نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۴، صفحات ۷۳- ۶۳

اولین شناسایی مولکولی انگل خونی جنس *Dactylosoma* Labbe ،۱۸۹۴ در وزغ تالشی (*Bufo eichwaldi*) از شمال ایران

فاطمه عبدالهی[۱] و حسین جوان بخت[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسوول: تخصص و مدرک تحصیلی: دکتری بیوسیستماتیک جانوری، تخصص انگل های خونی
آدرس: گیلان- رشت- دانشگاه گیلان- خ نامجو- دانشکده علوم پایه- گروه زیست شناسی تلفن تماس: ۰۹۱۱۲۴۱۴۰۹۳ – فکس: ۰۱۳۳۳۳۳۳۶۴۷
ایمیل: h.javanbakht@guilan.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۶ فروردین ۱۴۰۴، بازنگری: ۱۷ آبان ۱۴۰۴، پذیرش نهایی: ۱۵ آذر ۱۴۰۴

10.22034/nfvm.2025.515051.1278

چکیده

انگل‌های کوکسیدیایی (Apicomplexa: coccidian) از مهمترین انگل‌های خونی هستند که از خزندگان و دوزیستان گزارش شده‌اند. داکتیلوزوماتیده یکی از چهار خانواده‌ای است که متعلق به کوکسیدیاهای آدلورینید و شامل جنس‌های *Babesiosoma* Jakowska and Nigrelli, ۱۹۵۶ و *Dactylosoma* Labbe ،۱۸۹۴ می باشد. این پروتوزوئرهای خونی در خون محیطی مهره‌داران پست‌تر و اکثراً از دوزیستان گزارش شده‌است. وزغ تالشی (*Bufo eichwaldi*) یک دوزیست اندمیک بزرگ است که در جنگل‌های هیرکانی در شمال ایران و جنوب شرق آذربایجان پراکنش دارد. در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار شیوع و شناسایی ژنتیکی انگلهای خونی از جنس *Dactylosoma* در ۷۵ فرد از *B. eichwaldi* به عنوان یک گونه‌ی با وضعیت حفاظتی آسیب پذیر از شمال ایران مورد بررسی قرارگرفت. آلودگی به انگل‌های خونی در ۲۶/۶۶ درصد از نمونه‌ها مشاهده گردید. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از ژن 18s rRNA نشان‌داد که ۱۰۰ درصد مشابهت با *Dactylosoma kermiti* و *D. ranarum* وجود دارد. آنالیز فیلوژنتیکی نشان‌داد که *داکتیلوزوما* در مطالعه‌ی حاضر یک گروه مونوفایلتیک با گونه‌های *داکتیلوزوما* تشکیل داده و به عنوان گونه مشابه با *Dactylosoma kermiti* از وزغ *Sclerophrys gutturalis* و همچنین به عنوان کلاد خواهری با *D. ranarum* ، *Dactylosoma* sp و *Babesiosoma stableri* قرارگرفت (Support>٪۸۰). این اولین تعیین خصوصیت مولکولی از گونه *Dactylosoma* در وزغ‌های ایرانی است.

واژگان کلیدی: *آپی‌کمپلکسا، دوزیستان ، فیلوژنتیک ، هموگریگارین، هیرکانی*

مقدمه

دورزیستان بی‌دم به‌دلیل شکار موجودات دیگر از جمله بندپایان، نرم‌تنان، کرم‌های حلقوی و مهره‌داران کوچک و همچنین به عنوان منبع غذایی اصلی گروه‌های زیادی از جانوران، اهمیت بسزایی در کنترل آفات و همچنین پایداری زنجیره‌ی اکولوژیک یک منطقه دارند (۱) . اخیراً ۷۱۶۶ گونه از دوزیستان بی‌دم در دنیا شناسایی شده‌اند (۲). از این تعداد ۱۹ گونه دوزیست بی‌دم (قورباغه و وزغ) از ایران شناسایی شده‌است که از این تعداد ۳ گونه‌ی وزغ و ۵ گونه‌ی قورباغه از استان گیلان گزارش شده‌است (۳). با وجود اهمیت بالای دوزیستان در اکوسیستم‌ها، این گروه جزو آسیب‌پذیرترین مهره‌داران طبیعت بوده و در طی سال‌های اخیر با نرخ بالایی از کاهش جمعیت مواجه بوده‌اند. مهمترین عوامل کاهش جمعیت، اثرات ناشی از فعالیت‌های انسانی و پاتوژن ها می‌باشند (۴). به‌دلیل چرخه‌ی زندگی منحصر به‌فرد بی‌دم‌ها (زیستگاه آبی و خشکی) آن‌ها تحت تاثیر طیف وسیعی از پاتوژن‌ها مانند انگل‌های خونی قرار دارند (۵). انگل‌های خونی در سه شاخه‌ی مهم قرار می‌گیرند: انگل‌های خونی تاژکدار، آپی کمپلکسا و نماتدهای فیلاریایی که همه‌ی آن‌ها سیکل زندگی چند میزبانه دارند (۶). انگل‌های خونی آپی کمپلکسا در دوزیستان تنوع بالایی دارند و در خانواده‌های زیر قرار می‌گیرند:

Hepatozoidae ،Haemogregarinidae Léger, ۱۹۱۱ Dactylosomatidae Jakowska ۱۹۵۵ ،Wenyon, ۱۹۲۶ and Nigrelli, ،(۷، ۸). آن‌ها به شکل بیضی، گرد، موز شکل در گلبول‌های‌قرمز یا حتی در گلبول‌های‌سفید خون وجود دارند (۹).

راسته‌ی آدلورینا شامل گروه بزرگی از انگل‌های خونی متعلق به رده‌ی کوکسیدیا و شاخه‌ی آپی‌کمپلکسا هستند که طیف وسیعی از مهره‌داران شامل ماهیان، دوزیستان، خزندگان، پرندگان و پستانداران را آلوده می‌کنند. این انگل‌ها احتمالا توسط بی‌مهره‌گان خون‌خوارِ ناقل به‌عنوان میزبان اصلی که شامل حشرات دو بال، کنه، مایت و زالو هستند به میزبانان مهره‌دار انتقال می‌یابند (۱۰، ۱۱). انگل‌های خونی آدلورینا چند میزبانه هستند که بر اساس تکوین در مرحله‌ی اسپوروگونی در ناقل میزبان متمایز می‌شوند (۱۲).

آلودگی گلبول‌های‌قرمز توسط پروتوزوآهای خونی می‌تواند باعث تغییر درمورفولوژی گلبول‌های خونی شود (۶) . اهمیت بررسی پاتوژن‌ها در دوزیستان به این دلیل ثابت شده‌است که بعضی از آن‌ها مانند ویروس‌ها یا قارچ‌های کیترید *Batrachochytrium dendrobatidis* (۱۳) یکی از عوامل مهم انقراض دوزیستان محسوب می‌شوند (۱۴). در ایران تحقیقات کمی در مورد انگل‌های خونی دوزیستان صورت گرفته‌است و تنها سه مطالعه در مورد انگل‌های خونی قورباغه مردابی انجام شده‌است (۱۵ ،۱۷).

وزغ تالشی (*Bufo eichwaldi*) در کشورهای آذربایجان، مناطق قفقاز و شمال ایران در استان‌های مازندران و گیلان در مناطق مرطوب و سایه‌دار نواحی کوهستانی و جنگلی یافت می‌شود. این گونه هم اکنون به عنوان گونه‌ی در معرض خطر در لیست قرمز اتحادیه بین‌المللی حفاظت از طبیعت (IUCN) قرار دارد (۱۸). پراکنش این گونه محدود به جنگل‌های هیرکانی، جنوب شرق آذربایجان و شمال ایران و تا ارتفاع ۱۲۰۰ متر از سطح دریا است (۱۹). با وجود پراکنش نسبتاً گسترده این وزغ در ایران تاکنون هیچ اطلاعاتی در مورد پاتوژن‌های این گونه وجود ندارد. در این مطالعه، شیوع و شدت انگل‌های خونی پروتوزوآیی وزغ تالشی در زیستگاه‌های مختلف استان گیلان مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در مجموع ۷۵ وزغ تالشی در شمال ایران در نزدیکی تالاب‌ها در بهمن و اسفند ۱۴۰۲ توسط تور و دست گرفته‌شدند (سوستان لاهیجان (37°18′10″ N, 50°02′518″ E)، سیاهکل (37°13′34″ N, 49°82′23″ E)،

کچا (37°08′80″ N, 49°60′88″ E)، سقالکسار (37°15′64″ N, 49°52′80″ E)، سراگاه (37°82′70″ N, 48°88′07″). چند قطره خون از هر وزغ گرفته‌شد و جهت تهیه‌ی اسمیر خونی بر روی لام و همچنین آزمایش ژنتیکی در ویال حاوی اتانول استفاده شد. در خون‌گیری از نمونه‌ها تلاش شد به وزغ‌ها آسیب نرسد. خون‌گیری از ورید صورت و یا قلب بسته به اندازه وزغ‌ها توسط سرنگ انسولین انجام گرفت. وزغ‌ها بعد از خون‌گیری در محیط رها شدند.

رنگ آمیزی و بررسی میکروسکوپی: از خون گرفته‌شده گسترش‌های خونی تهیه‌شد و گسترش‌ها در هوا خشک شدند. سپس به مدت ۲ دقیقه توسط الکل متانول مطلق فیکس شدند. لام‌ها در دمای طبیعی خشک شدند و به مدت ۱۵دقیقه در محلول گیمسا ۱۰٪ قرارگرفته و رنگ‌آمیزی شدند. بررسی لام‌ها و انگل‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ و به کمک روغن ایمرسیون انجام شد. تلاش شد به‌طور یکسان ۱۰ میدان و حداقل ۱۰۰۰۰ گلبول‌قرمز برای هر نمونه بررسی شود (۲۰). تنوع و شیوع انگل‌های خونی در نمونه‌ها مورد بررسی قرارگرفت. عکس‌ها توسط نرم افزار TSVIEW ورژن ۶.۲.۴.۵ ثبت شدند.

آنالیز مولکولی: از خون وزغ‌هایی که در آن‌ها انگل مشاهده‌شد برای شناسایی مولکولی استفاده شد. استخراج DNA نمونه‌ی خون توسط بافر دترجنت Triton X-۱۰۰ (با فرمول: بافر لیزکننده ۱ (حاوی ۰.۱۵۷ گرم Tris-Hcl، ۱۱ گرم ساکارز ۰/۱۰۱گرم Mgcl2 و ۱ میلی‌گرم ۱۰۰ Triton X-که با ۹۹ میلی‌گرم آب مقطر به حجم رسیده‌است) و بافر لیزکننده ۲ (حاوی ۰/۱۵۷ گرم Tris-Hcl، ۰/۳۷۵ گرم EDTA و ۰/۲۹۴ گرم سدیم‌سیترات که با آب مقطر به حجم رسیده‌است)، سدیم‌دودسیل سولفات (SDS) ۱۰درصد ۱۰ گرم، کلرید سدیم اشباع ۰/۶ مولار، ۳۵ گرم، کلروفرم، اتانول سرد، آب مقطر آمپولی (دوبار تقطیر)) انجام شد (۱۶). توالی پرایمر بر اساس مطالعات قبلی قطعه‌ای از ژن *s* rRNA ۱۸در نواحی Hep300 (5′-GTT TCT GAC CTA TCA GCT TTC GACG-3′) و (5′-CAA ATC TAA GAA TTT ۹۰۰Hep CACCTC TGA C-3′) تعیین شد که تقریبا ۶۰۰ جفت‌باز از ژن *18S rRNA* را رونویسی می‌کند (۲۱). واکنش PCR در ۲۵ میکرولیتر محلول حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۱ میکروگرم DNA الگو و غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر انجام شد. واکنش PCR شامل ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای جدا شدن دو رشته DNA، در پی آن ۳۰ سیکل شامل جدا شدن دو رشته‌ی در ۴۵ ثانیه در دمای ۹۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و ساخته شدن رشته‌ی مکمل در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت اتصال نهایی رشته‌های مکمل در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. نتایج PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با نور UV مشاهده شد (۱۶، ۲۱). توالی‌یابی محصول نهایی، توسط شرکت سینا کلون تهران انجام شد.

تحلیل فیلوژنتیکی: توالی ژن ۱۸s rDNA با استفاده از BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) تعیین هویت شد و با استفاده از برنامه BioEdit(ورژن ۷/۲) ویرایش شد. برای آنالیز فیلوژنتیک، توالی پیدا شده در این آزمایش با توالی‌های دانلود شده در بانک ژنی مورد استفاده قرارگرفت. فاصله‌ی ژنتیکی توالی جدید با نتایج NCBI توسط برنامه‌ی مگا (ورژن۵/۱۰) محاسبه شد. برای دقت بالاتر، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوی حداکثر احتمال با نرم افزارPhyMl (ورژن۲/۴/۳s) و مدل TPM۲ef+I+G توسط نرم افزار Jmodel test (ورژن ۲/۱/۱۰) که با استفاده از AIC به عنوان بهترین مدل تکاملی تعیین شد، انجام‌گرفت. درخت فیلوژنتیک توسط نرم افزار FigTree(ورژن ۱/۳/۱) رسم شد. سکانس جدید در بانک ژنی با شماره دسترسی PX۴۵۹۵۶۱ ثبت شد.

نتایج

در این مطالعه، مجموعاً ۷۵ وزغ با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرارگرفتند که از این تعداد، ۲۰ وزغ آلوده به انگل‌های هموگریگارینی بودند (شیوع ۲۶/۶۶٪). بررسی شیوع انگل با توجه به لوکالیته نشان‌داد که کچا با ۵۳/۳٪ (۸ عدد از ۱۵ وزغ) بیشترین شیوع انگل‌ها را دارا بود. بعد از آن سرآگا با ۲۶/۶۶٪ (۴ از ۱۵)، سیاهکل ۲۵ درصد (۲ از ۸)، سوستان ۱۶/۶۶ (۲ از۱۲) و ساقلکسار ۱۶ درصد (۴ از ۲۵) قرار داشتند. این انگل‌ها به‌صورت شفاف، با سیتوپلاسم فاقد رنگ‌پذیری و اشکال گرد، کشیده و آمیبی‌فرم در داخل گلبول‌های قرمز مشاهده شدند. تغییر شکل هسته یا گلبول قرمز در اثر حضور انگل در گلبول‌های قرمز مشاهده نگردید. بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی مراحل خونی مورد بررسی، این انگل‌ها به‌عنوان تروفوزوئیت‌های جنس *Dactylosoma* شناسایی شدند.

برای تعیین دقیق‌تر گونه انگل، آنالیز مولکولی ژن ۱۸*s* rRNA در یکی از نمونه‌ها انجام شد. نتایج فیلوژنتیکی حاصل از تحلیل این ژن نشان‌داد که توالی به‌دست آمده در این مطالعه در یک کلاد با سایر توالی‌های وابسته به جنس *Dactylosoma* قرارگرفت. توالی نمونه‌ی مورد مطالعه به همراه توالی‌های *Dactylosoma kermiti* کدهای GenBank:MN۸۷۹۳۹۴ ، MN۸۷۹۳۹۸، (MN۸۷۹۳۵۵) در یک شاخه با پشتیبانی آماری نسبتاً بالا (Bootstrap=۷۳۱) خوشه‌بندی شدند. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی قرابت فیلوژنتیکی بالای توالی نمونه با *D. kermiti* است، هرچند تفاوت‌های ژنتیکی مشاهده‌شده ممکن است نمایان‌گر گونه‌ای جدید یا واریانت درون‌گونه‌ای باشد.

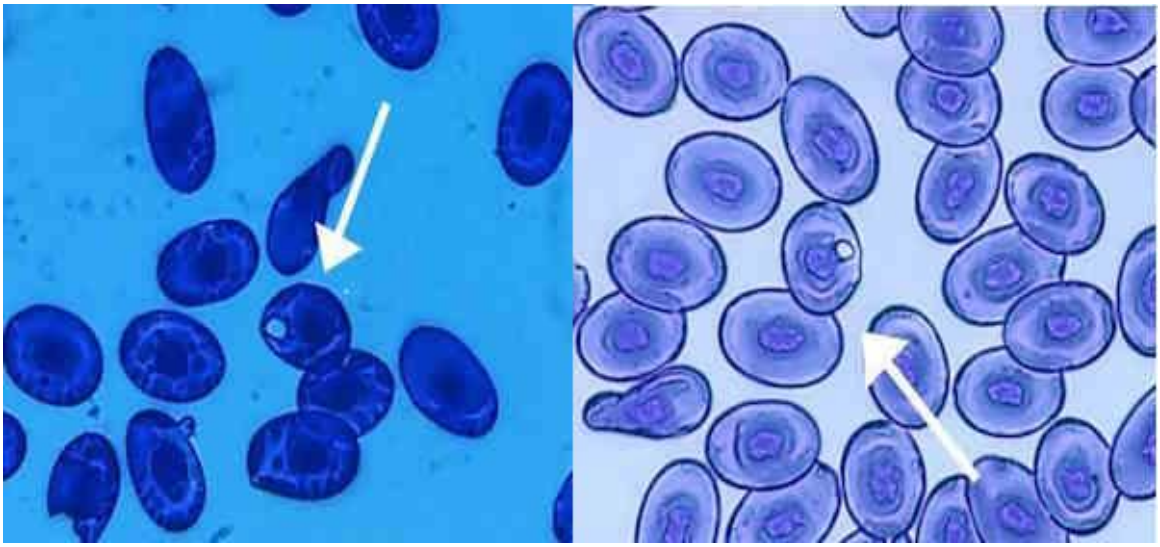
علاوه بر این، توالی نمونه فاصله ژنتیکی قابل توجهی با گونه‌های دیگر مانند *Dactylosoma ranarum* و *Babesiosoma stableri* داشته و تمایز آن از این گروه‌ها را تأیید می‌کند. این توالی‌ها به عنوان گروه خواهری با گروه انگل‌های *Dactylosoma ranarum* که در میزبان‌های *Pelophylax kl* و *Pelophylax esculentus* از اروپا و آمریکا و همچنین *Dactylosoma* sp که در قورباغه *Pelophylax ridibundus* از ایران گزارش شده‌اند، قرار گرفته‌اند.

برای تعیین دقیق جایگاه آرایه‌ای این توالی، مطالعات بیشتری شامل بررسی‌های مورفولوژیک، چرخه‌ی زندگی، و داده‌های بوم‌شناسی ضروری است. یافته‌های این مطالعه گامی در جهت شناخت تنوع ژنتیکی در جنس *Dactylosoma* در نواحی مورد مطالعه محسوب می‌شود. این مطالعه نخستین گزارش از وجود انگل داکتیلوزوما و همچنین اولین گزارش انگل‌های خونی آپی‌کمپلکسا در وزغ‌های تالشی محسوب می‌شود.

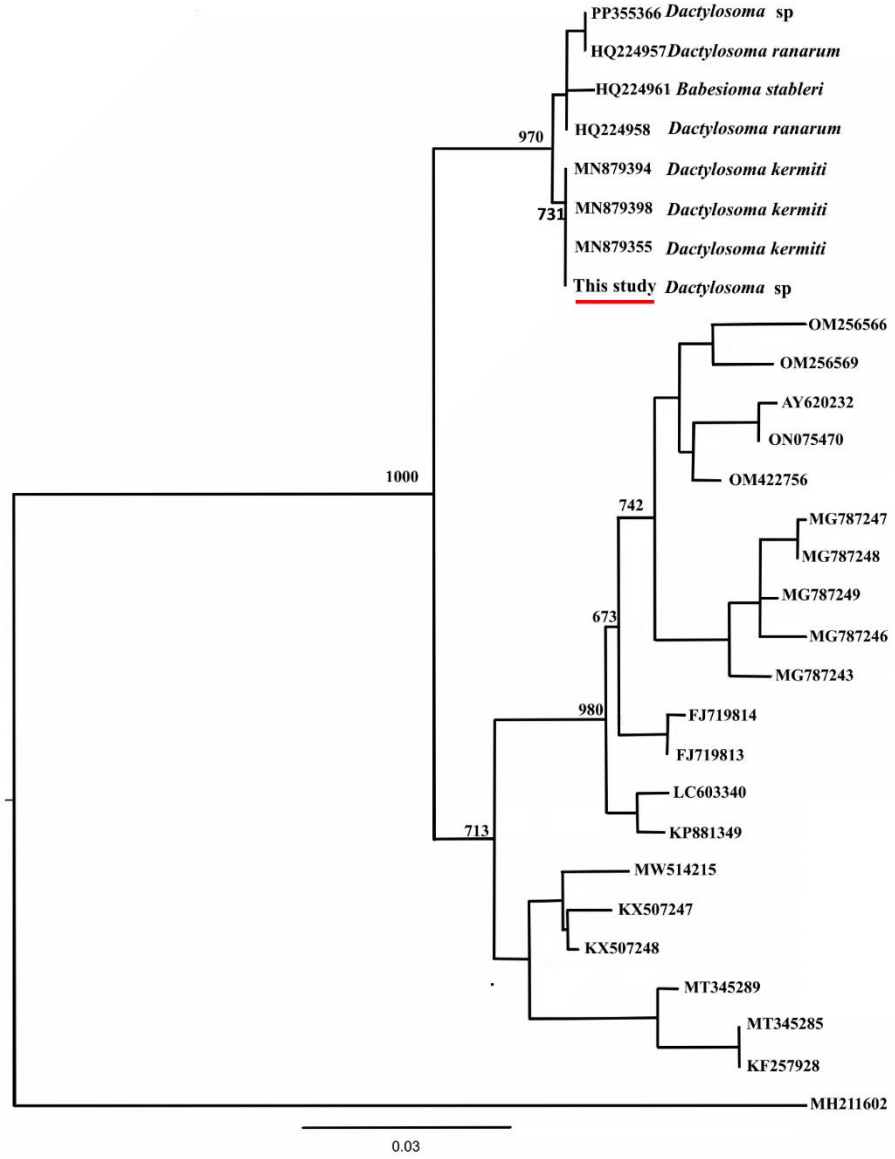
Taxonomic summary

Phylum:	Apicomplexa	Levine,	۱۹۷۰
Class:	Conoidasida	Levine,	۱۹۸۸
Subclass:	Coccidia	Leuckart,	۱۸۷۹
Order:	Eucoccidiorida	Léger,	۱۹۱۱
Suborder:	Adeleorina	Léger,	۱۹۱۱
Family:	Dactylosomatidae	(Jakowska&Nigrelli,)	۱۹۵۵
Genus:	Dactylosoma Labbé		۱۸۹۴
Species:	Dactylosoma sp		
Host:	Talysh Bufo (Bufo eachwaldii)		
Other host in Iran:	Pelophylax ridibundos		

شکل ۱: انگل جنس ***Dactylosoma*** **sp** در وزغ تالشی (***B. eichwaldi***)



شکل ۲: درخت فیلوژنتیکی گونه ***Dactylosoma*** **sp** بر اساس ژن ۱۸*s* rRNA



بحث و نتیجه‌گیری

دوزیستان دارای چرخه زندگی دو مرحله‌ای هستند که شامل فاز لاروی آبزی و فاز خشکی پس از دگردیسی می‌باشد، و این امر باعث وابستگی آن‌ها به هر دو زیستگاه می‌شود (۲۲). این گروه مهره‌داران خون‌سرد و دارای پوست نفوذپذیر هستند که آن‌ها را نسبت به تغییرات محیطی آسیب‌پذیر می‌کند (۴). در چند دهه اخیر، کاهش جمعیت و انقراض جهانی دوزیستان باعث افزایش توجه محققان به آن‌ها شده‌است؛ تحقیقات نشان می‌دهد که بزرگ‌ترین عامل تهدید این گونه‌ها، تخریب زیستگاه ناشی از فعالیت‌های انسانی و تغییرات اقلیمی است (۴).

دوزیستان میزبان انواع متعددی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها هستند (۲۳). برخی از این عوامل پاتوژن به صورت اتفاقی، برخی بالقوه مشترک زئونوتیک و برخی باعث بیماری‌های مهمی شده و نقش مهمی در کاهش جمعیت دوزیستان ایفا می‌کنند (۲۴). در مطالعه‌ی حاضر، حضور انگل‌های آپی‌کمپلکسا در خون وزغ‌های تالشی شمال کشور به تأیید رسید که شامل انگل جنس *Dactylosoma* sp بود. اگرچه نمونه‌های مورد مطالعه در یک کلاد با *D. kermiti* قرار گرفتند، به دلیل تمایز ناکافی، برای شناسایی دقیق‌تر گونه، نیازمند نمونه‌های بیش‌تری از توالی‌های این انگل هستیم. اخیراً پنج گونه از جنس *Dactylosoma* شناسایی شده‌اند که دو گونه میزبان ماهیان و سه گونه دیگر میزبان دوزیستان بی‌دم هستند (۲۵). گونه‌ی *Dactylosoma ranarum* رایج‌ترین و پر شیوع‌ترین گونه است که از چندین گونه دوزیست بی‌دم از جمله *Pelophylax esculentus*، *Rhinella marina*، *Pelophylax ridibundus* و *Pelophylax saharicus* گزارش شده‌است.

انگل‌های آپی‌کمپلکسا، از گروه هموگریگارینی‌ها، انگل‌های خونی با چرخه زندگی چندمیزبانه شامل میزبان مهره‌دار و ناقل بی‌مهره بندپا هستند (۱۰). طیف وسیعی از بندپایان مانند پشه‌ها، مگس‌ها، کنه‌ها، مایت‌ها و زالوها به عنوان ناقل‌های قطعی عمل می‌کنند (۱۰). تا کنون چرخه‌ی کامل زندگی هیچ‌یک از گونه‌های جنس *Dactylosoma* گزارش نشده‌است؛ با این‌حال، **Barta** به طور آزمایشگاهی انتقال *D. ranarum* به قورباغه‌ها از طریق زالو را نشان داده‌است (۲۶). با توجه به مناطق پراکنش انگل *Dactylosoma*، فرضیه‌ی انتقال آن توسط مگس‌های شنی جنس *Phlebotomus*، که ناقل طیف متنوعی از انگل‌های خونی به دوزیستان هستند، مطرح شده‌است؛ اگرچه شواهد تایید شده‌ای در این زمینه موجود نیست (۲۵).

Dactylosoma در میان مهره‌داران عمدتاً در دوزیستان و ماهیان یافت می‌شود. مطالعه‌ای در آفریقا و اروپا روی ۶۴۳ دوزیست بی‌دم از ۳۸ گونه نشان داد که تنها در سه گونه‌ی بی‌دم، آلودگی به *Dactylosoma* شناسایی شده‌است که شامل قورباغه *Ptychadena anchietae* آلوده به *D. kermiti*، قورباغه *Pelophylax lessonae* آلوده به *Dactylosoma* sp و وزغ *Sclerophrys gutturalis* آلوده به *D. kermiti* بودند (۲۵). شیوع آلودگی در قورباغه‌ها ۳۸ درصد و در وزغ‌ها ۱۲ درصد گزارش شده‌است. گونه‌هایی مانند *Ptychadena* به‌دلیل زندگی در زیستگاه‌های متنوع و عادات غذایی گوناگون، به طیف وسیعی از انگل‌های خونی آلوده می‌شوند (۲۷).

مطالعه‌ای توسط **Netherlands** و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد که ۱۶/۷٪ (۱۳ از ۷۸ نمونه) از گونه‌ی *Ptychadena anchietae* آلوده به انگل بودند(۲۵). همچنین **Rahimi** و همکاران با بررسی چهار قورباغه مردابی *Pelophylax ridibundus* در شمال ایران، وجود یک نمونه‌ی آلوده به *Dactylosoma* sp (۰.۲۵٪) را گزارش کردند که شدت آلودگی ۰/۰۲٪ بود (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر، شیوع آلودگی در وزغ‌ها ۲۶/۶۶ درصد گزارش شده‌است. انگل‌هایی مانند *Dactylosoma* ممکن است در میزبان مهره‌دار برای مدت طولانی بدون نیاز به آلودگی مجدد حفظ و تکثیر شوند که این موضوع به توانایی تولیدمثل غیرجنسی متعدد آن‌ها در گلبول‌های قرمز مربوط می‌شود. مشابه انگل‌هایی مانند جنس *Hepatozoon*، این انگل‌ها نیازمند آلودگی مجدد میزبان

نیستند، بنابراین تفاوت‌های گزارش‌شده در میزان آلودگی در مناطق و زمان‌های مختلف ممکن است به این موضوع مرتبط باشد (۲۸).

ژن ۱۸s rRNA به‌عنوان یک مارکر مناسب برای بررسی طیف وسیعی از انگل‌های آپی‌کمپلکسا شناخته شده و داده‌های زیادی درباره اعضای راسته Adelina در دست است. این ژن دارای نواحی حفاظت شده و متغیر است که اطلاعات تکاملی کافی برای تحلیل روابط فیلوژنتیکی در فواصل ژنتیکی مختلف فراهم می‌کند (۲۹).

در مطالعه‌ی حاضر، همانگونه که انتظار می‌رفت، توالی‌های *Dactylosoma* به دست آمده با *D. ranarum* و *D. kermiti* در یک کلاد با حمایت قوی قرار گرفتند و فاصله‌ی ژنتیکی بین آن‌ها صفر بود. فاصله‌ی ژنتیکی سایر جنس‌های هموگریگارینی مانند *Haemogregarina*، *Karyolysus*، *Hemolivia* و *Hepatozoon* حدود ۱٪ یا کم‌تر است. بر اساس مقایسه‌ی توالی‌های ژن حفاظت شده ۱۸s rRNA، به‌نظر می‌رسد فاصله‌ی ژنتیکی بین *Dactylosoma* های میزبان دوزیستان به طور خاص پایین است. بنابراین، افزایش نمونه‌برداری از *Dactylosoma* به‌ویژه در میزبان‌های ماهی، برای مقایسه و تأیید این موضوع که آیا این فاصله کم در ژن ۱۸s rRNA مختص همه‌ی *Dactylosoma* ها است یا تنها در میزبان‌های دوزیستان دیده می‌شود، اهمیت دارد. با توجه به نوع چرخه‌ی زندگی اکثر دوزیستان بی‌دم، آن‌ها ممکن است در معرض انواع پروتیستاهای منتقل‌شده توسط ناقل‌ها قرار گیرند، به‌ویژه گونه‌هایی که شب‌زی و نیمه‌آبزی هستند و به‌عنوان میزبان بالقوه انگل‌های خونی داخل و خارج‌سلولی عمل می‌کنند (۳۰). **Barta** و **Desser** (۵) وجود انگل‌های خونی را در اسمیرهای خونی دوزیستان کانادا بررسی کردند و شیوع بالای انگل‌های خونی را در گونه‌هایی با مرحله آبزی مانند *Lithobates clamitans*، *L. catesbeianus* و *L. septentrionalis* نسبت به گونه‌های خشکی‌زی مانند *Anaxyrus americanus*، *Lithobates sylvaticus*، *Pseudacris crucifer* و *Plethodon cinereus* گزارش کردند.

مطالعه‌ای در آفریقای جنوبی مقایسه‌ای بین انگل‌های خونی بی‌دم با چرخه‌ی زندگی متفاوت (آبزی، نیمه‌آبزی، خشکی‌زی و نیمه‌خشکی‌زی) انجام داد که نشان داد شیوع گونه‌های انگل‌های آپی‌کمپلکسایی در گونه‌های نیمه‌آبزی و نیمه‌خشکی‌زی بیش‌تر است، احتمالاً به‌دلیل فراوانی ناقل‌های بالقوه در حاشیه‌ی رودخانه‌ها (۲۸).

غذایابی محیطی نیز ممکن است نقش مهمی در انتقال انگل‌های خونی در بی‌دمان داشته باشد؛ برای مثال، گونه‌هایی از کلئوپترا، ایزوپترا و فورمیدا که حدود ۵۰٪ غذای بی‌دمان از خانواده‌های Hylidae، Bufonidae و Leptodactylidae را تشکیل می‌دهند، به‌عنوان دومین عامل مهم انتقال انگل‌های خونی مطرح شده‌اند (۳۱). همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد که نماتوسران‌ها (Nematocera) مهم‌ترین طبقه غذایی قورباغه‌های درختی خانواده Hylidae مانند *Dendropsophus nanus* و *Dendropsophus sanborni* و *Lysapsus limellum* هستند (۳۲).

کوکسیدیاها احتمالاً مهم‌ترین آپی‌کمپلکس‌ها در مهره‌داران هستند که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، به‌جز گونه‌هایی که باعث بیماری در حیوانات خانگی می‌شوند (۳۳). طبق بررسی **Duszynski** و همکاران (۳۳)، تاکنون ۳۸ گونه‌ی Eimeria، ۱۱ گونه‌ی Isospora، دو گونه‌ی Goussia و یک گونه‌ی Hyaloklossia در دوزیستان شناسایی شده‌است. در آینده، نیاز به مطالعات بیش‌تر درباره جنبه‌های زیست‌شناسی و مورفولوژیکی این گروه از دوزیستان احساس می‌شود. همچنین برای حفاظت دوزیستان و بررسی تأثیرات احتمالی پاتوژن‌های خونی بر سلامت آن‌ها، مطالعات بیش‌تر ضروری است.

اگرچه بسیاری از محققان این انگل‌های خونی پروتوزوآیی را غیرپاتوژنیک می‌دانند، اما برخی مانند **Da Costa** و **de Moura** (۳۴) تغییرات مورفولوژیکی در گلبول‌های قرمز، از جمله از دست دادن هسته و هیپرتروفی، را در قورباغه *Leptodactylus ocellatus* آلوده به انگل

Lankestrella sp گزارش کرده‌اند. این یافته‌ها توسط محققان دیگر نیز تأیید شده‌است (۳۰, ۳۵). همچنین قطعه قطعه شدن هسته و از دست دادن هموگلوبین توسط انگل *Hepatozoon* گزارش شده‌است (۳۶). برخی گزارش‌ها نقص در گلبول‌های قرمز و برآمدگی غشای سیتوپلاسمی و چسبندگی گلبول‌های قرمز در اثر آلودگی به انگل‌های آپی‌کمپلکسایی را بیان کرده‌اند (۳۷, ۳۸). در مطالعه‌ی حاضر هیچ‌گونه شواهدی از آسیب هسته یا تغییر شکل گلبول قرمز به‌دلیل وجود انگل *Dactylosoma* مشاهده نشد، اما بررسی‌های بیشتر با تمرکز بر عوامل پاتوژنیته این انگل پیشنهاد می‌شود.

با تکیه بر اطلاعات به‌دست آمده از این مطالعه و سایر تحقیقات مرتبط با زندگی وزغ، می‌توان استراتژی‌های حفاظتی مؤثرتری برای تضمین بقای بلندمدت وزغ *B. eichwaldi* در جنگل‌های هیرکانی، که پناهگاهی حیاتی برای این گونه و سایر موجودات بومی است، تدوین کرد. مطالعات آینده باید بر انتقال انگل‌ها، عوامل اکولوژیکی مؤثر بر الگوهای آلودگی و تأثیرات آن‌ها بر میزبان متمرکز شوند. آگاهی از این اطلاعات برای درک تأثیر انگل‌ها بر تنوع زیستی بسیار مهم است و پیامدهای مهمی برای حفاظت به‌ویژه در گروه‌های میزبان آسیب‌پذیر مانند دوزیستان دارد.

مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار وجود انگل‌های آپی‌کمپلکسایی از جنس *Dactylosoma* را در وزغ‌های تالشی شمال ایران تأیید کرد و نشان داد که این انگل‌ها با شیوع قابل توجهی (حدود ۲۶/۶٪) در جمعیت وزغ‌ها حضور دارند. تحلیل‌های مولکولی و فیلوژنتیکی مبتنی بر ژن s ۱۸rRNA، قرابت بالای نمونه‌های مورد مطالعه با گونه‌های شناخته‌شده مانند *Dactylosoma kermiti* را نشان داد، هرچند که تفاوت‌های ژنتیکی موجود ممکن است نمایانگر گونه جدید یا واریانت درون‌گونه‌ای باشد. این یافته‌ها نشان‌دهنده‌ی تنوع ژنتیکی قابل توجه در جنس *Dactylosoma* در این نواحی است که نیازمند بررسی‌های بیشتر و گسترده‌تر است. با توجه به سیکل زندگی چند میزبان و ناقل‌های متعدد این انگل‌ها، تحقیقات بیش‌تر در زمینه‌ی بررسی چرخه‌ی زندگی کامل، زیست‌شناسی، اکولوژی و ناقل‌های احتمالی، جهت تعیین دقیق جایگاه آرایه‌ای و پویایی انتقال انگل‌ها ضروری است. همچنین تأثیرات بالقوه این انگل‌ها بر سلامت میزبانان و نقش آن‌ها در کاهش جمعیت دوزیستان بایستی به دقت بررسی شود. با تکیه بر اطلاعات به‌دست آمده، این مطالعه می‌تواند نقطه‌ی آغازی برای تدوین استراتژی‌های حفاظتی موثر در راستای حفظ گونه‌ی وزغ *B. eichwaldi* و سایر دوزیستان منطقه باشد؛ گونه‌هایی که به‌علت آسیب‌پذیری زیستگاه‌ها و تهدیدات زیست‌محیطی در معرض خطر قرار دارند. حفاظت از زیستگاه‌های طبیعی و کنترل عوامل تهدیدکننده می‌تواند به حفظ تنوع زیستی، سلامت اکوسیستم‌های تالشی و تضمین بقای بلندمدت این گونه‌های حساس کمک شایانی نماید. در نهایت، مطالعه و شناخت بهتر انگل‌های خونی و تعاملات آن‌ها با میزبان، علاوه بر ارزش علمی، اهمیت حیاتی در حفاظت و مدیریت پایدار جمعیت دوزیستان دارد و می‌تواند افق‌های جدیدی در زیست‌شناسی این گروه از مهره‌داران باز کند.

References

1- Faggioni GP, Souza FL, Uetanabaro M, Landgref-Filho P, Prado CPA. Diet of *Leptodactylus bufonius* Boulenger, 1894, in the Brazilian Chaco, 2017. https://repositorio.unesp.br/handle/11449/163100.

2- Frost DR. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Available from: Https://Amphibians of the world. Amnh. Org/Index.Php. American Museum of Natural History, New York, USA, 2021.

3- Yousefi S, Saeedi H, Behfar F, Fallahi R, Izadian M. Atlas of Amphibians of Iran. Department of Environment of Iran. 2013 [In Persian].

4- Wake DB, Vredenburg VT. Are we in the midst of the sixth mass? extinction? A view from the world of amphibians. Proc Nat Acad Sci. 2008; 105: 11466–11473.

5- Barta J, Desser S. Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. J Wildl Dis. 1984; 20:180–186.

6- Davies AJ, Johnston MRL. The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibians, and reptiles. Adv Parasitol. 2000; 45:1–107.

7- Poynton S, Whitaker B. Chapter 15 Protozoa and Metazoa infecting amphibians. In: Wright K, Whitaker B (eds) Amphibian medicine and captive husbandry. Krieger Publishing Company, Malabar. 2001; 193–221.

8- Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS,Smith TG. Phylogenetic position of the adeleorinid Coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using *18S rRNA* sequences. J. Eukaryot Microbiol. 2012; 59: 171–180.

9- Reis Ferreira D, Perles L, Machado RZ, Prado CPA, André MR. Molecular detection of Apicomplexan hemoparasites in anurans from Brazil. Parasitol Res. 2020; 119 (10): 3469.

10- Smith TG. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). J Parasitol. 1996; 82: 565–585.

11- Curtis LM, Grutter AS, Smit NJ, Davies AJ. *Gnathia aureamaculosa*, a likely definitive host of *Haemogregarina balistapi* and potential vector for *Haemogregarina bigemina* between fishes of the Great Barrier Reef, Australia. Int J Parasitol. 2013; 43: 361–370.

12- Telford SR. Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. New York: CRC Press; 2009.

13- Pessier AP, Nichols DK, Longcore JE, Fuller MS. Cutaneous chytridiomycosis in poison dart frogs (*Dendrobates* spp.) and White's tree frogs (*Litoria caerulea*). J Veterin Diagn Invest. 1999; 11(2):194-9.

14- Mendoza-Almeralla C, Burrowes P, Parra-Olea G. La quitridiomicosis en los anfibios de México: una revisión. Rev Mex Biodivers. 2015; 86: 238–248.

15- Rajabi F, Javanbakht H. Study of blood parasite in *Pelophylax ridibundus* from north of Iran. J Anim Environ Sci. 2019: 1: 145-150[In Persian].

16- Rahimi Z, Hajiyan R, Javanbakht H. Blood parasite of the genus *Dactylosoma* Labbé, 1894 in marsh frog (*Pelophylax ridibundus*) from north of Iran. J. animal divers. 2023; 5(4) :10-2023[In Persian].

17- Rajabi F, Javanbakht H, Sajjadi SS. A preliminary study of haemoparasites in marsh frogs, *Pelophylax ridibundus* (Ranidae) from Iran. J entomol zool. 2017; 5(4): 1314-1317[In Persian].

18- Derakhshan S, Kami HG, Mohammadi Z. Morphological and genetic diversity of Eichwald Toad, *Bufo eichwaldi* in marginal populations of the east and west Caspian Sea lowland. Zool middle east. 2024; 70 (3): 10.1080/09397140.2024.2378515[In Persian].

19- Litvinchuk SN, Borkin LJ, Skorinov DV, Rosanov JM. A new species of common toads from the Talysh Mountains, south-eastern Caucasus: genome size, allozyme, and morphological evidences. Russ J Herpetol. 2008. 15 (1): 19 – 43.

20- Medrano-Tupiza, E, Morales-Arciniega S, Santander Parra S, Núñez-Naranjo L, Puga-Torres, B. Absence of Hemoparasites in Wildlife Snakes, Located in the Ecological Reserves Cota 70, Cotacachi-Cayapas and Sumaco-Napo-Galeras in Ecuador. Res Zool. 2017; 7: 7-10.

21-Ujvari B, Madsen T, Olsson M. High Prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa,

Hepatozoidae) Infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) From Tropical Australia. J Parasitol. 2004; 90(3): 670-672.

22- Becker CG, Fonseca CR, Haddad CFB, Prado PI. Habitat split as a cause of local population declines of amphibians with aquatic larvae: Contributed paper. Conserv Biol. 2010; 24: 287–294.

23- Jenkinson TS, Betancourt Román CM, Lambertini C, Valencia-Aguilar A, Rodriguez D, Nunes-de-Almeida CHL,*et al.* Amphibian-killing chytrid in Brazil comprises both locally endemic and globally expanding populations. Mol Ecol. 2016; 25(13): 2978–2996.

24- Vredenburg VT, Roland AK, Tate ST, Cheryl JB. Dynamics of an emerging disease drive large-scale amphibian populations extinctions. PNAS. 2010; 107: 9689–9694.

25- Netherlands EC, Cook CA, Du Preez LH, Vanhove MPM, Brendonck L, Smit, N. J. An overview of the Dactylosomatidae (Apicomplexa: Adeleorina: Dactylosomatidae), with the description of *Dactylosoma kermiti* n. sp. parasitising *Ptychadena anchietae* and *Sclerophrys gutturalis* from South Africa. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2020; 11: 246-260.

26- Barta JR. The Dactylosomatidae. Adv Parasitol. 1991; 30: 1-37.

27- Du Preez LH, Kok DJ. The frog genus Ptychadena as host for polystomatid (Monogenea) parasites in Africa J Herpetol Assoc Afr. 1992; 40: 47–49.

28- Netherlands EC, Cook CA, Kruger DJD, Du Preez LH, Smit NJ. Biodiversity of frog haemoparasites from sub-tropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 2015; 4: 135–141.

29- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene. 1998; 71: 491–499.

30- Desser S. The blood parasites of anurans from Costa Rica with reflections on the taxonomy of their trypanosomes. J Parasitol. 2001; 87: 152–160.

31- Franca F, Facure KG, Giaretta AA. Trophic and spatial niches of two large-sized species of *Leptodactylus* (Anura) in southeastern Brazil. Stud Noe Fauna E. 2024; 39: 243-248.

32- Macale D, Vignoli L, Carpaneto GM. Food selection strategy during the reproductive period in three syntopic hylid species from a subtropical wetland of north-east Argentina. Herptol J. 2008; 18: 49–58.

33- Duszynski DW, Bolek MG, Upton SJ. Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of amphibians of the world. Zootaxa. 2007; 1667: 1–77.

34- Da Costa SCG, de Moura Piersia ND. *Lankesterella alencari* N. SP., A toxoplasma-like organism in the central nervous system of amphibia (Protozoa, Sporzoa). Mem İnst Oswaldo Cruz. 1971; 69 (3): 397-411.

35- Isaak-Delgado AB, Lopez-Diaz O, Romero Callejas E, Martinez- Hernandez F, Munoz-Garcia CI, Villalobos G, Rendon-Franco E. Morphological and molecular characteristics of hemoparasites in vaillant's frogs (Lithobates vaillanti). Parasitol Res. 2020; 6: 1891-1901.

36- Marcus LC. Veterinary Biology and Medicine of Captive Amphibians and Reptiles. Philadelphia, PA: Lea and Febiger. 1981.

37- Netherlands EC, Cook CA, Smit NJ. *Hepatozoon* species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. Parasitising three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae). Parasites and Vectors. 2014; *7*(1): 1-12.

38- Pessier AP. Management of disease as a threat to amphibian conservation. Int. Zoo Yb. 2008; 42: 30–39.

New Findings in Veterinary Microbiology
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Quarterly - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 4, Winter 2026, pages: 63-73

First molecular identification of blood parasites of the genus *Dactylosoma* Labbé 1894 in Talysh toad (*Bufo eichwaldi*) from the north of Iran

Fatemeh Abdolahi[1] and Hossein Javanbakht*[2]

1- Postgraduate, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

*** Corresponding author**: Animal Biosystematic – specialized in blood parasites
Address: Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran –
Tel: +989112414093 – Fax: +1333333647
Email: H.javanbakht@guilan.ac.ir.

Receive: April 5, 2025; Revise: November 8, 2025; Accept: December 6, 2025

10.22034/nfvm.2025.515051.1278

Abstract

Coccidian parasites (Apicomplexa: coccidia) are among the most common blood parasites reported in reptiles and amphibians. The Dactylosomatidae Jakowska and Negrelli, 1955 are one of four families belonging to adeleorinid coccidia and comprise the genera Babesiosoma Jakowska and Nigrelli, 1956 and Dactylosoma Labbé, 1894. These blood protozoa occur in the peripheral blood of lower vertebrates and are commonly reported parasitising amphibians. Talysh bufo (*Bufo eichwaldi*) is a large endemic amphibian distributed in the Hyrcanian forest in the north of Iran and the southeast of Azerbaijan. In this study, we investigated for the first time the prevalence and genetic identification of blood parasites of the genus *Dactylosoma* in 75 individuals of *B. eichwaldi* with a vulnerable conservation status from north of Iran. Blood parasite infection with *Dactylosoma* sp was detected in 26.66% of samples. Results of phylogenetic analysis by *18S rRNA* gene showed 100% identity with *Dactylosoma kermiti* and *D. ranarum*. Phylogenetic analysis showed the *Dactylosoma* of the present study formed a monophyletic group in *Dactylosoma* species, as a same species clustered with *Dactylosoma kermiti* from *Sclerophrys gutturalis* and as a sister group of *D. ranarum, Dactylosoma* sp, and *Babesiosoma stableri* (support > 80%). This is the first molecular characterization of a species of *Dactylosoma* from an Iranian Bufo.

Keywords: *Amphibia, Apicomplexa, Haemogregarine, Phylogenetic, Hyrcanian*