مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۲، ۱۳۳-۱۲۷

Original Article

Journal of Veterinary Research. 68,2:127-133, 2013

تنوع ژنتیکی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه از قزل‌آلاهای رنگین کمان تلف شده در ایران

علی طاهری میرقائد مهدی سلطانی * حسینعلی ابراهیم زاده موسوی سمیرا محمدیان

گروه بهداشت و بیماری آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۹ آبان ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی: ۹ بهمن ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: لاکتوکوکوس گارویه یکی از عوامل اصلی بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در مزارع ماهیان به‌ویژه ماهی قزل‌آلا می‌باشد که هرساله خسارات زیادی را موجب می‌شود. **هدف:** در این مطالعه تنوع ژنتیکی تعداد ۴۴ جدایه لاکتوکوکوس گارویه‌بدست‌آمده از تلفات مزارع قزل‌آلای رنگین‌کمان در برخی استان‌های کشور به‌روش RAPD مورد مطالعه قرار گرفته است. **روش کار:** پس ازکشت از بافت کلیه ماهیان مرضی و جداسازی کوکسی‌های گرم مثبت روی ژلوز خون، با استفاده از روش PCR (تولید باند ۱۱۰۰bp) تائید تشخیص شدند. **نتایج:** در مطالعات RAPD و بااستفاده ازشش پرایمر انتخابی (P1-P6). نتایج حاصله نشان داد که تنها پرایمر P4 قادر به تولید حداکثر (۵باند) بود. با استفاده از این پرایمر چهار الگوی باندی شامل ۱۳۳۰bp-۵۶۰ با تعداد ۵ باند، ۱۲۶۰bp-۵۶۰ با تعداد ۵ باند، ۱۲۶۰bp-۵۶۰ با تعداد ۴ باند و ۱۲۰۰bp-۵۶۰ با تعداد ۵ باند تولیدشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج ترسیم درخت فیلوژنی محصول RAPD با استفاده از UPGMA موجب تفکیک این جدایه‌ها در ۳ کلاستر و در چهار گروه ژنتیکی شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که گرچه مشابهت‌هایی بین جدایه‌های منطقه شمالی کشور با منطقه جنوبی کشور وجود دارد ولی جدایه‌های این دو منطقه با همدیگر دارای تفاوت‌های ژنتیکی نیز هستند که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه عامل تلفات مزارع قزل‌آلا در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوکوکوس گارویه، استرپتوکوکوزیس، PCR، RAPD، تنوع ژنتیکی

مقدمه

لاکتوکوس گارویه یکی از عوامل مولد بیماری استرپتوکوکوزیس / لاکتوکوکوزیس در صنعت آبزی پروری و در گونه‌های متعددی از ماهیان آبهای شور و شیرین و نیز ماهیان سرد آبی و گرمابی در مناطق مختلف دنیا می باشد(۲)، تیلاپیا و گیش دم زرد از جمله حساس ترین گونه‌ها به این بیماری هستند به‌طوری که هر ساله خسارات زیادی را وارد می سازد. در ایران نیز این بیماری تاکنون خسارات فراوانی وارد نموده است و مطالعات به‌عمل آمده بیانگر انتشار بیماری در بسیاری از مزارع قزل‌آلای کشور می‌باشد (۸،۹). این بیماری که یکی از بیماری‌های مشترک انسان و ماهی است، بیشترین مشکلات را در ایام گرم سال (فصل بهار و تابستان) وارد می‌نماید. به علت تنوع منابع و مخازن باکتری درگیر از جمله جانوران خونگرم توجه به تنوع ژنتیکی جدایه‌های درگیر برای ارتقاء اطلاعات اپیدمیولوژیک بیماری و بویژه اتخاذ روش‌های پیشگیری از اهمیت خاصی برخوردار است. مطالعاتی پیرامون مقایسه تنوع ژنتیکی برخی جدایه‌های بدست آمده از تعدادی کشورها نظیر ژاپن، استرالیا، تایوان، اسپانیا و انگلیس بیانگر تنوع جدایه‌های درگیر در بروز بیماری است (۳،۶). در ایران علی رغم مطالعات مولکولی برای شناسایی مزارع و مناطق آلوده (۸،۹) هنوز اطلاعاتی پیرامون تنوع ژنتیکی جدایه‌های درگیر در بروز بیماری در مناطق مختلف کشور وجود ندارد. اهمیت این نوع مطالعات به‌ویژه از دیدگاه مباحث همه‌گیری شناسی و پیشگیری از بیماری قابل توجه است به خصوص در کشورهایی مانند ایران که سرزمینی بزرگ و از تنوع زیستی بالایی در ارتباط با منابع آبی برخوردار است. در میان روش‌های مولکولی برای مطالعات تنوع ژنتیکی، روش RAPD اگرچه روشی با تفریق پذیری بالا و تکرار پایین است اما یکی از روش‌های قابل دسترس می‌باشد، که بر اساس آن و با استفاده از پرایمرهای انتخابی می‌توان باندهای پلی مورفیسم DNA میکروارگانیسم‌ها را شناسایی کرد (۱۲).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه در بروز بیماری از تعدادی استان‌های کشور و نیز بررسی تنوع ژنتیکی آنها به روش RAPD می‌باشد. نتایج حاصل به ارتقاء کارآیی واکسن تولید داخل و در نتیجه پیشگیری موثر از بروز بیماری و خسارات وارده کمک خواهد نمود.

مواد و روش کار

جدایه‌های باکتری و استخراج DNA: ۵۰ جدایه‌های باکتری مورد استفاده، از برخی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تعدادی از استان‌های کشور شامل تهران، کهگیلویه و بویر احمد، لرستان، چهار محال و بختیاری و مازندران در تابستان ۱۳۸۹ به دست آمد. این جدایه‌ها با کشت از بافت کلیه ماهیان بیمار روی محیط ژلوز خون دار در ۲۵°C به مدت ۷۲

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۱۳۱۰۴-۰۲۱ نمابر: ۶۱۱۱۷۰۹۴-۰۲۱ Email: msoltani@ut.ac.ir

ساعت و سپس جمع آوری پرگنه‌ها برای استخراج DNA به دست آمدند. قبل از استخراج DNA ابتدا از پرگنه‌های رشد یافته رنگ آمیزی گرم انجام گرفت و کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی مورد استفاده قرار گرفتند. برای استخراج DNA جدایه‌ها، از کیت DNA Extraction Kit Biospin Bacteria Genomic (Bioflux ژاپن) استفاده شد.

PCR برای شناسایی جدایه‌های لاکتوکوکس گارویه: برای شناسایی جدایه‌های لاکتوکوکس گارویه از روش توصیه شده توسط Zlotkin و همکاران در سال ۱۹۹۸ با اندکی تغییرات استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

این پرایمرها ناحیه ژن 16S rRNA باکتری لاکتوکوکوس گارویه را بطور اختصاصی شناسایی و تولید باند ۱۱۰۰bp می‌نماید. پس از استخراج DNA از ۵۰ جدایه مورد مطالعه و بررسی وضعیت کمیت و کیفیت آنها با انجام الکتروفورز و استفاده از ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفوتومتری، واکنش PCR به میزان ۲۵µL مخلوط PCR شامل ۲/۵µL بافر (۱۰X) PCR (Fermentas، لیتوانی)، ۱/۵U آنزیم Dream Taq Polymerase (Fermentas، لیتوانی)، هریک از پرایمرها به میزان ۳۰pmol، مخلوط dNTPs (۱۰mM) به میزان ۰/۳µL (Fermentas، لیتوانی) و DNA استخراج شده از جدایه‌های موردنظر به میزان ۱۰۰ng و رساندن حجم نهایی مخلوط به ۲۵µL توسط آب مقطر به منظور تکثیر قطعه ژن مورد نظر انجام گرفت. برنامه PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad،USA) نیز به ترتیب شامل ۳ دقیقه در ۹۴°C (واسرشته سازی اولیه)، ۳۵ سیکل (دور) واسرشته سازی (هر دور به مدت ۱ دقیقه در ۹۴°C)، اتصال (هر دور به مدت ۱ دقیقه در ۵۶°C)، بسط (هر دور به مدت ۱/۵ دقیقه در ۷۲°C) و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C بود. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و باند حاصله با استفاده از Biosafestain (Nanolytik، آلمان) رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل ترانس ایلومیناتورمدل XR-plus، (Bio-Rad، USA) عکسبرداری شد.

آزمایش RAPD: برای انجام مطالعات تنوع ژنتیکی از روش RAPD توصیه توسط Ravelo و همکاران در سال ۲۰۰۳ با اندکی تغییرات استفاده شد. برای این کار ۶ پرایمر انتخابی نشان داده شده در جدول ۲ مورد استفاده قرار گرفتند.

مخلوط واکنش (۲۵µL) مورد استفاده برای آزمایش RAPD شامل ۲/۵µL بافر (۱۰X) PCR (Fermentas لیتوانی)، ۱/۵U آنزیم Dream Taq Polymerase (Fermentas، لیتوانی)، پرایمر به میزان ۳۰pmol، مخلوط dNTPs (۱۰mM) به میزان ۰/۳µL (Fermentas، لیتوانی) و DNA استخراج شده از جدایه‌های موردنظر به میزان ۱۰۰ng و رساندن حجم نهایی مخلوط به ۲۵µL بود.

عملیات PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر به ترتیب شامل ۳ دقیقه در ۹۴°C (واسرشته سازی اولیه)، ۴۰ سیکل (دور) واسرشته سازی (هر دور به مدت ۱ دقیقه در ۹۴°C)، اتصال (هر دور به مدت ۱ دقیقه در ۳۵°C)، بسط (هر دور به مدت ۱/۵ دقیقه در ۷۲°C) و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C انجام شد.

محصول RAPD با استفاده از ژل آگارز ۲٪ و هم چنین ژل پلی آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز و به ترتیب با استفاده از Biosafestain (Nanolytik، آلمان) و نیترات نقره رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل ترانس ایلومیناتورمدل XR-plus (Bio-Rad، USA) عکسبرداری شد. برای درک روابط تکاملی جدایه‌های مورد مطالعه از درخت فیلوژنیک استفاده شد. این درخت مسیرهای تکاملی را نشان می‌دهد. درخت فیلوژنی از روش جفت گروهی غیر وزنی از طریق میانگین حسابی (UPGMA) با کمک نرم افزار Mega ۴ و با استفاده از معیار (۵) ترسیم گردید. در این روش کمترین فاصله ژنتیکی را یک خوشه تشکیل می‌دهد و سپس فاصله سایر واحدها از این خوشه به صورت میانگین بدست می‌آید و واحدی که کمترین فاصله را از خوشه حاصله دارد همراه با خوشه‌ی قبلی خوشه بندی می‌گردد.

نتایج

PCR برای شناسایی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه: بررسی استخراج DNA نمونه‌های باکتریایی از کیفیت خوبی برخوردار بوده بطوریکه یک باند قوی و باریک روی ژل آگارز ۱٪ ایجاد شد (تصویر ۱)، لذا با توجه به واضح بودن باندهای DNA روی ژل آگارز ۱٪ استفاده از کیت مربوطه دارای کیفیت مناسبی برای استفاده در این مطالعه تشخیص داده شد.

بر اساس نتایج حاصل از PCR جدایه‌های باکتریایی تعداد ۴۴ جدایه به عنوان گونه‌ی گارویه شناسایی شدند بطوریکه الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۲٪ بیانگر قطعه‌ی ژن تکثیر شده‌ی 16SrRNA لاکتوکوکوس گارویه با اندازه‌ی باندی ۱۱۰۰bp می‌باشد و هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی تولید باند ننمودند (تصویر ۲). بر اساس این نتایج به ترتیب ۱، ۱۴، ۱۱، ۴ و ۳ جدایه لاکتوکوکوس گارویه از استان‌های کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد، چهارمحال بختیاری، لرستان، مازندران و تهران شناسایی شدند.

نتایج RAPD: انجام RAPD اولیه با استفاده از جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه و با استفاده از هریک از ۶ پرایمر انتخابی نشان داد که پرایمرهای P3 و P1 قادر به تولید هیچ گونه باندی نبودند، پرایمرهای P5، P2 و P6 نیز تعداد کمی باند (۲ باند) ایجاد نمودند در حالیکه پرایمر P4 قادر به تولید حداکثر ۵ باند بود. با تکرار آزمایش باندهای تولیدی قابل تولید مجدد بودند. لذا پرایمر P4 برای انجام RAPD روی همه‌ی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه مورد استفاده قرار گرفت (تصویر ۳).

مراحل PCR برای هریک از پرایمرهای مورد استفاده دو بار تکرار شد و نتایج حاصله فاقد تفاوت خاصی بودند (به مقدار کمی از نظر شدت و

جدول ۱. جایگاه، توالی، دمای اتصال پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی سویه‌های لاکتوکوکوس گارویه.

جایگاه	توالی پرایمر	دمای اتصال	رفرنس
PLG1	5- CAT AAC AAT GAG AAT CGC -3	۵۶	Zlotkin et al, 1998
PLG2	5- GCA CCC TCG CGG GTT G -3		

جدول۲. جایگاه، توالی، دمای اتصال پرایمرهای استفاده شده برای انجام آزمایش RAPD.

جایگاه	توالی پرایمر	دمای اتصال	رفرنس
P1	GGTGCGGGAA	-	Ravelo et al., 2003
P2	GTTTCGCTCC	۳۵	Ravelo et al., 2003
P3	GTAGACCCGT	-	Ravelo et al., 2003
P4	AAGAGCCCGT	۳۵	Ravelo et al., 2003
P5	AACGCGCAAC	۳۵	Ravelo et al., 2003
P6	CCCGTCAGCA	۳۵	Ravelo et al., 2003

تراکم باندها تفاوت‌های اندک قابل مشاهده بود) در این مطالعه نتایج RAPD با استفاده از پرایمر P4 موجب تولید ۴ الگوی باندی شد که عبارتند از:

۱ـ الگوی باندی I: این الگو موجب تولید باندهایی بین ۱۳۳۰bp تا ۵۶۰bp به تعداد ۵ باند شد. همه‌ی نمونه‌های استان تهران و مازندران و تعدادی از جدایه‌های استان‌های لرستان، چهارمحال بختیاری و کهگیلویه و بویراحمد از این الگوی باندی تبعیت نمودند (تصویر ۴، ستون ۱).

۲ـ الگوی باندی II: این الگو موجب تولید باندهایی بین ۱۲۶۰bp تا ۵۶۰bp به تعداد ۵ باند شد و همه‌ی جدایه‌های استان لرستان از این الگو تبعیت نمودند (تصویر ۴، ستون ۲).

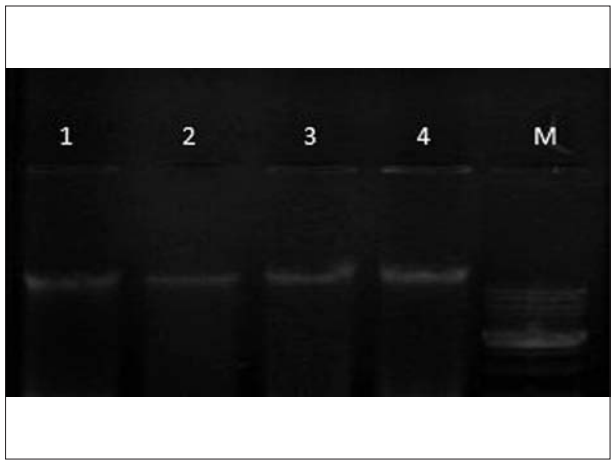
۳ـ الگوی باندی III: این الگو موجب تولید باندهایی بین ۱۲۶۰bp تا ۵۶۰bp به تعداد ۴ باند شد و جدایه‌های مربوط به استان‌های چهارمحال بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد و کرمانشاه در این الگو جای گرفتند (تصویر ۴، ستون ۳).

۴ـ الگوی باندی IV: این الگو موجب تولید باندهایی بین ۱۲۰۰bp تا ۵۶۰bp به تعداد ۵ باند شد و تعدادی از جدایه‌های کهگیلویه و بویراحمد در این الگو جای گرفتند (تصویر ۴، ستون ۴).

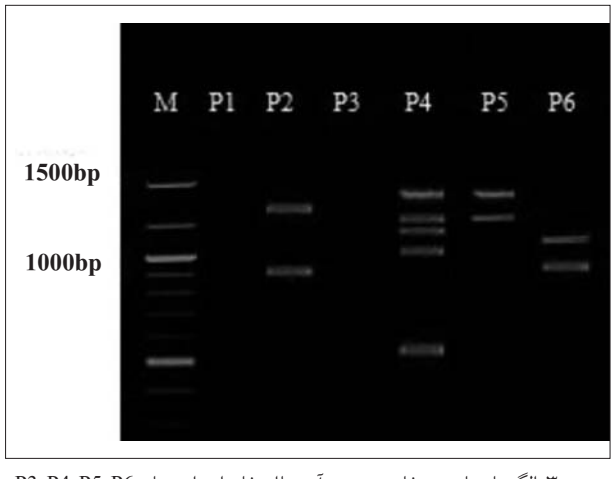
بعلاوه نمونه‌های منطقه‌ی کهگیلویه و بویراحمد ۳ الگوی باندی و نمونه‌های چهارمحال بختیاری و لرستان ۲ الگوی باندی و نمونه‌های تهران و مازندران ۱ الگوی باندی را نشان دادند. ترسیم درخت فیلوژنی حاصل از محصول RAPD بدست آمده روی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه با استفاده UPGMA نشان داد که ۳ کلاستر قابل تفکیک است. اولین کلاستر خود به دو گروه قابل تقسیم و در مجموع ۴ گروه ژنتیکی شامل گروه‌های A، B، C و D در بین جدایه‌های مورد مطالعه، شناسایی شد (تصویر۵)، بطوریکه بیشترین جدایه‌ها در گروه A ژنتیکی قرار داشتند که متعلق به نمونه‌های منطقه‌ی کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری، لرستان، مازندران و تهران بودند. جدایه‌های منطقه‌ی کهگیلویه و بویراحمد، چهارمحال و بختیاری و کرمانشاه در گروه B ژنتیکی، جدایه‌های منطقه‌ی لرستان در گروه C ژنتیکی و جدایه‌های منطقه‌ی کهگیلویه و بویراحمد در گروه D ژنتیکی مشاهده شدند (تصویر۵).

بحث

لاکتوکوکوس گارویه یکی از عوامل مهم بیماری استرپتوکوکوزیس/ لاکتوکوکوزیس در صنعت آبزی پروری در مناطق مختلف می‌باشد (۳،۴،۵،۹،۱۱). استفاده از روش‌های شیمیایی و مرسوم برای شناسایی باکتری عامل بیماری و تفکیک آنها از سایر عوامل مولد (استرپتوکوکوس اینیایی، لاکتوکوکوس لاکتیس و سویه‌های شبه انتروکوکوس) کاری دشوار، زمان بر و پر هزینه است. به علاوه نتایج این گونه مطالعات بیوشیمیایی اغلب متغیر می‌باشد (۳،۹،۱۰). همچنین استفاده از این نوع روش‌ها تنها موجب شناسایی باکتری در حد فنوتایپینگ می‌شود و لذا نیاز به مطالعات مولکولی برای اطلاع از موقعیت تاکسونومی جدایه‌های عامل بیماری می‌باشد، در بین دو روش مولکولی مورد استفاد (۱،۱۳) برای شناسایی جدایه‌های عامل بیماری با استفاده از قطعه ژنی 16SrRNA از مزایای بیشتری برخوردار است (۱۳). علیرغم مطالعات متعدد پیرامون فنوتایپینگ جدایه‌های به دست آمده از تلفات ماهیان، مطالعات اندکی در خصوص جنبه‌های اپیدمیولوژیک آن و با استفاده از روش‌های مولکولی صورت گرفته است. Eldar و همکاران ۱۹۹۹ در سال با استفاده از روش ریبوتایپینگ تعداد ۱۵ جدایه‌ی این باکتری به دست آمده از مناطق آسیا، اروپا و استرالیا متوجه تعداد دو ریبوتایپ با استفاده از آندونوکلئاز EcoR1 و ۷ ریبوتایپ با استفاده از آندونوکلئاز HindIII شده اند. در این مطالعه و با استفاده از هر دو آندونوکلئاز فوق الذکر ارتباط نزدیکی بین جدایه‌های ژاپنی و ایتالیایی مشاهده شد. در مطالعه Vela و همکاران ۲۰۰۰ در سال با استفاده از الکتروفورز ژل آکریل آمید (PFGE) روی تعداد ۸۴ جدایه این باکتری به دست آمده از انسان، گاو، ماهی و آب موفق شدند تا ۱۹ تیپ باکتریایی را از همدیگر تفکیک کنند. همچنین این محققین نشان دادند که ۳ کلون ژنتیکی متفاوت از این باکتری وجود دارد. در مطالعه Ravelo و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از روش RAPD اقدام به بررسی تنوع ژنتیکی تعداد ۵۷ جدایه این باکتری به دست آمده از ماهیان قزل آلا، گیش دم زرد، گربه ماهی و گاو در کشورهای مختلف (فرانسه، پرتقال، ترکیه، اسپانیا، ایتالیا و ژاپن) نمودند. آنها جدایه‌ها را در ۳ گروه ژنتیکی

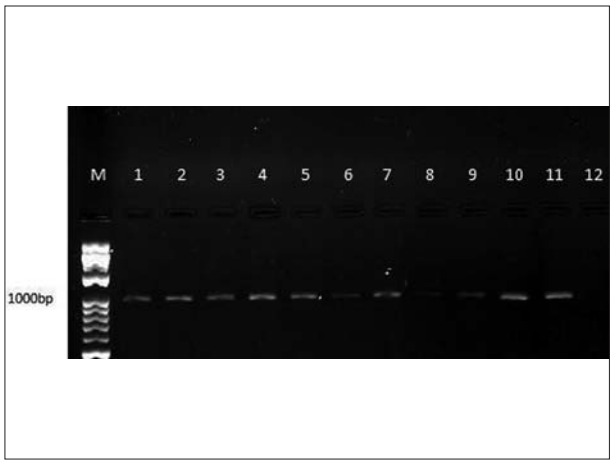


تصویر۱. DNA استخراج شده روی ژل آگارز۱٪.

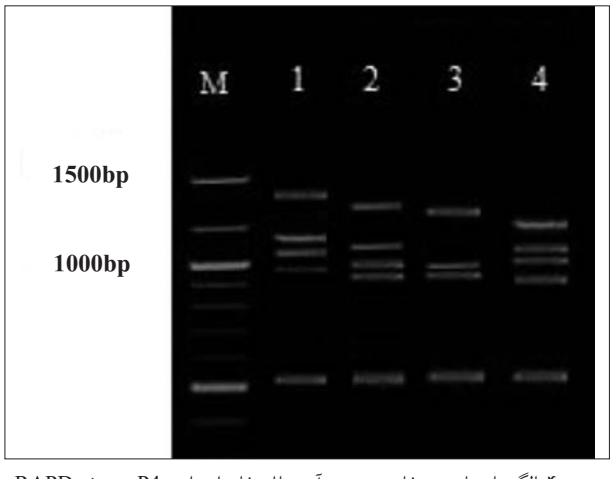


تصویر ۳. الگوهای باندی متفاوت بدست آمده با استفاده از پرایمرهای P6، P5، P4، P3، P2، P1، M= مارکر ۱۰۰bp.

طبقه‌بندی نمودند و درصد مشابهت هر سه گروه را ۱۰۰-۷۵٪ گزارش کردند. در مطالعه حاضر که روی تعداد ۴۴ جدایه‌ی لاکتوکوکوس گاروییه از تلفات قزل آلا در برخی مزارع استان‌های حومه البرز (مازندران، تهران) و زاگرس (لرستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد و چهار محال و بختیاری) انجام شد، با استفاده از پرایمر مورد استفاده تعداد ۴ تیپ (پروفایل) مختلف به دست آمد. در این مطالعه و بر خلاف مطالعه Ravelo و همکاران در سال ۲۰۰۳، پرایمر P4 قادر به تولید بیشترین باند (۵ باند) بود که علت یا علل احتمالی آن برای نویسندگان نامعلوم است. یکی از علل آن می‌تواند به دلیل وجود توالی نوکلئوتیدی متفاوت در بین جدایه‌های ایران با جدایه‌های مورد مطالعه توسط Ravelo و همکاران در سال ۲۰۰۳ باشد مشاهده این اختلاف در توالی نوکلئوتیدی را می‌توان ناشی از وجود فاصله جغرافیایی دانست. بعلاوه تولید الگوی (پروفایل) RAPD در بین جدایه‌های ایران می‌تواند ناشی از تفاوت در منطقه جغرافیایی کشور باشد زیرا ایران سرزمینی پهناور و مناطق شمالی و غربی آن از نظر تنوع زیستی و جغرافیایی و گردشگری که همگی در منابع و انتشار باکتری عامل بیماری

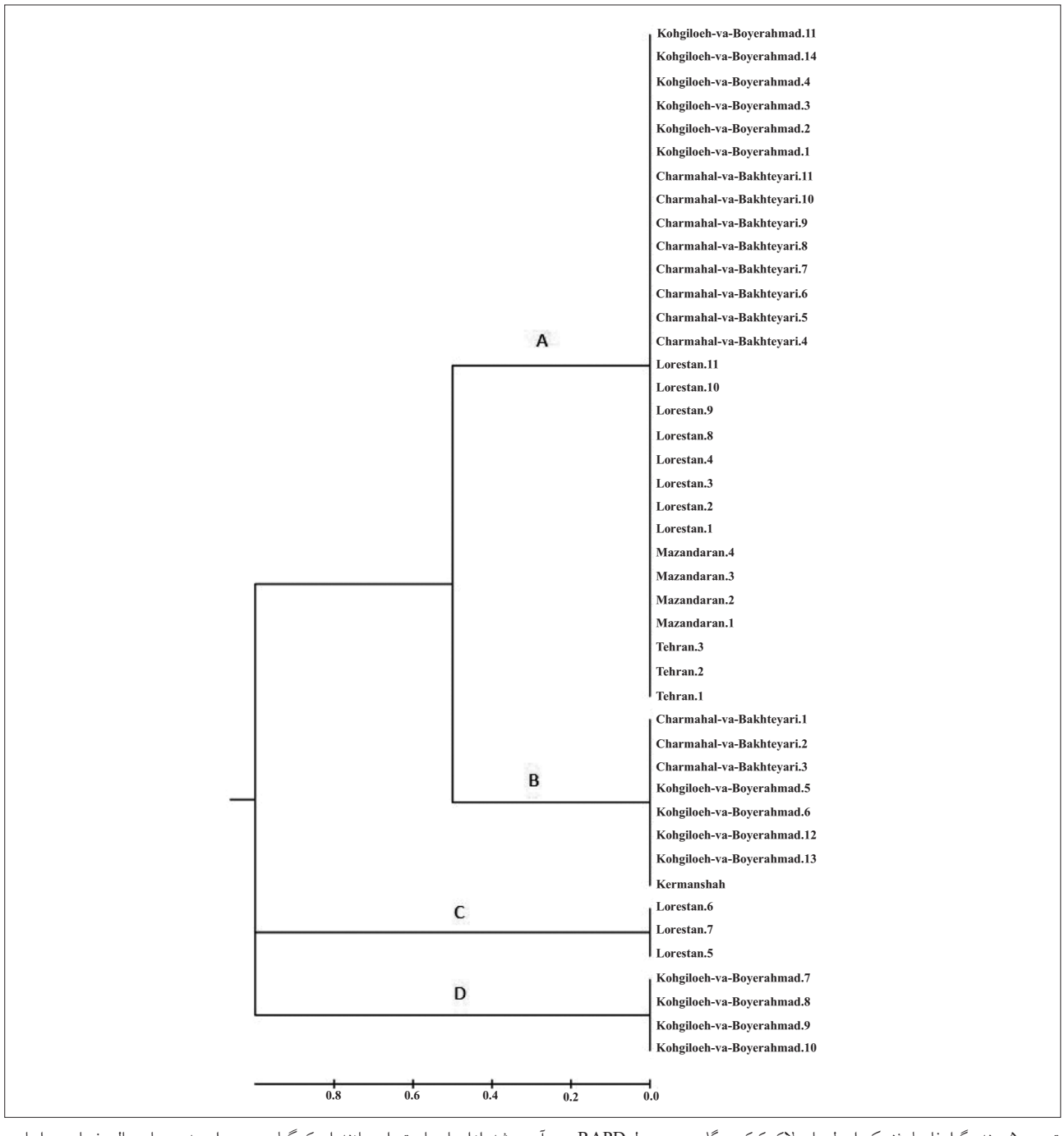


تصویر۲ ـ ژل آگارز ۲٪ مربوط به PCR حاصل از DNA برخی جدایه‌های لاکتوکوکوس گاروییه مورد استفاده در تحقیق M= مارکر 1kb، ۱۰-۱= جدایه‌های مورد آزمایش، ۱۱= کنترل مثبت (لاکتوکوکوس گاروییه *Accession No:GQ850376.1*)، ۱۲= کنترل منفی (استرپتوکوکوس اینیایی *Accession No:GQ850377.1*).



تصویر ۴. الگوهای باندی متفاوت بدست آمده با استفاده از پرایمر P4 در روش RAPD، ستون‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ بیانگر چهار الگوی باندی متفاوت بدست آمده با استفاده از این پرایمر می‌باشد.

نقش دارند، با همدیگر متفاوت هستند. به علاوه در این مطالعه الگوی RAPD از نظر شباهت و با استفاده از پرایمر P4 بیانگر چهار گروه ژنتیکی در میان ۴۴ جدایه لاکتوکوکوس گاروییه به دست آمده از مزارع قزل آلا در استان‌های تحت مطالعه است. همان طوری که الگوهای باندی RAPD نشان می‌دهد همه جدایه‌های شمالی کشور (تهران و مازندران) مشابه و همه جدایه‌های غرب کشور (کرمانشاه، کهگیلویه و بویر احمد و چهار محال و بختیاری) نیز مشابه و متفاوت از جدایه‌های شمالی کشور است. به علاوه جدایه‌های استان لرستان واجد یک الگوی باندی یکسان اما متفاوت با جدایه‌های سایر استان‌هاست. قابل توجه است که برخی جدایه‌های استان‌های غرب کشور مشابه برخی جدایه‌های استان‌های شمالی است. یکی از علل این امر می‌تواند ناشی از مخزن باکتری (جانوران خونگرم)، حمل و نقل بچه ماهیان و تخم چشم زده آلوده بین استان‌های شمالی و غربی کشور باشد، بنابراین نتایج این مطالعه نشان



تصویر ۵. دندروگرام فاصله ژنتیکی ایزوله‌های لاکتوکوکوس گارویه محصول RAPD جمع آوری شده از استان‌های تهران، مازندران، کهگیلویه و بویر احمد و چهارمحال بختیاری بر اساس UPGMA (Nei, 1972).

می‌دهد که جدایه‌های هر منطقه از شباهت بالایی با یکدیگر برخوردار بوده و با جدایه‌های سایر مناطق متفاوت هستند که از نظر اپیدمیولوژیک بیانگر هتروژنیسیتی جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه در مزارع قزل آلای ایران است. از آنجایی که این بیماری به لحاظ تنوع منابع باکتری‌های درگیر نیازمند اتخاذ روش‌های پیشگیری است و در سال‌های اخیر واکسن ساخت داخل علیه آن در حال استفاده است، لذا نتایج این مطالعه به ارتقاء کارآیی این واکسن کمک شایانی خواهد نمود.

در جمع بندی و نتیجه‌گیری کلی می توان اظهار داشت که جدایه‌های لاکتوکوکوس گارویه عامل تلفات مزارع قزل‌آلای ایران از تنوع ژنتیکی قابل توجه برخوردار بوده و این تنوع با روش RAPD قابل مطالعه است زیرا در مقایسه با سایر روش‌ها این روش ارزان، سریع و ساده بوده و با ابزارهای متداول قابل اجرا است. به علاوه نتایج این مطالعه نشان می دهد که به دلیل تنوع ژنتیکی جدایه‌های درگیر در بیماری ضروری است تا برای ارتقاء کارآیی واکسن ساخت داخل به گونه‌ای عمل شود تا واکسن تولیدی

قدرت ایجاد محافظت علیه همه جدایه‌های با تنوع ژنتیکی متفاوت را داشته باشد و از آنجایی که منابع این باکتری متعدد و شماری از جانوران خونگرم را در بر می‌گیرد لذا انجام مطالعات مستمر در استان‌های مبتلا به بیماری برای شناسایی جدایه‌های جدید و هتروژن قابل توصیه است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب اعتبار ویژه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به شماره ۷۵۰۸۰۰۲/۶/۲ و نیز طرح کاربردی با حمایت سازمان شیلات ایران انجام گرفته است.

References

1. Aoki, T., Park, C.L., Yamashita, H., Hirono, I. (2000) Species-specific polymerase chain reaction for *lactococcus garvieae*. J Fish Dis. 23:1-6.
2. Austin B., Austin D. (2007) Bacterial Fish Pathogens. Disease of farmed and wild fish. (4th ed.) Springer. London, UK.
3. Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzatta, E., Goria, M., Prearo, M., et al. (1996) *Enterococcus seriolicida* as a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. Curr Microbiol. 32: 85-88.
4. Eldar, A., Goria, M., Ghittino, C., Zlotkin, A., Bercovier, H. (1999) Biodiversity of *lactococcus garvieae* isolated frome fish in Europe, Asia, and Australia. Appl Environ Microbiol. 65: 1005-1008.
5. Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo, M., Douet, D.G., Chilmonczyk, S., et al. (2004) Clonality and diversity of the fish pathogen *lactococcus garvieae* in mediterranean Countries. Appl Environ Microbiol. 70: 5132-5137.
6. Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89: 583-590.
7. Ravelo, C., Beatriz, M., Lopez-Romalde, S., Toranzo, A.E. (2003) Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplifiied polymorphic DNA analaysis. Clin Microbiol. 41: 751-756.
8. Soltani, M., Jamshidi, S., Shafipour, I. (2005) *Streptococcosis* caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 25: 95-106.
9. Soltani, M., Nikbakht, G., Ebrahimzadeh Mousavi, H.A. (2008) Epizootic outbreaks of lactococcusis caused by *lactococcus garveae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull Eur Assoc Fish Pathol. 28: 207-212.
10. Toranzo, A.E., Devesa, S., Heinen, A., Riaza, A., Nunenz, S., Barja, J.L. (1994) *Streptococcosis* in cultured turbot caused by an entrococcus-like bacterium. Bull. Eur Assoc Fish Pathol. 14: 19-23.
11. Vela, A. I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Liebana, P., et al. (2000) Phenotypic and genetic characterization of *lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks in comparison with isolates of other countries and sources. Clin Microbiol. 38: 3791-3795.
12. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Raflaski, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18: 6531-6535.
13. Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittimo, C., Bercovier, H. (1998) Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. Clin Microbiol. 36: 983-985.

Genetic diversity of isolated *Lactococcus garvieae* from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) mortality in Iran

Taherimirghaed, A., Soltani, M.*, Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Mohammadian, S.

Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 30 October 2012 , Accepted 28 January 2013)

Abstract:

BACKGROUND: *Lactococcus garvieae* is one of the main causative agents of Streptococcos is/Lactococcosis in farmed fish particularly in rainbow trout causing remarkable losses each year. **OBJECTIVES:** To study the genetic diversity of *Lactococcus garvieae* strains recovered from the mortality of farmed rainbow trout in different provinces of Iran. **METHODES:** The Gram positive cocci were first obtained from the kidney tissues of diseased trout. The bacterial isolates were grown on blood agar and were then identified by PCR method. Their genetic diversities were then studied using RAPD. **RESULTS:** The recovered gram positive cocci strains were identified as *L. garvieae* producing a 1100bp in PCR procedure. In RAPD studies using 6 random primers (P1-P6), only primer P4 was able to produce higher number of bands (five bands). Therefore, using this primer four profile patterns consisting of 560-1330 bp in 5 bands, 56--1260bp in 5 bands, 560-1260bp in 4 bands and 560-1200bp in 5 bands were obtained. The phylogenetic tree of the RAPD product using UPMGA software included these strains in three different clusters with four different genetic groups. **CONCLUSIONS:** The results of this study clearly show that *L. garvieae* strains from the diseased rainbow trout in the north part of Iran are geneticly different from those in the west country, although there is some genetic similarity between some strains of these two regions of country.

Key words: genetic diversity, *Lactococcus garvieae*, rainbow trout, RAPD

Figure Legends and Table Captions

Table1. Primer sequence, anneling tempreture and reference of used primers for identification of *L. garvieae* isolates.

Table2. Primer sequence, anneling tempreture and reference of used primers for RAPD analysis.

Figure 1. DNA extraction on 1% agarose.

Figure 2. PCR product of *L.garvieae* isolates on 2% agarose gel. M = 1kb marker, Lanes 1-10 = *L.garvieae* isolates, Lane 11 = Positive control (*L.garvieae*, Accession No:GQ850376.1), Lane 12 = negative control (*S.iniae*, Accession No:GQ850377.1).

Figure 3. Different profile using P1, P2, P3, P4, P5 and P6 primer, M: 100bp marker.

Figure 4. Different profile using P4 primer in RAPD analysis,line1, 2, 3 and 4 is showed 4 different profile using this primer.

Figure 5. UPGMA dendrogram based on the genetic distance of *L.garvieae* isolated from Tehran, Mazandaran, Kohgiloeh-va-Boyerahmad, Lorestan, Charmahal-va-Bakhterari, computed by Nei's (1972), according to RAPD analysis.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-61117094, Fax: 021-66913104**