
<i>Transvena annulospinosa</i>	AY۸۳۰۱۵۳
<i>Tenuiproboscis sp</i>	JF۶۹۴۲۷۵
<i>Echinorhynchus gadi</i>	AY۲۱۸۱۲۳
<i>Pomphorhynchus laevis</i>	AY۴۲۳۳۴۶
<i>Echinorhynchus truttae</i>	AY۸۳۰۱۵۶
<i>Pseudocorynosoma anatarium</i>	EU۲۶۷۸۰۱
<i>Pseudocorynosoma constrictum</i>	EU۲۶۷۸۰۰
<i>Bolbosoma vasculosum</i>	JX۰۱۴۲۲۵
<i>Andracantha grvida</i>	EU۲۶۷۸۰۲
<i>Polymorphus minutus</i>	EU۲۶۷۸۰۶
<i>Profilicollis botulus</i>	EU۲۶۷۸۰۵
<i>Macracanthorhynchus ingens</i>	AF۰۰۱۸۴۴
<i>Floridosentis mugilis</i>	AF۰۶۴۸۱۱
<i>Oligacanthorhynchus tortuosa</i>	AF۰۶۴۸۱۷
<i>Plagiorhynchus cylindraceus</i>	AF۰۰۱۸۳۹
<i>Ibirhynchus dimorpha</i>	GQ۹۸۱۴۳۶
<i>Neoechinorhynchus sp</i>	HM۵۴۵۸۹۸
<i>Acanthocephalus dirus</i>	AY۸۳۰۱۵۱
<i>Chaetonotus sp</i>	JQ۷۹۸۵۹۳

## نتایج

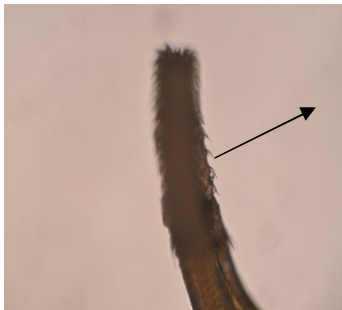
بررسی مورفولوژی گونه نشان داد که گونه‌های انگلی جدا شده بیشترین همولوژی را به گونه *Rhadinorhynchus sp* دارد. خرطوم و خارهای آن در نمونه‌ها بوضوح دیده می‌شد (نگاره ۱). در مطالعه حاضر علاوه بر ماهی گیدر دستگاه گوارش ماهیان دیگری مانند کفشک ماهی، شوریده و زمین کن نیز بررسی شد که در هیچ موردی این انگل مشاهده نشد و در

## PCR

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) توالی آغازگر و مواد مورد نیاز PCR برای انگل‌های آکانتوسفالی تهیه شد. در این واکنش از پرایمرهای ۱۸ RSb و ۱۸ FSa استفاده شد (۱۶). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از ۱۵ نانوگرم از DNA استخراجی، ۱۰x PCR Buffer، ۲ Mgcl<sub>2</sub>، dNTP، هریک از پرایمرهای Forward و Reverse و Taq DNA polymerase انجام گرفت. سپس لوله‌ای با حجم ۵۰ میکرولیتری، برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در دستگاه ترمومیکسر ependorf مدل ۵۳۳۱ قرار گرفت. در سیکل حرارتی داده شده به دستگاه PCR اپندرف مدل ۵۳۳۱ در ابتدا به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، در این دما مولکول دو رشته‌ای DNA بصورت تک رشته‌ای در می‌آید، سپس در یک سیکل ۳۸ تایی که شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت دناتوره شدن، دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال پرایمر، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه جهت بسط نهایی، و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و سیکل حرارتی پایان یافت. کیفیت باندهای تکثیر یافته به کمک الکتروفورس روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی گردید و محصول PCR پس از Clean up تعیین توالی گردید. ویرایش توالی‌ها با استفاده از برنامه Bioedit Ver۷/۰ انجام شد (۱۳). توالی بدست آمده از *Rhadinorhynchus sp* با توالی‌های ژنی 18S rRNA، ۲۱ گروه آکانتوسفالی با استفاده از برنامه clastal x ۲ همتراز شد (۱۴) و آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه MEGA Ver ۵/۰ انجام شد (۱۵). آنالیز مولکولی و ترسیم درخت به روش‌های مختلفی انجام شد که توپوگرافی‌های مشابه داشتند و فقط درختی که با آنالیز Maximum Likelihood (ML) انجام شد در این مقاله آورده شده است. در جدول (۱) اسامی گونه‌هایی که در



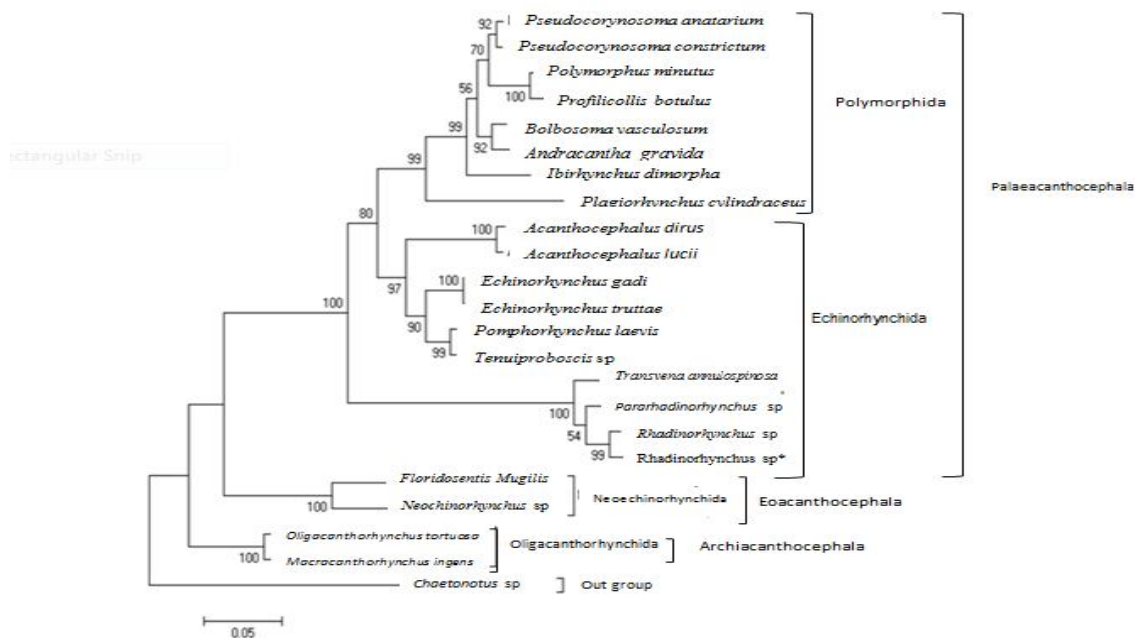
الف



ب

نگاره ۱- الف: نمونه ایرانی انگل‌های اکتوسفالی جدا شده از دستگاه گوارش ماهی گیدر تصویر گرفته شده با لوپ ب: خرطوم و خارهای آن، میکروسکوپ نوری بزرگ نمایی  $\times 20$

ماهی گیدر گونه غالب انگل‌های گوارشی آکانتوسفال بود. جهت تایید شناسایی و بررسی مولکولی گونه ایرانی با ۲۱ گونه مشابه از بانک ژنی در منطقه مورد نظر بررسی شد و درخت فیلوژنی با آنالیز ML رسم گردید. بررسی مولکولی حاضر نشان داد که گونه ایرانی شباهت زیادی به گونه *Rhadinorhynchus* sp دارد که در راسته *Echinorhynchida* واقع می‌شود و با نام (۱ CHIAC) در بانک ژنی ثبت خواهد شد. آنالیز نشان داد که گونه‌ها در ۴ کلاد (Clade) قرار می‌گیرند این ۴ کلاد معرف راسته‌های سه رده از آکانتوسفال‌ها هستند که گونه ایرانی در کلاد *Echinorhynchida* که یکی از دو راسته *Palaeacanthocephala* می‌باشد، قرار گرفت (نگاره ۲). این کلاد با ۱۰۰٪ Bootstrap حمایت می‌شود و *Rhadinorhynchus* sp ایران با ۹۹٪ حمایت Bootstrap، گونه خواهری *Rhadinorhynchus* sp می‌باشد و با *Transvena annulospinosa* و *Pararhadinorhynchus* sp با ۱۰۰٪ Bootstrap مونوفایلی است.



نگاره ۲- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژنی قسمتی از ژن SSU با استفاده از آنالیز ML. اعداد بوت استرپ با 1000 replication را نشان می‌دهد. گونه *Chaetonotus* sp بعنوان outgroup در نظر گرفته شده است. گونه ایرانی با علامت \* مشخص شده است. در مطالعه حاضر بوت استرپ‌های بالای ۵۰٪ در شکل نشان شده است.

## بحث

گرچه مطالعات انجام شده در مورد انگل‌های گوارشی تون در ایران بسیار کم می‌باشد اما مطالعات بسیاری در مورد انگل‌های گوارشی و کرمی شکل ماهیان صورت گرفته است. مطالعه انگل‌های نماتودی *Contracaecum sp* و *Anisakis sp* ماهی تون *Scomberomorus Commerson* در خلیج فارس انجام شده است (۵). در ایران، بررسی‌های آلودگی انگل‌های کرمی شکل داخلی ماهیان مختلف، از لحاظ شدت آلودگی و اثرات پاتولوژیکی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای پس از بررسی ماهی ازون برون شیوع و شدت آلودگی انگل آکانتوسفال‌ی لپتورینکوئیدس پلاگی سفالوس را در فصل بهار بیش از زمستان گزارش نموده‌اند (۱). در مطالعه حاضر اگر چه هدف یافتن میزان شیوع انگل‌ها و شدت آلودگی آنها نبوده است ولی در نمونه‌های مورد بررسی به منظور یافتن انگل غالب، ماهی‌ها در زمستان آلودگی انگلی کمتری نسبت به فصل بهار و تابستان داشتند. انگل *Rhadinorhynchus sp* توسط موبدی تصویر برداری شده اما گزارش داده نشده است. مکان نمونه برداری و نوع ماهی نیز ذکر نگردیده است (۴). گونه‌های مختلفی از آکانتوسفال‌های ماهیان گزارش شده است اما در ایران آکانتوسفال ماهی تون تاکنون گزارش نشده است. شناسایی مورفولوژی و مولکولی مطالعه حاضر گونه *Rhadinorhynchus sp* را در ماهی تون گیدر تایید می‌کند. بررسی‌های فیلوژنتیکی داده‌های حاصل از 18SrRNA نشان داده است که آکانتوسفال‌ها ارتباط نزدیکی با روتیفرها دارند و احتمالاً آکانتوسفال‌ها با دو رده *Bdelloidea* و *Monogononta* نسبت به دیگر رده روتیفرها یعنی *Seisonidea* ارتباط نزدیکتری دارند (۱۷). این رده از روتیفرها همراه با آکانتوسفال‌ها کلادی را تشکیل می‌دهند که *Syndermata* نامیده می‌شود (۱۷ و ۱۲). همچنین آکانتوسفال‌ها با *Bdelloidea* رابطه بسیار نزدیک (*sister group*) دارند (۱۱). *Eurotatoria* که در آن *Bdelloidea* و *Monogononta* در ارتباط بسیار نزدیک با هم قرار می‌گیرند،

اخیراً به عنوان سیستم گروپ (گروه خوهری) آکانتوسفال‌ها قرار گرفته است گرچه پیشتر *sister group* گروهی بود که آکانتوسفال و *Seisonidea* را در بر می‌گرفت (۱۲). روابط میان رده‌های آکانتوسفال‌ها قابل بررسی است. در درخت رسم شده مطالعه حاضر رابطه‌ای را میان رده‌های شاخه آکانتوسفال نشان می‌دهد و *Palaeacanthocephala* رابطه خوهری با *Eoacanthocephala* نشان می‌دهد، ترکیبی از این دو رده کلادی را تشکیل می‌دهد که رابطه خوهری را با *Archiacanthocephala* بیان می‌کند. مونوفایلی آکانتوسفال‌ها در این مطالعه دیده می‌شود. این فرضیه که آکانتوسفال‌ها گروه مستقل و مونوفایلی هستند و شامل سه ساب کلادند (سه زیر گروه) (*subclade*) که هر یک از این ساب کلادها طبق رده‌بندی جدید نماینده یک رده می‌باشد، حمایت شده است (۶). بر اساس مطالعه‌ای که بر پایه آنالیز کامل ژن 18S-rRNA انجام شد، این فرضیه که *Archiacanthocephala* رده پایه در فایلوم آکانتوسفال هستند و گروه خوهری کلادی می‌شوند که متشکل از *Eoacanthocephala* و *Paleacanthocephala* هستند، تایید شد (۸). در مطالعه حاضر نیز *Archiacanthocephala* بصورت رده پایه قرار گرفت. در میان *Palaeacanthocephala* گونه‌های مورد بررسی در مطالعه ما در دو راسته *Echinorhynchida* و *Polymorphida* قرار می‌گیرد و طول این شاخه در تگزای (*taxa*) آکانتوسفال‌ها طویل‌تر از طول شاخه تگزای *Eoacanthocephala* و *Archiacanthocephala* می‌باشد که نشان‌دهنده واگرایی بیشتر در رده *Palaeacanthocephala* می‌باشد. بررسی انجام شده بر اساس 18SrRNA نیز گونه‌ها را در دو راسته ذکر شده بیان نموده و طول شاخه *Palaeacanthocephala* را بیش از دو رده دیگر نشان داده است (۸). گونه ایرانی *Rhadinorhynchus sp* در راسته *Echinorhynchida* واقع شد که یکی از دو راسته *Palaeacanthocephala* می‌باشد. رابطه خوهری گونه ایرانی با گونه *Rhadinorhynchus sp* ثبت شده در ژن بانک در این

- persian gulf, Wold Journal of Fish and Marine Science. 5(3): 310\_314.
- 6- Amin, O.M. (1985): Classification. In: Crompton DWT, Nickol BB (eds) Biology of the acanthocephala. Cambridge University Press, London. p: 27-72.
  - 7- Amin, O.M. (1987): Key to the families and subfamilies of Acanthocephala with the erection of a new class (Polyacanthocephala) and a new order (Polyacanthorhynchida). J. Parasitol. 73: 1216-1219.
  - 8- Garcia\_varela, M. G., Perez\_Ponce Deleio, N. P., Dela Torre, M.P., Cummings, S.S., Sarma Lacleite, J.P. (2000): Phylogenetic relationships of Acanthocephala based on analysis of 18S ribosomal RNA gene sequences. J. Mol. Evol. 50: 532-540.
  - 9- Garcia-Varela, M., Nadler, S.A. (2006): Phylogenetic relationships of palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU ana LSU rDNA gene sequences. J. Parasitol. 91(6): 1401-1409.
  - 10- Godfray, H.C.J. (2002): Challanges for taxonomy\_ the discipline will have to reinvent itself if it is to survive and flourish. Nature. 417: 17-19.
  - 11- Garey, R.J., Schmidt-Rhaesa, A., Near, T.J., Nadler, S.A. (1998): The evolutionary relationships of rotifers and acanthocephalans. Hydrobiologia. 387: 83-91.
  - 12- Herlyn, H., Piskurek, O., Schmitz, J., Ehlers, U., Zischler, H. (2003): The syndermatan phylogeny and the evolution of acanthocephalan endoparasitism as inferred from 18S Rdna. Mol. Phylogenet. Evol. 26: 155-164.
  - 13- Hall, A.T. (1999): BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. ucleic Acid Symposium Series. 41: 95-98.
  - 14- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends. Biochem. Sci. 23: 403-405.
  - 15- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (1994): MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. Comput. Appl. Biosci. 10 (2): 189-91.
- مطالعه با ۹۹٪ بوت استرپ (Bootstrap) حمایت می‌شود و با ۱۰۰٪ حمایت بوت استرپ در خانواده Rhadinorhynchidae واقع می‌شود که واگرایی بیشتری نسبت به دیگر خانواده‌ها در دو راسته ذکر شده نشان می‌دهد. بر اساس آنالیز 18S-rRNA و با آنالیز ML طول شاخه بیشتری برای کلادی شامل دو در خانواده Rhadinorhynchidae قرار دارند - نسبت به سایر کلادها در درخت نشان داده شد (۹). بطور کلی می‌توان نتیجه گرفت بررسی‌های مولکولی نقش مهمی در طبقه‌بندی اکانتوسفال‌ها داشته و می‌توان از آنالیزهای مولکولی جهت تاکسونومی گونه‌ها بهره برد و جایگاه فیلوژنتیکی آنها را مشخص نمود. نتیجه کلی این تحقیق موقعیت فیلوژنتیکی گونه ایرانی را نشان داد و همینطور مشخص گردید که اکانتو سفال‌ها از انگل‌های غالب ماهیان تن دریای عمان می‌باشند.

### فهرست منابع

- ۱- اصغر زاده کافی، ا.، حاجی مرادلو، ع. (۱۳۸۱): بررسی شیوع انگل‌های کرمی دستگاه گوارش ماهی ازون برون Acipenser stellatus صید شده از سواحل جنوب شرقی دریای خزر. دومین همایش ملی منطقه ای ماهیان خاویاری رشت. ۷۴-۷۱.
- ۲- پیغان، ر.، حقوقی راد، ن.، یوسف دزفولی، ع. (۱۳۸۲): بررسی آلودگی ماهی حلوا سفید *Stromateus cinereus* و هامور چرب خلیج فارس *Epinephelus coioides* به انگل‌های کرمی، پژوهش و سازندگی. ۶۲: ۵۵-۴۹
- ۳- پیغان، ر. (۱۳۸۰): انگل‌ها و بیماری انگلی ماهی، چاپ اول، انتشارات نوربخش، تهران، ایران. ۷: ۷۶-۵۳
- ۴- توکل، س.، جلالی جعفری، ب.، حلاجیا، ع. (۱۳۸۷): انگل‌های اکانتوسفال و گونه‌های شناسایی شده در ایران، چاپ اول، انتشارات پرتو واقعه با همکاری انتشارات دانش نگار تهران، ایران. ۴۰-۱۵، ۱۰۷-۷۵.
- 5- Adel, M., Azizi, H.R., Nematollahi, A. (2013): *Scomberomorus commerson*, a new paratenic host of *Contracaecum* sp. and *Anisakis* sp (Nematoda: Anisakidae) from

- 16- Medlin, L.K., Elwood, H.J., Stickel, S., M.L. Song (1988): The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16s-like rRNA-coding regions. *Gene*. 71: 491-499.
- 17- Ruppert, E.E., Fox, R.S. , Barnes, R.D. (2004): *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach*. 7th Edition. Thomson, Brooks/Cole, Belmont. P: 1-963.
- 18- Schmidt, G. D. (1973): Resurrection of *Southwellina* Witenberg, 1932, with a description of *Southwellina dimorpha* sp. n., a key to genera in Polymorphida (Acanthocephala). *J. Parasitol.* 59: 299.
- 19- Thllesson, M. (2000): Increasing fidelity in parsimony analysis of dorid nudibranches by differential weighting, or a total of two genes. *Mol .Phylogenet. Evol.* 16(2): 161-172.
- 20- Wallace, R.L., Claudia, R., Giulio, M. (1996): A cladistic analysis of pseudocoelomates (aschelminth) morphology. *Invertebr Biol.* 2: 104–112.

Archive of SID