

بررسی آلودگی و آنالیز فیلوژنی سویه حلزون‌های آب شیرین ایرانی رادیسین در خاورمیانه و آسیای مرکزی

رامتین میرفندرسکی^۱، بهار شمشادی^{۱*}، سعید هاشمی^۲، سالومه شیر علی^۳

چکیده

خانواده حلزون‌های Lymnaeidae که در زیرراسته‌های Basommatophora و Pulmonata طبقه‌بندی می‌شوند، شامل برخی از مهم‌ترین گونه‌های حلزون‌های آب شیرین در جهان هستند. حلزون‌های Radicine به عنوان ناقل ترمانودها از اهمیت پزشکی و دامپزشکی قابل توجهی برخوردارند. این حلزون‌ها در دسته نرم‌تنان (Mollusca) و رده شکم‌پایان (Gastropoda) طبقه‌بندی و می‌توانند چندین ساعت در آب‌های کم‌عمق زندگی کنند. حلزون‌های رادیسین از اهمیت پزشکی و دامپزشکی قابل توجهی برخوردار هستند، زیرا ناقل ترمانودها، این گونه حلزون‌ها مسئول انتقال ترمانودهای مشترک بین انسان و دام از جمله *Fasciola gigantica* و *Schistosoma turkestanicum* در ایران هستند و به عنوان یک میزبان میانی، در نظر گرفته می‌شوند. با این حال، بحث بر سر وضعیت طبقه‌بندی واقعی حلزون باقی مانده است. خصوصیات مورفولوژیکی در تعیین این گروه، نقش زیادی داشته است، اما همچنان این روش منجر به شناسایی نادرست گونه‌ها، و تأثیر بر درک زیست‌شناسی جمعیت و در نهایت تأثیرگذاری بر شناسایی ناقلان شده است. بنابراین در این پژوهش سعی بر آن شده است که علاوه بر بررسی آلودگی سویه‌ها، با در نظر گرفتن گونه‌ها و محل نمونه‌برداری، به بارکد گذاری DNA با استفاده از آنالیز *cox1* و فیلوژنتیک، به عنوان یک روش شناسایی، پرداخته شود.

واژگان کلیدی: حلزون آب شیرین، فیلوژنی، بارکدینگ، آلودگی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۳

مقدمه

خانواده حلزون‌های Lymnaeidae که در زیرراسته‌های Basommatophora و Pulmonata طبقه‌بندی می‌شوند، شامل برخی از مهم‌ترین گونه‌های حلزون‌های آب شیرین

در جهان هستند (۱). از ویژگی‌های این حلزون‌ها می‌توان به هرمافروdit بودن با داشتن شاخک‌های مثلی گرد با بیشترین پراکندگی مانند *Lymnaea gedrosiana* و *Lymnaea truncatula* و کمترین مانند *Lymnaea rufescens* در ایران نام برد (۴-۲). این حلزون‌ها در گروه نرم‌تنان طبقه‌بندی شده و می‌توانند چندین ساعت در آب‌های کم‌عمق زندگی کنند. همچنین این حلزون‌ها می‌توانند از آب خارج شده تا روی گل‌های مجاور استراحت کنند و در ماه‌های خشک تابستان و همچنین دماهای یخبندان زنده بمانند (۴).

حلزون‌های رادیکس در خانواده حلزون‌های حوضچه‌ای بزرگ Lymnaeidae که یک گروه غنی گونه‌ای از حلزون‌های آب شیرین با اهمیت استثنایی پزشکی و دامپزشکی در سراسر جهان هستند را شامل می‌شوند. برای مثال، گونه‌های حلزون *Radix Monfort* و *Ampullaceana Servain* به عنوان ناقل ترمانودیازیس دارای اهمیت فراوانی از نظر بهداشت عمومی قابل توجهی در خاورمیانه به عنوان شیستوزومیازیس و ترمانودهای منتقله از غذا، در نظر گرفته می‌شوند. ایران شیوع بالایی از عفونت‌های شیستوزوما ترکستانیکوم را در گاو و گوسفند گزارش داده است که شیوع آن تنها در گاو بین ۳۰ تا ۶۹ درصد تخمین زده می‌شود (۵-۷). در طی عفونت با *S. turkestanicum*، گاو و گوسفند دچار لاغری، کم‌خونی و اسهال می‌شوند و عفونت نیز با کاهش نرخ رشد و سقط جنین همراه است.

۱. گروه پاتوبیولوژی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
bshemshadi@yahoo.com
۲. دپارتمان انگل شناسی، Bo.C دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی، واحد اهواز و علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

در این پژوهش به بررسی آلودگی سویه ها و بارکد گذاری DNA با استفاده از آنالیز COX1 و فیلوژنتیک، به عنوان یک روش شناسایی، پرداخته شده است.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه های حلزون

حلزون های رادیسین با استفاده از قاشق های فلزی توری یا با دست جمع آوری و بر اساس ریخت شناسی پوسته، در محل به عنوان *Radix (Lymnaea) gedrosiana* شناسایی شدند. سپس این حلزون ها در اتانول ۷۰ تا ۱۰۰ درصد نگهداری شده و برای شناسایی مولکولی و تجزیه و تحلیل تکاملی به آزمایشگاه بازگردانده شدند. شناسایی اولیه حلزون ها در محل صرفاً بر اساس ویژگی های ریخت شناسی انجام شد، اما نتایج آنالیز های مولکولی ژن COX1 نشان داد که نمونه های مورد بررسی در دو کلاسه مجزای فیلوژنتیکی متعلق به جنس های *Radix* و *Ampullaceana* قرار دارند. بنابراین استفاده از روش های مولکولی برای شناسایی دقیق تر گونه ها و اصلاح طبقه بندی اولیه ضروری به نظر می رسد.

بررسی لارو ترماتود در حلزون ها

روش های پتری دیش، انکوباسیون و سطح شیشه صاف برای بررسی لارو انجام شدند. در روش پتری دیش، حلزون ها به صورت جداگانه در یک پتری دیش شیشه ای (به قطر ۶ سانتی متر و ارتفاع ۲ سانتی متر) حاوی آب بدون کلر تحریک شدند تا با استفاده از تناوب نور، حلقه از آنها جدا شود. سپس، آب حاوی قندهای آزاد شده بررسی شد. در روش انکوباسیون، یک لوله آزمایش حاوی حلزون تا نیمه از آب پر شد و به مدت ۵ ساعت در معرض نور مستقیم قرار گرفت تا لاروهای ترماتود حذف شوند. همچنین، حلزون های خرد شده از نظر وجود لارو زیر دوربین دوچشمی بررسی شدند. تعداد حلزون های بررسی

در ایران، *S. turkestanicum* یکی از علل اصلی درماتیت سرکاریال انسانی است، یک پاسخ التهابی حاد به نفوذ cercariae به پوست، و به عنوان یک نگرانی بهداشت عمومی در ارتباط با کشاورزان برنج، کارگران کشاورزی و ماهیگیران، به ویژه در اطراف دریای خزر در نظر گرفته می شود (۶). با این حال، فاسیولیازیس احتمالاً مهمترین بیماری منتقله از طریق حلزون در ایران است که توسط فلوک های کبدی *Fasciola hepatica* و *Fasciola gigantica* ایجاد می شود (۸، ۹). تخمین زده می شود که بیش از ۲۰ میلیون فاسیولای انسانی وجود داشته باشد و سازمان بهداشت جهانی اخیراً ایران را در فهرست شش کشوری قرار داده است که به دلیل این بیماری دارای مشکل بهداشت عمومی قابل توجهی هستند (۷). انتقال و توزیع *S. turkestanicum* و *Fasciola* ارتباط نزدیکی با میزبان های میانی حلزون آنها دارد، بنابراین شناسایی دقیق این حلزون ها برای تمایز اپیدمیولوژی این گونه انگل ها و تمرکز کنترل در مناطق بومی ضعیف اهمیت زیادی دارد.

حلزون های آب شیرین دارای گونه های بسیار متنوعی در جهان هستند و ایران نیز از این قاعده مستثنی نیست (۱۰). اما بسیاری از جنبه های اکولوژیکی و بیولوژیکی گونه های بومی ایران ناشناخته مانده است. مطمئناً در دهه گذشته، رویکردهای فیلوژنتیک مولکولی برای حل روابط متقابل حلزون ها و شناسایی دقیق بین گونه ها را فراهم کرده است. برای مثال، اکثر تجزیه و تحلیل های فیلوژنتیکی رادیسین ها و سایر گاستروپودها، اساساً مبتنی بر استفاده از روش های بارکدینگ مولکولی با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندری زیر واحد ۱ (cox1) است که نه تنها قادر به تمایز بین گونه های واقعی است، بلکه بینش هایی را در مورد جمعیت جغرافیایی، فیلوژنی و فیلوژنی را نیز ارائه می دهد (۱۱، ۱۲). چنین رویکردهایی امکان شناسایی گونه های مرموز در جنس *Radix* را فراهم کرده است. بنابراین

شده با روش خرد کردن برای بررسی لاروهای ترماتود در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- تعداد حلزون‌های بررسی شده با روش خرد کردن برای بررسی لارو ترماتود

شهر	روستا ها	تعداد نمونه ها
بروجرد	سراب ضارم شیروان	۱۷
	چگانی کاش	۶
	چنارستان	۸
	شیخ میری	۱۰
	توده زان آرابان	۷۳
خرم آباد	ریگ سفید	۸
	ایوشان	۱۲
	طالقان	۱۰
	زاغه	۱۳
	گلدره	۹
دروود	حمیانه	۱۱
	زرگران	۹
	زان	۱۰
	تورشب	۸
	عزیزآباد	۷
		۴۵
کل		۱۷۰

آنالیزهای فیلوژنی

تحلیل‌های فیلوژنتیکی با استفاده از هر دو رویکرد حداکثر درستنمایی و استنتاج بیزی انجام شد. از هر دو مدل MEGA X (۱۳) و Modelfinder (۱۴) که در PhyloSuite (۱۵) پیاده‌سازی شده بودند، برای شناسایی مناسب‌ترین مدل جایگزینی نوکلئوتید استفاده شد و هر دو مدل HKY+G+I را مناسب‌ترین مدل برای بازسازی فیلوژنتیکی تشخیص دادند. فیلوژنی‌های حداکثر درستنمایی با استفاده از MEGA X ساخته شدند و پشتیبانی‌های گره‌ای بوت‌استرپ از ۱۰۰۰

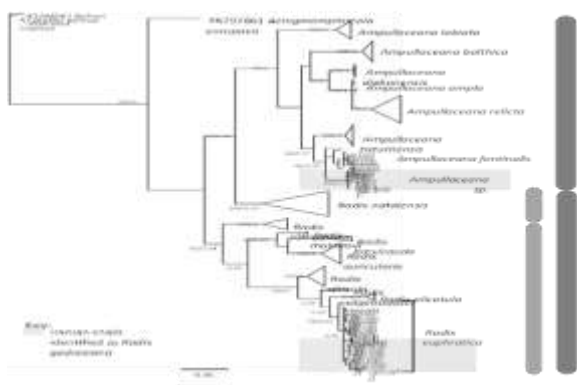
تکرار در طول بازسازی درخت محاسبه شدند. درخت‌های استنتاج بیزی با استفاده از Mr Bayes (۱۶) که در PhyloSuite پیاده‌سازی شده بودند، با طول زنجیره MCMC برابر با ۱۰۷ و پیش‌سوزاندن ۱۰۶ ساخته شدند و مقادیر گره‌ای پسین برای پشتیبانی از گره‌ها و کلادها محاسبه شدند. برای هر دو تجزیه و تحلیل، گونه‌های بولینوس به عنوان یک گروه بیرونی برای کمک به ریشه‌زایی درختان انتخاب شدند.

نتایج

آلودگی تهاجمی حلزون های Lymnaeidae با ترماتود

حلزون های خانواده Lymnaeidae به عنوان میزبان میانی در چرخه بیولوژیکی *Fasciola hepatica* عمل می کنند که باعث فاسیولوزیس، یک بیماری انگلی با اهمیت پزشکی برای انسان و حیوانات می شود. در بسیاری از مطالعات، آلودگی انگلی عمدتاً در سطح خانواده و جنس گزارش شده است و این تشخیص باید با استفاده از روش‌های دقیق‌تر به سطح گونه‌ای ارتقا یابد (۱۷). همانطور که گفته شد، حلزون های رادیسین دارای اهمیت زیادی در سطح جهانی هستند (۱۸). به این علت، مطالعاتی در بررسی آلودگی حلزون های Lymnaeidae به ترماتود بر اساس گونه و محل نمونه برداری در استان لرستان، ایران انجام شد. آلودگی Lymnaeidae به ترماتودها را با توجه به گونه‌ها بررسی شدند و محل نمونه برداری ۱۷۰۰ حلزون از حومه بروجرد، خرم آباد و دروود در لرستان جمع‌آوری شدند. حلزون های گرد جدا شدند و گونه های حلزون بر اساس اندازه گیری طول، عرض، مناره و دریچه با استفاده از شکل رادولا به عنوان کلید شناسایی، شناسایی شدند. نتایج مورفولوژیکی نشان داد که در دروود و بروجرد بیشترین پراکندگی *Lymnaea gedrosiana* با ۲۴/۰۹ درصد و ۱۹/۷۲ درصد و کمترین پراکندگی گونه *Bulinus*

با این حال، استثنا در اینجا این بود که *R. natalensis* ارتباط نزدیک‌تری با گونه‌های Ampullaceana داشت و یک تاکسون خواهر پارافلیتیک متمایز برای این جنس تشکیل داد. حلزون‌های ایرانی که در ابتدا بر اساس مورفولوژی پوسته به عنوان *Radix gedrosiana* توصیف می‌شدند، بین دو کلاد تقسیم شدند و توالی‌های *cox 1* حلزون‌های ۱ تا ۱۰ یک تاکسون خواهر با *Ampullaceana fontinalis* تشکیل دادند و بقیه توالی‌های حلزون منحصراً با سایر توالی‌های *Radix euphratica* خوشه‌بندی شدند. همچنین شایان ذکر است که *cox1* منتشر شده از گونه ایرانی *R. auricularia* (دسترسی: KT280421-26) نیز با سایر توالی‌های *R. euphratica* در یک خوشه قرار گرفت و از دودمان اصلی *R. auricularia* متمایز بود (شکل ۱). تجزیه و تحلیل نسبت $X\epsilon$ برای تمایز کلاد *A. fontinalis* از کلاد ایرانی Ampullaceana که در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی پدیدار شد، اعمال شد. نسبت $X\epsilon$ در واقع دو کلاد را به عنوان گونه‌های جداگانه با $k/\Theta=41.00507$ متمایز کرد، که بسیار بیشتر از حداقل ۴ برای تمایز بین گونه‌ها است. این تجزیه و تحلیل در سایر توالی‌های *cox1* حلزون استفاده نشد زیرا تجزیه و تحلیل آنها را به عنوان *R. euphratica* شناسایی کردند.



شکل ۱- آنالیزهای فیلوژنتیکی حلزون‌های شناسایی شده به عنوان *Radix gedrosiana* در ایران. که در آن آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از هر دو رویکرد حداکثر درستنمایی و بیزی تحت شرایط مدل HKY+G+I

truncatus به ترتیب ۴/۷۲ و ۴/۴۸ درصد بود. گونه‌های *Lymnaea* در روستاهای دشت بیشترین فراوانی را داشتند، در حالی که *Bithynia* و *Physa* بیشتر در روستاهای کوهستانی دیده می‌شدند. در خرم‌آباد بیشترین پراکندگی مربوط به *Lymnaea truncatula* (۲۰/۱۵ درصد) و کمترین آن مربوط به *Lymnaea stagnalis* (۵/۵۶ درصد) بوده است. جنس‌های *Bithynia* و *Physa* در روستاهای کوهستانی خرم‌آباد نسبت به بروجرد و دورود افزایش چشمگیری نشان داد. میزان کل آلودگی حلزون Lymneidae با ترماتود ۳۲/۹۴ درصد بوده که شامل ۱۸/۲۳ درصد نمونه‌ها در بروجرد، ۸/۲۳ درصد در دورود و ۶/۴۷ درصد در خرم‌آباد بود. به طور کل نتایج نشان داد که منطقه بروجرد بیشترین و خرم‌آباد کمترین میزان ابتلا را داشته است.

بررسی فیلوژنی حلزون‌های رادیسین

هر دو تحلیل فیلوژنتیکی ML و BI به طور گسترده توالی‌های حلزون Radicine را به دو کلاد مجزای کاملاً پشتیبانی‌شده (مقادیر بوت‌استرپ گره‌ای ۵۰، احتمالات خلفی گره‌ای ۰/۷) تفکیک کردند، که یک کلاد از اعضای جنس Ampullaceana تشکیل شده و دومی کلاد دیگری است که توسط اعضای جنس *Radix* تشکیل شده است (شکل ۱). (Accession: MW430994 - MW431008. ۱- *cox1*)

۲- (توالی‌های حلزون Radicine) MW435323 - MW435331

انجام شد. کلادهای گونه‌های قابل مقایسه فروپاشیده و شامل بیش از ۱۰ توالی نیستند. مقادیر پشتیبانی گره‌ای به ترتیب به صورت پشتیبانی‌های بوت‌استرپ ۵۰ و احتمالات پسین ۰/۷ ارائه شده‌اند.

گونه *Radix euphratica* ایرانی و روابط متقابل آن با جدایه‌های آن از سراسر آسیا

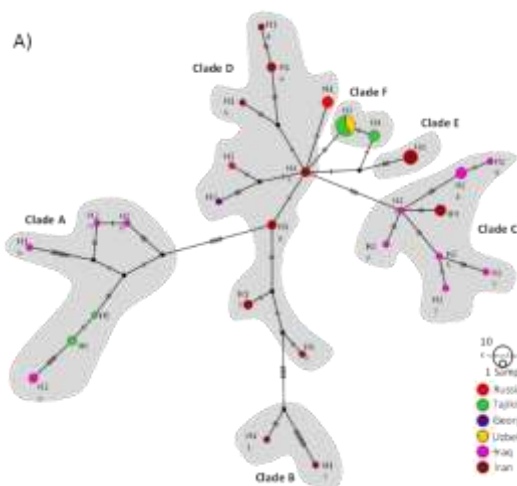
تجزیه و تحلیل ژنتیکی جمعیت جدایه‌های مختلف *R. euphratica* نشان داد که سطوح بالایی از تنوع هاپلوتیپی در سراسر روسیه، تاجیکستان، عراق و ایران وجود دارد و بالاترین سطح تنوع نوکلئوتیدی در نمونه‌های ایران و عراق مشاهده شده است (جدول ۲). جالب توجه است که تنها یک هاپلوتیپ در مجموعه داده های توالی منتشر شده ازبکستان یافت شد که به نظر می‌رسد هیچ تنوع ژنتیکی بین آنها وجود ندارد، برخلاف مجموعه داده‌های عراق که به نظر می‌رسد بیشترین تنوع را داشته باشد ($Hd: 0.956$; $\pi: 0.1935$) (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه و تحلیل ژنتیکی جمعیت بین کشوری *Radix euphratica* که در آن S: تعداد جایگاه‌های تفکیک؛ h: تعداد هاپلوتیپ‌ها؛ Hd: تنوع هاپلوتیپی؛ π : تنوع نوکلئوتیدی؛ K: میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی.

کشور	تعداد توالی	S	h	Hd	π	K
روسیه	۴	۳	۲	۰/۵	۰/۰۰۲۶۴	۱/۵
تاجیکستان	۱۲	۱۲	۴	۰/۷۱۲	۰/۰۰۸۴۴	۴/۸
ازبکستان	۴	۰	۱	۰	۰	۰
ایران	۲۱	۲۹	۱۱	۰/۹۱۹	۰/۰۱۳۲۶	۷/۵۴۲
عراق	۱۴	۳۵	۱۱	۰/۹۵۶	۰/۰۱۹۳۵	۱۱/۰۱۰
کل	۵۵	۵۶	۲۸	۰/۹۵۱	۰/۰۱۵۲۱	۸/۶۵۵۲

شبکه‌های هاپلوتیپی بسیار مختصری برای ارائه یک دیدگاه تبارشناختی از روابط بین جدایه‌های *R. euphratica*

ساخته شدند و نشان دادند که هیچ دودمان جغرافیایی خاصی وجود ندارد. شش کلاد (کلاد A تا F) پدیدار شدند که به نظر می‌رسید همه آنها، به جز کلاد F، هاپلوتیپ‌های مربوط به هاپلوتیپ‌های ایران یا عراق را دارند (شکل ۲). کلاد F حاوی هاپلوتیپ ۳ (H3) بود که تنها هاپلوتیپ مشترک بین کشورهای ازبکستان و تاجیکستان را نشان می‌داد. برای بررسی واگرایی ژنتیکی بین جدایه‌های جغرافیایی، آزمون مانل همبستگی مثبت بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی را برجسته کرد. با این حال، این آزمون نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی وجود ندارد ($R^2 = 0.0454$, $P > 0.01$, $P = 0.554$) (شکل ۲). ضریب همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن و آزمون جداسازی بر اساس فاصله نیز در اینجا نشان داد که هیچ رابطه معنی‌داری بین فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی وجود ندارد (مقدار P یک طرفه < 0.01 , $P = 0.108$).



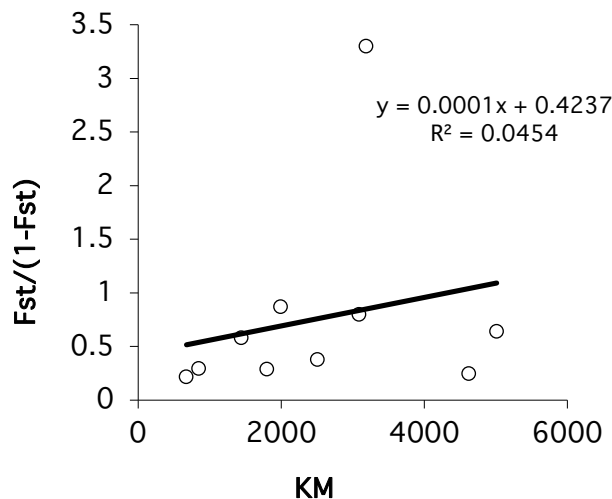
شکل ۲- روابط متقابل بین جدایه‌های جغرافیایی *R. euphratica* از آسیای مرکزی. که در آن A نشان دهنده شبکه‌ی هاپلوتیپی باصرفه‌ترین ویژگی است که نشان‌دهنده وجود شش کلاد مجزا از هاپلوتیپ‌ها است، اما هیچ دودمان جغرافیایی خاصی وجود ندارد که نشان‌دهنده اشتراک هاپلوتیپ‌ها بین کشورهای مختلف باشد. (B)

جغرافیایی، فیلوژنی و فیلوژنی را نیز ارائه می‌دهد (۱۱)، (۱۲). چنین رویکردهایی امکان شناسایی گونه‌های مرموز در جنس *Radix* را فراهم کرده است. بنابراین در این پژوهش به بررسی آلودگی سویه‌ها و بارکد گذاری DNA با استفاده از آنالیز *cox1* و فیلوژنتیک، به عنوان یک روش شناسایی، پرداخته شده است.

تنوع و پراکندگی جغرافیایی خانواده لیمنه‌آ در استان آذربایجان غربی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. در این تحقیق، حدود ۳۷۴۱ حلزون لیمنه‌آ زنده از سه منطقه شمال، مرکز و جنوب استان آذربایجان غربی ایران جمع‌آوری و شناسایی شدند. طبق یافته‌های این مطالعه، حلزون‌های لیمنه‌آ در زیستگاه‌هایی با دامنه دمایی ۱۵ تا ۳۴ درجه سانتیگراد در کوه‌ها و دشت‌های آذربایجان غربی ایران زندگی می‌کنند. گونه‌های *L. auricularia*، *L. truncatula* و *L. palustris* در خاک‌هایی با pH اسیدی تا کمی قلیایی زندگی می‌کنند، در حالی که گونه‌های *L. gedrosiana* و *L. stagnalis* در خاک‌هایی با pH قلیایی ثبت شده‌اند.

مطالعه دیگری به بررسی فراوانی حلزون‌های *Lymnaea* در استان لرستان پرداخت. در این مطالعه ۱۷۰۰ حلزون در حومه خرم‌آباد جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده با توجه به برخی کلیدهای شناسایی از جمله طول، عرض و مارپیچ حلزون‌ها و همچنین چرخش صدف‌ها در جهت و طول اندام تناسلی مردانه شناسایی شدند. تنوع گونه‌ای حلزون‌های راست گرد از خانواده *Lymnaea*، ایده در استان شامل *Lymnaea gedrosiana* ۳۲/۰۸ درصد، *Lymnaea auricularia* ۱۵/۲۵ درصد، *Lymnaea truncatula* ۶/۲۵ درصد و *Lymnaea stagnalis* ۰/۳ درصد بود (۱۹). منصوریان (۲۰۰۰) وجود *L. L. Gedrosiana*، *L. palustris* و *L. pregra. truncatula* را از استان کرمانشاه گزارش کرد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که ۸ درصد

نمایش گرافیکی آزمون مانتل برای جداسازی بر اساس فاصله که نشان‌دهنده عدم همبستگی آماری ($P > 0.05$) با فاصله ژنتیکی $F_{st}/(1-F_{st})$ و فاصله جغرافیایی (KM) بین جمعیت‌ها است



شکل ۳_ نمایش گرافیکی آزمون مانتل برای جداسازی بر اساس فاصله که نشان‌دهنده عدم همبستگی آماری ($P > 0.05$) با فاصله ژنتیکی $F_{st}/(1-F_{st})$ و فاصله جغرافیایی (KM) بین جمعیت‌ها است.

بحث

حلزون‌های خانواده *Lymnaea* به عنوان میزبان واسط در چرخه‌ی بیولوژیکی فاسیولا هپاتیکا عمل می‌کنند که باعث فاسیولوزیس، یک بیماری انگلی با اهمیت پزشکی برای انسان و حیوانات می‌شود. در بسیاری از مطالعات، آلودگی‌های انگلی عمدتاً در سطح خانواده و جنس گزارش شده‌اند و این تشخیص باید با استفاده از روش‌های دقیق‌تر به سطح گونه ارتقا یابد (۱۷). حلزون‌های رادیسین از خانواده‌ی حلزون‌های برکه‌ی بزرگ لیمنایده، حلزون‌های آب شیرین با اهمیت پزشکی و دامپزشکی استثنایی در سطح جهان هستند (۱۸). همچنین، استفاده از روش‌های بارکدینگ مولکولی با استفاده از ژن سیتوکروم اکسیداز میتوکندری زیر واحد ۱ (*cox1*) نه تنها قادر به تمایز بین گونه‌های واقعی است، بلکه بینش‌هایی را در مورد جمعیت

حلزون‌ها به لارو ترماتود آلوده بودند (۱۸). نورپیشه و همکاران (۲۰۱۹) میزان آلودگی *L.gedrosiana* به لاروهای ترماتود را در آبراهه‌های استان خوزستان بررسی کردند. در این مطالعه، ۶۲۱۳ حلزون مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج نهایی نشان داد که ۱۰۷ حلزون (۵ درصد) آلوده به لارو ترماتود بودند مطالعه دیگری پراکندگی جغرافیایی وسیع تری از گونه‌های مختلف *Lymnaea* را در برخی مناطق ایران مشخص کرد. نشان دهنده وجود گونه‌های *L.gedrosiana*، *L. truncatula*، *L. Auricularia* و *L. stagnalis* در جنوب خوزستان و در استان اصفهان گونه‌های *L.gedrosiana*، *L. truncatula* و *L. palostris* غالب بودند. این مطالعه همچنین نشان داد که استان چهارمحال و بختیاری زیستگاه طبیعی حلزون *L.gedrosiana*، *L. truncatula* و *L. stagnalis* است.

بیشتر تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی رادیسین‌ها و سایر شکم‌پایان عمدتاً مبتنی بر استفاده از رویکردهای بارکدگذاری مولکولی با استفاده از ژن زیر واحد ۱ سیتوکروم اکسیداز میتوکندریایی (cox1) بوده است که نه تنها به دلیل سرعت بالای تکامل، قادر به تمایز بین گونه‌های واقعی است، بلکه دیدگاه‌های فیلوجغرافیایی بین جمعیت‌های حلزون را نیز ارائه می‌دهد (۱۹). چنین رویکردهایی امکان شناسایی گونه‌های مرموز را قطعاً در جنس *Radix* فراهم کرده‌اند.

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک مولکولی حلزون‌های رادیسین ایرانی در واقع دو گونه مجزا را شناسایی کرد که تمایز آنها بر اساس مورفولوژی پوسته چالش برانگیز بود و در ابتدا به عنوان *R. gedrosiana* توصیف شده بودند. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک cox1، حلزون‌ها را به دو گونه *R. euphratica* و گونه‌ای در جنس *Ampullacena* که هنوز در ایران توصیف نشده است، تقسیم کرد. گونه *Ampullacena* ایرانی به عنوان یک

تاکسون خواهری برای *A. fontinalis*، حلزونی که در سراسر روسیه اروپایی، اروپای شرقی و مرکزی و ترکیه یافت می‌شود، ظاهر شد (۱۱).

حلزون‌های رادیسین به دلیل داشتن ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آناتومیکی مشترک، به دلیل اشتراک زیستگاه و همپوشانی جایگاه‌ها در محیط‌های خاص، به طور چشمگیری در تشخیص تفاوت‌های ریخت‌شناسی و آناتومیکی گونه‌های مختلف، با چالش‌هایی مواجه هستند.

Glöer و Pešić (۲۰۱۲) دقیق‌ترین گزارش از حلزون‌های رادیسین در ایران را ارائه دادند و تأکید کردند که صفات مورفولوژیکی همیشه برای تمایز بین گونه‌ها نیستند، بلکه نشان دادند که یکی از گونه‌هایی که از نظر مورفولوژیکی بیشترین تغییر را دارد، در واقع *Radix bactriana* است. بسته به اینکه کدام جمعیت‌ها نمونه‌برداری شده‌اند، به نظر می‌رسد که *R. bactriana* ویژگی‌های مشترکی با *Ampullaceana labiata* و *R. euphratica* دارد که از نظر تاریخی به *R. persica* اشاره دارند. می‌توان حدس زد که گونه *Ampullaceana* شناسایی شده در این مطالعه فعلی ممکن است نمایانگر جمعیتی از *R. bactriana* باشد که در ابتدا به دلیل شباهتش به *R. euphratica* در این مطالعه با عنوان *R. gedrosiana* شناخته می‌شد (۲۰). اگر واقعاً چنین باشد، مسلماً گونه حلزون باید *Ampullaceana bactriana* نامیده شود و اولین مجموعه توالی‌های بارکد DNA مرجع برای این گونه را نشان می‌دهد. با این حال، در حال حاضر نویسندگان موافقند که تنها از طریق نمونه‌برداری بیشتر از سراسر ایران، بررسی نمونه‌های مرجع و تجزیه و تحلیل‌های یکپارچه با استفاده از رویکردهای مورفولوژیکی و مولکولی، هویت واقعی *Ampullaceana* ایرانی تأیید خواهد شد. به طور مشابه، شناسایی *R. euphratica* ایرانی نیز چالش شناسایی حلزون‌ها در جنس *Radix* را برجسته کرد. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی، *R. auricularia* را از

هرمافرودیت مانند *Biomphalaria pfeifferi* و *Lymnaea stagnalis* مشاهده می‌شود (۲۲).

با این حال، چنین جمعیت‌هایی از حلزون‌ها تمایل به ناپایداری دارند و همگی شواهدی از رویدادهای گسترش سریع را نشان می‌دهند که در تجزیه و تحلیل‌های *cox1* مربوط به *R. euphratica* مشاهده نمی‌شود. این شواهد می‌تواند نشان دهد که *R. euphratica* به سادگی جمعیت وسیعی دارد که مهاجرت مداوم ژنوتیپ‌ها بین آنها، ارتباط بین محل‌ها را حفظ می‌کند. احتمالاً بخشی از پراکندگی توسط حرکت پرندگان انجام می‌شود، همانطور که بسیاری از پرندگان آبری مهاجر از مناطق شمالی آسیا در طول زمستان در خاورمیانه این کار را انجام می‌دهند و در مسیر خود در مکان‌هایی مانند ازبکستان و تاجیکستان توقف می‌کنند. با این حال، این موضوع به وضوح مستلزم تحقیقات بیشتر فراتر از این مطالعه فعلی است (۲۳).

تجزیه و تحلیل درخت زمانی، رویداد واگرایی اواخر میوسن بین *R. euphratica* و *Radix plicatula* را تقریباً در ۵,۵ میلیون سال پیش نشان داد، و تمام هاپلوتیپ‌های موجود *R. euphratica* جد مشترکی در اواسط پلیوسن حدود ۳,۳ میلیون سال پیش داشتند. به نظر می‌رسد تمام هاپلوتیپ‌های فعلی در ۲ میلیون سال گذشته و در دوران پلیستوسن پدیدار شده‌اند و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که *R. euphratica* در واقع منشأ خاورمیانه‌ای دارد. این امر با ماهیت پایه‌ای کلاد A، که عمدتاً از توالی‌های *cox1* از عراق تشکیل شده است، و تمام کلادهای دیگر به استثنای کلاد F که حاوی هاپلوتیپ‌هایی از هر دو یا یکی از ایران یا عراق است، مشهود است. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که بر اساس تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی، رویدادهای متعدد حرکت *R. euphratica* از خاورمیانه و استقرار در آسیای مرکزی و شمالی رخ داده است. همچنین می‌توان استدلال کرد که

R. euphratica به دو کلاد مجزا جدا کرد. با این حال، داده‌های توالی *cox1* که قبلاً منتشر شده و گفته می‌شود *R. auricularia* را نشان می‌دهند، در واقع در *R. euphratica* قرار گرفته‌اند که نشان می‌دهد این حلزون‌ها در ابتدا بر اساس مورفولوژی خود به اشتباه شناسایی شده‌اند.

همچنین، به نظر می‌رسد که این موضوع در مورد مطالعه Ashrafi و Mas-Coma (۲۰۱۴) نیز صدق می‌کند. در این مطالعه، حلزون‌هایی که در ابتدا با نام *R. gedrosiana* شناسایی شده بودند، از نظر مولکولی با نام *R. auricularia* مشخص شدند. از آنجایی که *R. gedrosiana* و *R. iranica* با *R. euphratica* مترادف شده‌اند، Ashrafi و Mas-Coma (۲۰۱۴) چالش‌های تشخیص نه تنها *R. auricularia* و *R. euphratica*، بلکه گونه‌های *Radix* را به طور گسترده‌تر نیز نشان می‌دهند. اگرچه این مطالعه فعلی شروع به آشکار کردن روابط طبقه‌بندی بین حلزون‌های *Radicine* ایرانی می‌کند، نویسندگان این مطالعه فعلی موافقت که ویژگی‌های تشخیصی و تکنیک‌های مولکولی بیشتر برای بررسی وضعیت طبقه‌بندی این حلزون‌ها، به ویژه برای شناسایی دقیق ناقلین ترماتود، مورد نیاز است (۲۱). روی هم رفته، شواهد نشان دهنده جریان ژنی مداوم و عدم تمایز ژنتیکی بین کشورهای مختلف در خاورمیانه و آسیای علی‌رغم تحرک فعال پایین است.

Gu و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای که در حلزون آب شیرین *Bellamya purificata* از سراسر چین انجام شد نشان دادند و اظهار داشتند که چنین سطوحی از تنوع پایین می‌تواند نشان‌دهنده پراکندگی ناشی از سیلاب‌های ناگهانی، انتقال تصادفی توسط پرندگان آبری و توزیع بالقوه انسانی باشد. همچنین استدلال شده است که سطوح پایین تنوع ژنتیکی را می‌توان به نرخ بالای خودلقاحی نسبت داد، همانطور که در سایر گونه‌های حلزون آب شیرین

ترماتودهای مشترک بین انسان و دام شناخته شده است، با این حال، در مورد وضعیت طبقه‌بندی واقعی آن اختلاف نظر وجود دارد. تکنیک‌های طبقه‌بندی مولکولی برای شناسایی دقیق ناقلین بیماری به منظور کمک به تمرکز منابع کنترل و نظارت بر بیماری حیاتی هستند. با توجه به کمبود مطالعات متمرکز بر میزبان‌های واسطه حلزون ترماتود، به ویژه در ایران و سایر نقاط خاورمیانه، شناسایی حلزون‌های رادیسین هنوز مبهم است و در نتیجه درک ما از پراکندگی واقعی چنین گونه‌هایی و انگل‌هایی که منتقل می‌کنند نیز ضعیف است. به طور کلی در این پژوهش به مرور کلی در ارتباط با تکنیک‌های بارکدگذاری مولکولی حلزون آب شیرین و آلودگی تهاجمی آن پرداخته شده است.

فهرست منابع

1. Mas-Coma S, Funatsu I, Bargues M. Fasciola hepatica and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*. 2001;123(7):115-27.
2. Imani-Baran A, Yakhchali M, Malekzadeh-Viayeh R, Farahnak A. Seasonal and geographic distribution of cercarial infection in *Lymnaea gedrosiana* (Pulmonata: Lymnaeidae) in north west Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2013;8(3):423.
3. Malekzadeh-Viayeh R, Imani Baran A, Yakhchali M. Molecular detection of the infection with *Fasciola hepatica* in field-collected snails of *Galba truncatula* and *Lymnaea stagnalis* from West Azarbaijan, Iran. *Archives of Razi Institute*. 2015;70(3):195-202.
4. Kemenes G, Benjamin PR. *Lymnaea*. *Current Biology*. 2009;19(1):R9-R11.
5. Tabaripour R, Youssefi MR, Tabaripour R. Genetic identification of *Orientobilharzia turkestanicum* from sheep isolates in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2015;10(1):62.

بسیاری از هاپلوتیپ‌های اجدادی که باعث ایجاد ژنوتیپ‌های جدید در کشورهای دیگر می‌شوند، در واقع در خاورمیانه به وجود آمده و سپس در جای دیگری تثبیت شده‌اند، چالش این است که مکانیسمی را که این پراکندگی از طریق آن رخ داده است، روشن کنیم. در خاورمیانه در طول دوره پلیستوسن، سیلاب‌های عظیم در طول رویدادهای یخبندان چرخه‌ای رخ داده‌اند با این حال، این گونه‌ها باید آنقدر گسترده می‌بودند که بخش عمده‌ای از ایران، عراق، ترکمنستان، ازبکستان و تاجیکستان را به طور همزمان پوشش می‌دادند، که با توجه به شرایط اقلیمی ایران بعید است. محتمل‌تر این است که ژنوتیپ‌های *R. euphratica* در خاورمیانه پدیدار شده و سپس اخیراً در نتیجه حرکت پرندگان مهاجر و جابجایی ناشی از فعالیت‌های انسانی، همانطور که در سایر گونه‌های حلزون مانند حلزون بسیار مهاجم *Physa acuta* دیده شده است، منتقل شده‌اند (۲۴).

اگرچه نویسندگان موافقت می‌کنند که برای درک منشأ *R. euphratica* نمونه‌برداری گسترده‌تری از سراسر خاورمیانه و آسیای مرکزی مورد نیاز است، اما جالب‌ترین نتیجه این است که به نظر می‌رسد این گونه حلزون از ایران و عراق سرچشمه گرفته و برای مدت زمان قابل توجهی در آنجا باقی مانده است. مطالعات تکاملی روی *S. turkestanicum* نشان می‌دهد که این گونه بین ۱۰۰۰۰۰ تا ۲۷۰۰۰۰ سال پیش و *Fasciola gigantica* حدود ۹۰۰۰ سال پیش در ایران ظاهر شده‌اند (۲۴).

در خاورمیانه، حلزون‌های رادیسین که از نظر پزشکی و دامپزشکی اهمیت قابل توجهی دارند، به عنوان ناقل ترماتودها عمل می‌کنند. در ایران، چنین حلزون‌هایی مسئول انتقال ترماتودهای مشترک بین انسان و دام، شیستوزوما ترکستانیکوم و فاسیولا ژینگانتیکا، هستند. از نظر تاریخی، رادیکس گدروزیانا به عنوان میزبان واسطه مهمی برای

- streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Molecular ecology resources*. 2020;20(1):348-55.
16. Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*. 2012;61(3):539-42.
17. Jackiewicz M. European species of the family Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata: Basommatophora). *Genus*. 1998;9(1):1-93.
18. Karimi GR, Derakhshanfar M, Peykari H. Population density, trematodal infection and ecology of Lymnaea snails in Shadegan, Iran. 2004.
19. Karimi G, Abdigoudarzi M, Parvaneh J, Rivaz S. Population density of Lymnaeidae snails in Lorestan province (Iran). *Veterinary Research & Biological Products*. 2016;29(1):60-5.
20. Glöer P, Pešić V. The freshwater snails (Gastropoda) of Iran, with descriptions of two new genera and eight new species. *ZooKeys*. 2012(219):11.
21. Mirfendereski R, Hashemi S, Shirali S, Shemshadi B, Lawton SP. DNA barcoding of Iranian radicine freshwater snails begins to untangle the taxonomy and phylogeography of intermediate hosts of schistosomiasis and fasciolosis from the Middle East and across Central Asia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021;89:104728.
22. Coutellec M-A, Besnard A-L, Caquet T. Population genetics of Lymnaea stagnalis experimentally exposed to cocktails of pesticides. *Ecotoxicology*. 2013;22(5):879-88.
23. Green AJ, Figuerola J. Recent advances in the study of long- distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. *Diversity and Distributions*. 2005;11(2):149-56.
24. Wethington AR, Jackson CR, Albritton C. Assessing predator risk: how leeches affect life history and behaviour of the freshwater snail Physa acuta. *Journal of Molluscan Studies*. 2018;84(4):379-85.
6. Wang C, Chen J, Zhao J, Chen A, Zhai Y, Li L, et al. Orientobilharzia species: neglected parasitic zoonotic agents. *Acta tropica*. 2009;109(3):171-5.
7. Dodangeh S, Daryani A, Sharif M, Gholami S, Kialashaki E, Moosazadeh M, et al. Freshwater snails as the intermediate host of trematodes in Iran: a systematic review. *Epidemiology and Health*. 2019;41:e2019001.
8. Akhlaghi E, Mohammadi MA, Ziaali N, Baneshi MR, Nasibi S, Kamyabi H, et al. Morphometric and molecular study of Fasciola isolates from ruminants in Iran. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*. 2017;41(4):192.
9. Ashrafi K, Mas-Coma S. Fasciola gigantica transmission in the zoonotic fascioliasis endemic lowlands of Guilan, Iran: experimental assessment. *Veterinary parasitology*. 2014;205(1-2):96-106.
10. Dodangeh S, Daryani A, Sharif M, Gholami S, Kialashaki E, Moosazadeh M, et al. Freshwater snails as the intermediate host of trematodes in Iran: a systematic review. *Epidemiology and Health*. 2019;41.
11. Aksenova OV, Bolotov IN, Gofarov MY, Kondakov AV, Vinarski MV, Bepalaya YV, et al. Species richness, molecular taxonomy and biogeography of the radicine pond snails (Gastropoda: Lymnaeidae) in the Old World. *Scientific reports*. 2018;8(1):11199.
12. Lawton SP, Lim RM, Dukes JP, Kett SM, Cook RT, Walker AJ, et al. Unravelling the riddle of Radix: DNA barcoding for species identification of freshwater snail intermediate hosts of zoonotic digeneans and estimating their inter-population evolutionary relationships. *Infection, genetics and evolution*. 2015;35:63-74.
13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 2018;35(6):1547-9.
14. Kalyanamoorthy S, Minh BQ, Wong TK, Von Haeseler A, Jermini LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature methods*. 2017;14(6):587-9.
15. Zhang D, Gao F, Jakovlić I, Zou H, Zhang J, Li WX, et al. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for

