Archive of SID

Rostaniha 20(1): 14–28 (2019) رستنیها ۲۰(۱): ۲۸–۱۴ (۱۳۹۸)

DOI: 10.22092/botany.2019.123385.1118

جداسازی و شناسایی استرامنوپیل‌های آبزی ساپرولگنیایی در استان‌های فارس و کرمانشاه

دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۶ / پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۸

زینب بلبلی: دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶، ایران

رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا✉: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶، ایران (rmostofi@shirazu.ac.ir)

چکیده

راسته *Saprolegniales* شامل گونه‌های بیمارگر گیاهان آبزی، خشکی‌زی و جانوران آبزی از جمله ماهی‌هاست. این شبه‌قارچ‌های استرامنوپیلایی نقش مهمی در فرایندهای تخریب بسترهای مواد آلی و فرایندهای زیست‌شناختی خودپالایی در زیست‌بوم‌های آب شیرین ایفا می‌کنند. در این مطالعه، نمونه‌هایی از برگ‌ها، چوب‌های پوسیده و قهوه‌ای و تخم‌های ماهی آلوده از مناطق مختلف استان‌های فارس (اردکان، برشنه، برغان، پل‌خان، تنگ تیزاب، تنگ سرخ، دلخان، سربست، سیدان، سپیدان، شش‌پیر و کفترک) و کرمانشاه (بیستون، پاوه، سراب قنبر، سراب صحنه و هرسین) در پاییز و زمستان ۱۳۹۶ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. شناسایی گونه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، ریخت‌سنجی، فیزیولوژیک و مطالعات فیلوژنتیکی انجام شد. گونه‌های شناسایی شده، براساس فاصله ترانویسی شده داخلی (ای‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریبوزومی جدایه‌ها، توالی‌سنجی و با روش بیشینه درست‌نمایی واکاوی فیلوژنتیکی شدند. براساس داده‌های به دست آمده، شش گونه *Saprolegnia* و یک گونه *Achlya* شناسایی شد. این گونه‌ها شامل: *Saprolegnia parasitica*، *S. ferax*، *S. anomala*، *S.* aff. *australis*، *S. mixta*، *Saprolegnia* sp. و *Achlya americana* بودند. همچنین، آرایه‌های *S.* aff. *australis* و *Saprolegnia* sp. جدا شده از مواد آلی پوسیده با هیچ یک از گونه‌های قبلا گزارش شده از جنس *Saprolegnia* قرابت نداشته و به احتمال زیاد گونه‌های جدیدی برای این جنس محسوب می‌شوند. گونه‌های *S. anomala*، *S. mixta* و *Achlya americana* برای مایکوبیوتای ایران جدید محسوب می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: ساپرولگنیالز، فاصله ترانویسی شده داخلی ژن اران‌ای ریبوزومی، مواد آلی پوسیده

Isolation and identification of aquatic saprolegnious stramenopiles in Fars and Kermanshah provinces (west of Iran)

Received: 17.12.2018 / Accepted: 08.05.2019

Zeinab Bolboli: PhD Student, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz 7144165186, Iran

Reza Mostowfizadeh-Ghalamfarsa✉: Prof., Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz 7144165186, Iran (rmostofi@shirazu.ac.ir)

Summary

The order *Saprolegniales* includes pathogenic species of aquatic and terrestrial plants and aquatic animals including fish. These straminipilous fungi play an important role as a decomposing component which participates in the destruction processes of organic substrates and self-cleaning biological processes in freshwater ecosystems. In this study, samples of brown decayed twigs, leaves, woods and infected spawns from various places of Fars province (Bahreghan, Bereshne, Dalkhan, Kaftrak, Polekhan, Sepidan, Seyyedan, Sarbast, Tang-e-Sorkh, Tang-e-Tizab, and Sheshpir) and Kermanshah province (Bisotun, Harsin, Paveh, Sarab Sahneh, and Sarab Qanbar), Iran were transferred to the laboratory during the fall and winter 2017–18. Species were identified based on morphological and morphometric characteristics of sexual and asexual organs as well as the physiological and phylogenetic studies. Identified species were sequenced based on the internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA and were analyzed phylogenetically by maximum likelihood method. Six species of *Saprolegnia* and one species of *Achlya* were identified including: *Saprolegnia parasitica*, *S. ferax*, *S. anomala*, *S.* aff. *australis*, *S. mixta*, *Saprolegnia* sp., and *Achlya americana*. Since *Saprolegnia* aff. *Australis*, and *Saprolegnia* sp. which were isolated from decomposing organic materials, were not related to any previously reported *Saprolegnia* species, therefore, they could be new species of *Saprolegnia*. *Saprolegnia anomala*, *S. mixta*, and *Achlya americana* were new to Iran mycobiota.

Keywords: Decomposing organic materials, internal transcribed spacer (ITS) region of rDNA, *Saprolegniales*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

شبه‌قارچ‌های متعلق به تیره *Saprolegniaceae* نقش مهمی را به عنوان تجزیه‌کننده در فرایندهای تخریب بستره‌های مواد آلی و فرایندهای زیست‌پالایی آب در زیست‌بوم‌های آب شیرین بازی می‌کنند (Markovaskaja 2006). مهم‌ترین جنس‌های این تیره *Saprolegnia* Nees Von Esenbeck و *Achlya* Nees Von Esenbeck هستند. این جنس‌ها متعلق به سلسله *Stramenopila*، شاخه *Oomycota*، رده *Oomycetes*، راسته *Saprolegniales* و تیره *Saprolegniaceae* است (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy). کشورهای اروپایی از جمله آلمان، هلند و روسیه بیش‌ترین مطالعات را روی این شبه‌قارچ‌های آبزی داشته‌اند (Markovskaja 2006). شایان ذکر است که گونه تیپ جنس ساپرولگنیا، *S. molluscorum* Nees 1823 می‌باشد (Markovskaja 2006).

تنوع در نحوه تخلیه اسپورانژیوم، یک ویژگی پایه‌ای برای تفکیک جنس‌های مختلف تیره *Saprolegniaceae* می‌باشد (Markovskaja 2007). در جنس *Saprolegnia*، آزادسازی زئوسپورها به تدریج از داخل اسپورانژیوم صورت می‌گیرد، در حالی که در جنس *Achlya* اسپورانژیوم‌ها از نوع اکلیویید (Achlyoid sporangia) هستند و زئوسپورها در انتهای اسپورانژیوم تجمع پیدا کرده و سپس آزاد می‌شوند. این جنس نیز بیمارگر آبزیان است و در زیست‌بوم‌های آب شیرین هم گزارش شده است (Markovskaja 2007).

جمعیت گونه‌های مختلف جنس *Saprolegnia* به طور چشم‌گیری، هم در طبیعت (زیست‌بوم‌های آب شیرین) و هم در محل پرورش آبزیان در حال افزایش است (Sandoval-Sierra *et al*. 2014). گونه‌های جنس *Saprolegnia* عامل بیماری‌های مهمی در حیوانات آبزی هستند و این جنس دارای گونه‌های بیمارگر مهمی است که مراحل جنینی و بالغ بسیاری از آبزیان به خصوص ماهی‌ها را در سراسر جهان دچار بیماری می‌کند (Van den Berg *et al*. 2013, Van West 2006). با وجود اهمیت بسیار زیاد این شبه‌قارچ‌های آبزی، مطالعات تاکسونومیک بسیار کمی تا به حال در مورد آن در ایران انجام شده است.

فقدان یک آرایه‌بندی قوی در جنس *Saprolegnia*، منجر به حضور جدایه‌هایی با تشخیص نادرست در مجموعه‌های کشت و در نتیجه افزایش تعداد توالی‌های تعیین تکلیف نشده در پایگاه‌های اطلاعاتی از جمله بانک ژن شده است (Sandoval-Sierra & Diéguez-Uribeondo 2015). علی‌رغم نیاز روزافزون به درک بهتر از زیست‌شناسی این موجودات، آرایه‌بندی دقیقی در مورد این میکروارگانیسم‌ها وجود ندارد. علت اصلی نبود آرایه‌بندی دقیق، این است که توصیف گونه در این جنس عمدتا مبتنی بر خصوصیات ساختارهای جنسی مانند اُاگونیوم، اُاسپور و انتریدیوم است. این صفات ممکن است مبهم، متنوع و یا در میان گونه‌های مختلف دارای هم‌پوشانی باشند، به طوری که در بعضی از موارد حتی ممکن است که این ساختارها تشکیل نشوند. علاوه بر این، برای گونه‌های *Saprolegnia*، مجموعه‌های مرجع بسیار کمی وجود دارد تا در مطالعات مولکولی برای مقایسه گونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد و منجر به تمایز فیلوژنتیکی بین گونه‌ها شود (Sandoval-Sierra and Diéguez-Uribeondo 2015).

مطالعات بسیار اندکی روی شبه‌قارچ‌های متعلق به تیره *Saprolegniaceae* در کشور ایران وجود دارد که شامل گزارش دو گونه *S. ferax* (Gruith.) Kütz. 1843 و *Isoacklya unispora* (Coker & Couch) R.L. Seym 1970 است (Tajick-Ghanbari *et al*. 2008, Safdari *et al*. 2008). در پژوهشی دیگر، گزارشی از گونه‌های جدید و توصیف نشده‌ای از جنس‌های *Saprolegnia* و *Achlya* ارایه شده است (Masigol *et al*. 2017). به دلیل اثرات شدید و مخرب گونه‌های انگل این تیره (مخصوصا گونه‌های جنس *Saprolegnia*) روی آبزیان و نقش مهم این شبه‌قارچ‌ها در تجزیه مواد آلی در زیست‌بوم‌های آب شیرین، شناسایی و تعیین خصوصیات گونه‌های این جنس، در فهم زیست‌شناسی و روابط تکاملی میان گونه‌ها بسیار اهمیت دارد. به همین دلیل، در پژوهش حاضر به بررسی وجود شبه‌قارچ‌های متعلق به تیره *Saprolegniaceae* با تاکید بر گونه‌های جنس *Saprolegnia*، در زیستگاه‌های آبی استان‌های فارس و کرمانشاه پرداخته شده و ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تکاملی جدایه‌های مربوط به این آرایه‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی

- نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

نمونه‌برداری از آب و مواد آلی پوسیده در سطح رودخانه‌ها و همچنین، استخرهای پرورش ماهی در استان‌های فارس (اردکان، برشنه، برغان، پل‌خان، تنگ تیزاب، تنگ سرخ، دلخان، سربست، سیدان، سپیدان، شش‌پیر و کفترک) و کرمانشاه (بیستون، پاوه، سراب قنبر، سراب صحنه و هرسین) به طور تصادفی در تابستان، پاییز و زمستان ۱۳۹۶ انجام شد.

جداسازی شبه‌قارچ‌های متعلق به تیره *Saprolegniaceae* از آب و مواد آلی، با استفاده از طعمه‌گذاری با بذور شاهدانه

www.SID.ir

Archive of SID

(*Cannabis sativa* L.) انجام شد (Seymour 1970). برای این منظور برگ‌ها و بقایای آلی شناور در سطح آب‌های راکد حاشیه رودخانه‌ها جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از شست‌وشو با آب لوله، قطعه‌قطعه و به تشتک‌های پتری حاوی بذور شاهدانه و آب مقطر سترون منتقل و در ۱۰ تا ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. شاهدانه‌ها، پس از ظهور ریسه‌های قارچی در اطراف آن‌ها، به تشتک‌های پتری حاوی آب مقطر سترون منتقل شدند. پس از چند بار شست‌وشو و گرفتن آب اضافی آن‌ها با استفاده از دستمال کاغذی سترون، در محیط کشت PARP-CMA (Jeffers and Martin 1968) کشت داده شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها با استفاده از محیط کشت آب-آگار و به روش نوک‌ریسه انجام شد. به منظور تشکیل اندام‌های جنسی و غیرجنسی و شناسایی جدایه‌ها، بلوک‌هایی از محیط کشت حاوی شبه‌قارچ به تشتک‌های پتری حاوی آب مقطر و بذور شاهدانه سترون منتقل شدند.

برای نمونه‌برداری از استخرهای پرورش ماهی، از ۱۰ مکان پرورش آبزیان در مناطق ذکر شده از استان فارس بازدید شد. تخم‌های ماهی حاوی ریسه‌های قارچی و همچنین ماهی‌هایی دارای علایم زخم روی بدن، به آزمایشگاه قارچ‌شناسی بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز منتقل شدند. به منظور جداسازی جدایه‌های *Saprolegnia*، تخم‌های آلوده پس از شست‌وشو با آب مقطر سترون و خشک شدن، روی محیط کشت PARP-CMA قرار داده شدند. جداسازی از ماهی های آلوده نیز با خراش‌دادن سطح بدن ماهی، شست‌وشوی پولک‌های جدا شده از محل زخم و کشت روی محیط کشت PARP-CMA انجام شد. نگهداری جدایه‌های به دست آمده از این پژوهش، در شیشه‌های حاوی آب مقطر و شاهدانه سترون و در ۱۵ درجه سلسیوس انجام شد.

- شناسایی جدایه‌ها

شناسایی اولیه جدایه‌های به دست آمده براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی اسپورانژیوم، اُاگونیوم، انتریدیوم و نحوه اتصال آن به اُاگونیوم و همچنین براساس کلید شناسایی قارچ‌های آبزی (Khulbe 2001) انجام شد. در مورد گونه‌های جدید که در کلید شناسایی موجود نبودند، از مقاله‌های توصیف گونه استفاده گردید.

- استخراج دی‌ان‌ای

استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از روش میرسلیمانی و مستوفی‌زاده قلمفرسا (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2013) و با استفاده از کیت DNG^{TM}-PLUS (سیناژن، ایران) و به روش توصیه شده توسط شرکت تولیدکننده انجام گرفت. رسوب دی‌ان‌ای در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. دی‌ان‌ای حاصل در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از استخراج دی‌ان‌ای جدایه‌ها کیفیت و کمیت دی‌ان‌ای استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ مدل ام-دی ۱۰۰۰ (نانودراپ تکنولوژی، ایالات متحده امریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

دی‌ان‌ای مربوط به فاصله ترانویسی‌شده داخلی (ای‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریبوزومی با استفاده از آغازگر عمومی ITS1 و ITS4 (White *et al.* 1990) و تحت شرایط یک چرخه واسرشتگی ابتدایی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، هم‌جوشی در ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسیکلر CG1-96 (کوربت ریسرچ، استرالیا) انجام شد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با الکتروفورز در ژل یک درصد اگارز حاوی ۰/۰۰۵ اتیدیوم بروماید در بافر تی‌بی‌یی (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم یی‌دی‌تی‌ای، ۵/۵ گرم اسید بوریک، آب مقطر تا حجم یک لیتر) به مدت یک ساعت و در ۹۰ ولت تایید شد. قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داکیومنتر (سین‌ژن، ایالات متحد امریکا) عکس‌برداری و اندازه نوارهای به دست آمده در مقایسه با یک نشانگر دی‌ان‌ای ۱۰۰جفت‌بازی (Gene Ruler؛ فرمنتاز، بریتانیا) برآورد شد. ژن‌های فزون‌سازی شده برای توالی‌سنجی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و پس از خالص‌سازی توسط این شرکت، از دو جهت مستقیم و معکوس با استفاده از آغازگرهای مرتبط توالی‌سنجی شد. توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (Hall 1999) با مقایسه نسخه مستقیم و معکوس ویرایش شده، رشته برآیند به دست آمد. رشته‌های برآیند پس از ارایه به بانک ژن (GenBank, NCBI, USA [Online] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) از طریق وب جهانی با استفاده از نرم‌افزار BankIit (GenBank, NCBI, USA [Online] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/) و اخذ رس‌شمار برای مطالعات بعدی استفاده شد.

مطالعات فیلوژنتیکی به منظور یافتن روابط بین جمعیت گونه‌های هدف با سایر گونه‌های *Saprolegnia* انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده به همراه توالی‌های به دست آمده از بانک ژن مربوط به مقاله‌های معتبر با نرم‌افزار ClustalX (Thompson *et al.* 1997) انجام شد و به صورت دستی تنظیماتی نیز روی آن صورت گرفت. از توالی *Achlya flagellata* رس‌شمار AF218143 در نقش گروه خارجی استفاده شد. رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 (Kumar *et al.* 2016) با روش بیشینه درست‌نمایی انجام گردید و ثبات تبارهای حاصل با ۵۰۰ دور بوت‌استراپ سنجیده شد.

نتیجه و بحث

حاصل نمونه‌برداری از مناطق مختلف و زیستگاه‌های آبی شبه‌قارچ‌های متعلق به تیره *Saprolegniaceae*، جداسازی ۲۵۰ جدایه از این تیره بود. نتایج نشان داد، علاوه بر گونه‌های جنس *Saprolegnia*، آرایه‌هایی از جنس *Achlya* نیز در میان جدایه‌ها وجود دارد. براساس مطالعات ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی شش گونه *Saprolegnia* شامل: *Saprolegnia parasitica*، *S. ferax*، *S. anomala*، *S.* aff. *australis*، *S. mixta*، *Saprolegnia* sp. و یک گونه *Achlya americana* شناسایی شد (شکل ۱). به غیر از گونه‌های *S. parasitica* (Ebrahimzadeh Mousavi *et al.* 2007) و *S. ferax* (Tajick-Ghanbari *et al.* 2008) که قبلا از ایران گزارش شده، سایر گونه‌های ذکر شده برای میکوبیوتای ایران جدید بودند. موقعیت فیلوژنتیکی این گونه‌ها در درخت بیشینه درست‌نمایی فاصله ترانویسی‌شده داخلی (ای‌تی‌اس) ژن ران‌ای ریبوزومی مشخص شده است (شکل ۲).

واکاوی ژن ای‌تی‌اس جدایه‌های جنس *Saprolegnia* نشان داد که این جدایه‌ها علی‌رغم تفاوت‌های ریخت‌شناختی بارز، در اغلب موارد دارای ناحیه ای‌تی‌اس مشابهی بودند. در این مطالعه، برای تفکیک این گونه‌ها، از ویژگی‌های ساختارهای جنسی و غیرجنسی در کنار مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شد. نتایج پژوهش کی و همکاران (Ke *et al.* 2009) با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. آن‌ها نیز این نکته را ذکر کرده‌اند که گونه‌های *S. anomala*، *S. diclina*، *S. ferax*، *S. mixta* و *S. longicaulis* به دلیل شباهت بسیار زیاد در ناحیه ای‌تی‌اس با هم در یک خوشه قرار می‌گیرند (کی و همکاران ۲۰۰۹).

در پژوهش حاضر، دو گونه جدید معرفی شد که با داشتن شکل‌های منحصربه‌فرد در اسپورانژیوم و ساختارهای جنسی و همچنین براساس نتایج واکاوی‌های فیلوژنتیکی، به احتمال زیاد گونه‌های جدید و توصیف نشده‌ای برای جهان خواهند بود. مطالعات آزمایشگاهی بیشتر برای توصیف این دو گونه جدید در دست انجام است.

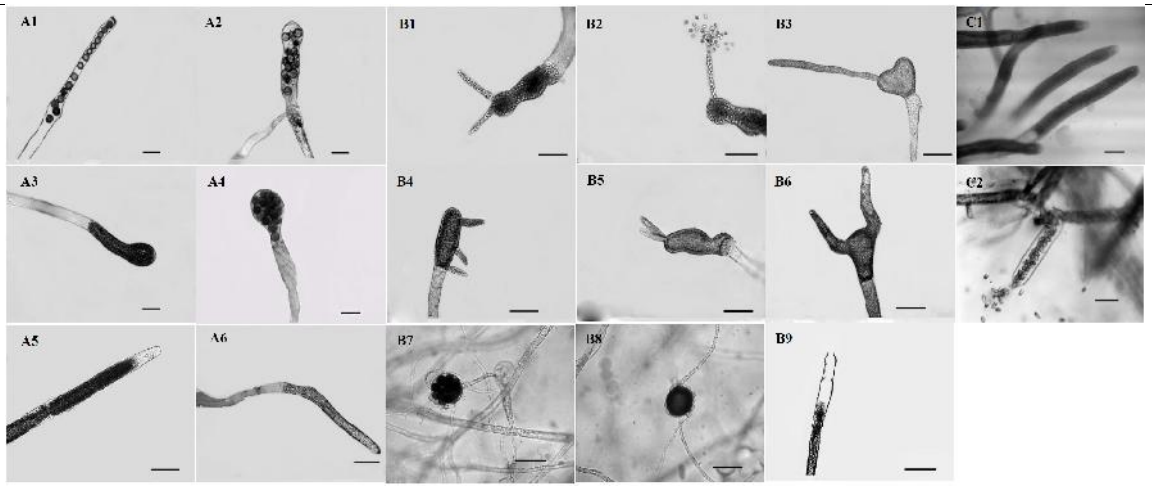
Saprolegnia ferax (Gruith.) Kütz. 1843

جدایه‌های این گونه از برگ‌ها و مواد آلی شناور در سطح رودخانه‌ای در روستای برغان شهرستان سپیدان به دست آمد (جدول ۱). ریسه‌های این شبه‌قارچ، استوانه‌ای، منشعب و با میانگین قطر ۱۰/۶ میکرومتر، اسپورانژیوم‌ها از ریسه قطورتر با میانگین قطر ۴۶/۵۱ میکرومتر، اُاگونیوم به شکل‌های متفاوت از کروی (با میانگین قطر ۲۵/۳۷) تا استوانه‌ای، اُاسپور با دیواره صاف، دارای میانگین قطری معادل ۱۸/۲۱ میکرومتر، در تعداد زیاد، معمولا ۱۵ تا ۲۰ عدد بودند که کل فضای اُاگونیوم را پُر می‌کردند. انتریدیوم تک‌بُن، به ندرت تشکیل می‌شدند که در اکثر موارد یک عدد در اطراف هر اُاگونیوم وجود داشت (شکل ۱، A و جدول ۲).

دو جدایه 159 و 165 از این گونه به نمایندگی جهت توالی‌سنجی انتخاب شد. تعداد نوکلیوتیدهای ناحیه ای‌تی‌اس جدایه 159، ۶۹۱ و جدایه 165، ۶۸۳ جفت باز بود. جست‌وجوی هر دوی این توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن نشان داد که این جدایه با ۹۹ درصد هم‌پوشانی و ۱۰۰ درصد شباهت به گونه (Diéguez-Uribeondo *et al.* 2007) *S. ferax* (AM228788) شباهت داشت. این جدایه در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر ناحیه ای‌تی‌اس در تباری جداگانه در کنار گونه‌های *S. ferax* AM228788، *S. mixta* EF126339 و *S. diclina* EU240107 قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استراپ میزان اطمینان از پدید آمدن این تبار برابر با ۸۴ درصد بود.

www.SID.ir

Archive of SID



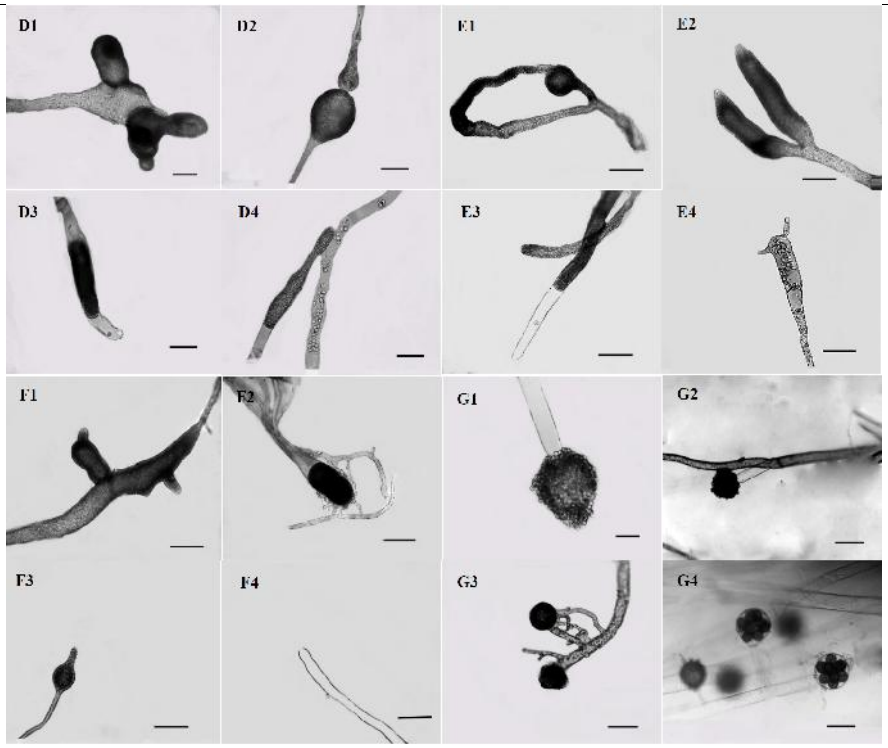
شکل ۱– ریخت‌شناسی گونه‌های *Saprolegnia* جدا شده از استان‌های فارس و کرمانشاه: A. ریخت‌شناسی *Saprolegnia ferax* جدایه 165: A1. اُآگونیوم رشته‌ای و استوانه‌ای بالغ و اُآسپورهای ناپرساز، A2. اُآگونیوم بالغ رشته‌ای متورم به همراه انتریدیوم دوبُن در پایه آن، A3. اُآگونیوم نابالغ، A4. اُآگونیوم گلابی شکل با تعداد متعدد اُآسپور در آن، A5 و A6. اسپورانژیوم استوانه‌ای (مقیاس = ۵۰ میکرومتر)؛ B. ریخت‌شناسی *Saprolegnia* aff. *australis* جدایه Sa2-2: B1. اسپورانژیوم بالغ با دو پستانک، B2. اسپورانژیوم در حال آزادسازی زئوسپور، B3-B7. انواع مختلف اسپورانژیوم، B8. اُآگونیوم و انتریدیوم دوبُن، B9. اُآگونیوم و انتریدیوم و اُآسپورهای متعدد در اُآگونیوم (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)؛ C. ریخت‌شناسی *Saprolegnia parasitica* جدایه De- S1: C1. اسپورانژیوم نابالغ استوانه‌ای شکل، C2. اسپورانژیوم در حال رهاسازی زئوسپورها (مقیاس = ۵۰ میکرومتر).

Fig. 1. Morphology of *Saprolegnia* species isolated from Fars and Kermanshah provinces (Iran): A. *Saprolegnia ferax* isolate 165: A1. Cylindrical oogonium with aplerotic oospore, A2. Mature filamentous inflated oogonium with diclinous antheridium in the base of oogonium, A3. Immature oogonium, A4. Pyriform oogonium with a lot of oospore, A5 & A6. Cylindrical sporangia (Bar = 50 µm); B. *Saprolegnia* aff. *australis* isolate Sa2-2: B1. Sporangium with three long discharge tube, B2. Zoospore release and cytoplasmic discharge from sporangia, B3, B4 & B5. Various types of sporangia in the new species, B7. Oospore & diclinous, paragynous antheridium, B8. Oogonium & antheridium (Bar = 100 µm); C. *Saprolegnia parasitica* isolate De-S1: C1. Immature & cylindrical sporangium, C2. Zoospore release and cytoplasmic discharge from sporangia (Bar = 50 µm).

گونه *S. ferax*، گونه‌ای با دامنه بوم‌شناختی وسیع است. تاکنون بیش از ۱۰۰ گزارش از وجود این گونه در نقاط مختلف جهان موجود است (Markovaskaja 2006). جداسازی این گونه تاکنون از آب و خاک بوده، اما در این پژوهش، نخستین گزارش از جداسازی آن از برگ‌های پوسیده ارایه شده است. در ایران، این گونه قبلا توسط تاجیک قنبری و همکاران (Tajick-Ghanbari *et al*. 2008) از شمال کشور و در قالب یک توصیف کوتاه گزارش شده است، اما مشخصات ریخت‌شناسی انجام شده در این پژوهش با توصیف تاجیک قنبری و همکاران (۲۰۰۸) دارای تفاوت‌هایی بود. نخستین تفاوت در شکل اُآگونیوم بود که جدایه‌های این پژوهش دارای اُآگونیوم‌های کروی، بیضوی و استوانه‌ای، ولی در توصیف تاجیک قنبری و همکاران (۲۰۰۸)، شکل این اندام‌ها فقط کروی توصیف شده بود. همچنین، قطر اُآگونیوم در جدایه‌های این پژوهش ۳۰-۲۰ میکرومتر مشاهده شد، ولی در جدایه‌های تاجیک قنبری و همکاران (۲۰۰۸)، ۲۲-۱۹ میکرومتر ذکر شده است. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی جدایه‌های این پژوهش با توصیف این گونه در پژوهش مارکواس‌کایا (Markovaskaja 2006) مطابقت داشت. شکل اُآگونیوم در پژوهش آن‌ها کروی و گلابی شکل توصیف شده بود، با این تفاوت که در جدایه‌های پژوهش حاضر، علاوه بر داشتن شکل‌های مذکور، اُآگونیوم استوانه‌ای نیز مشاهده شد. همچنین، قطر اُآگونیوم در جدایه‌های این پژوهش ۳۰-۲۰ میکرومتر، اما در جدایه‌های پژوهش مارکواس‌کایا (۲۰۰۶)، این اندام‌ها قطورتر با قطری معادل ۱۰۰-۵۰ میکرومتر مشاهده شد. نتیجه واکاوی‌های فیلوژنتیکی نیز نشان داد که جدایه‌های منتخب این گونه در تبار حاوی *S. ferax* (رس‌شمار AM228788) مربوط به سایر گزارش‌ها (Diéguez-Uribeondo *et al*. 2007) قرار می‌گیرند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ (ادامه)– D. ریخت‌شناسی *Saprolegnia mixta* جدایه S-gh-8: D1. اسپورانژیوم رشته‌ای متورم و منشعب، D2. اُاگونیوم کروی و انتریدیوم زنگوله‌ای شکل و تک‌بن، D3: اسپورانژیوم استوانه‌ای با اپرکولوم، D4. اسپورانژیوم استوانه‌ای (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)؛ E. ریخت‌شناسی *Saprolegnia* sp. جدایه S-gh-22: E1. اُاگونیوم همراه با انتریدیوم تک‌بن و رشته‌ای بلند، E2-E4. اسپورانژیوم رشته‌ای متورم و خمیده و همراه با پستانک (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)؛ F. ریخت‌شناسی *Saprolegnia anomala* جدایه B2-Sap: F1. اسپورانژیوم استوانه‌ای و ضخیم، F2. اُاگونیوم بیضوی با انتریدیوم‌های دوبُن، رشته‌ای و منشعب، F3. اُاگونیوم نابالغ، F4. اسپورانژیوم استوانه‌ای تخلیه شده (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)؛ G. ریخت‌شناسی *Achlya americana* جدایه S-gh-32: G1 و G2. اسپورانژیوم تخلیه شده و زئوسپورهایی سیست شده در انتهای اسپورانژیوم، G3. اُاگونیوم و انتریدیوم تک‌بن، G4. اُاگونیوم و اُاسپورهای درون آن (مقیاس = ۵۰ میکرومتر).

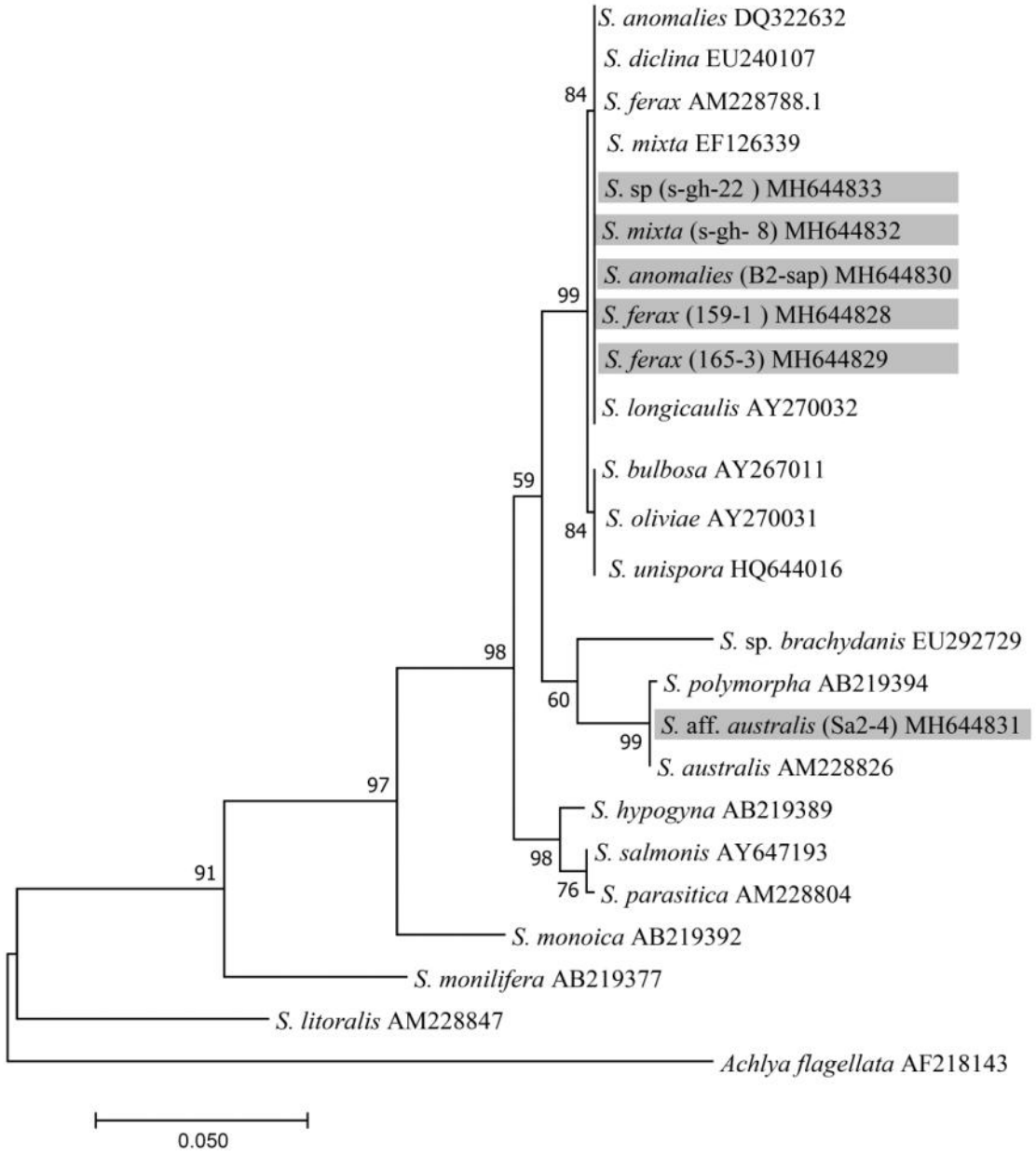
Fig. 1 (contd). D. *Saprolegnia mixta* isolate S-gh-8: D1. Filamentous inflated and branched sporangium, D2. Spherical oogonium with diclinous and bell shape antheridium, D3. Cylindrical sporangium with an operculum, D4. Cylindrical sporangium (Bar = 100 µm); E. *Saprolegnia* sp. isolate S-gh-22: E1. Spherical oogonium with monoclinous and filamentus inflated antheridium, E2-E4. Filamentous inflated sporangium (Bar = 100 µm); F. *Saprolegnia anomala* isolate B2-sap: F1. Thick and cylindrical sporangium, F2. Elliptical oogonia with diclinous filamentous and branched antheridium, F3. Immature oogonium, F4. Discharged filamentous sporangium (Bar = 100 µm); G. *Achlya americana* isolate S-gh-32: G1. Discharged sporangium with a lot of zoospore, G2. Monoclinous antheridium and oogonium, G3. Oogonium with oospores within the oogonium (Bar = 50 µm).

Saprolegnia anomala Gandhe & Kurne 2003

جدایه‌های مربوط به این گونه از بقایای گیاهی و برگ‌های شناور در سطح آب‌های سراب بیستون کرمانشاه جمع‌آوری شد (جدول ۱). ریسه‌ها منشعب، ریسه اصلی دارای میانگین قطری معادل ۲۹/۷۳ میکرومتر، اسپورانژیوم به میزان فراوان، به شکل‌های استوانه‌ای و رشته‌ای دارای میانگین طولی معادل ۱۵۴/۲ میکرومتر و میانگین قطر ۵۵-۲۲ میکرومتر، دارای لوله تخلیه کوتاه، اُاگونیوم به شکل‌های مختلف کروی و بیضوی، دارای میانگین قطری معادل ۱۷۶/۱۸ میکرومتر، انتریدیوم به حالت دوبُن، به میزان فراوان و منشعب در اطراف اُاگونیوم بود (شکل ۱، F و جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های .*Saprolegnia* spp استان‌های فارس و کرمانشاه در بین ۱۸ گونه *Saprolegnia* براساس مقایسه توالی نوکلیوتیدی نواحی فاصله ترانویسی‌شده داخلی (ای‌تی‌اس) دی‌ان‌ای ریبوزومی در درخت بیشینه درست‌نمایی. اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده درصد مقادیر بوت‌استراپ بزرگتر یا مساوی ۵۰ درصد است.

Fig. 2. Phylogeny of the *Saprolegnia* spp. isolates in Fars and Kermanshah povinces (Iran), together with 18 *Saprolegnia* species based on the internal transcribed spacer (ITS) regions of the rDNA in maximum likelihood tree. The numbers at the branch points indicate the percentages of bootstrap values ≥50.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- گونه‌های *Saprolegnia* و *Achlya* جدا شده از استان‌های فارس و کرمانشاه

Table 1. *Saprolegnia* spp. and *Achlya* spp. isolates collected from Fars and Kermanshah provinces (Iran)

Taxon	Isolate	Substrate	Date	Location	Coordinates	Accession Number*
Saprolegnia parasitica						
	Sp1	Fish eggs	4.12.2017	Fars:Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp2	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp3	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp4	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp5	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp6	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp7	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp8	Fish skin	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp9	Fish skin	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Sp10	Fish skin	4.12.2017	Fars: Sepidan, Shesh Pir	30°253'.172"N 052°068'.047"E	-
	Del1	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Dalkhan	30°253'.007"N 052°068'.055"E	-
	Del2	Fish eggs	4.12.2017	Fars: Sepidan, Dalkhan	30°253'.007"N 052°068'.055"E	-
Saprolegnia ferax						
	159-1	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Sar Bast	30°12'.279"N 052°01'.936"E	-
	159-2	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Sar Bast	30°12'.279"N 052°01'.936"E	-
	159-3	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Sar Bast	30°12'.279"N 052°01'.936"E	-
	159-4	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Sar Bast	30°12'.279"N 052°01'.936"E	-
	159-5	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Sar Bast	30°12'.279"N 052°01'.936"E	MH644828
	165-1	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Baraghan	30°27'.593"N 051°47'.086"E	MH644829
	165-2	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Baraghan	30°27'.593"N 051°47'.086"E	-
	165-3	Decayed leaves	6.1.2017	Fars: Sepidan, Baraghan	30°27'.593"N 051°47'.086"E	-
Saprolegnia aff. *australis*						
	Sa-2-1	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	-
	Sa-2-2	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	-
	Sa-2-3	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	-
	Sa-2-4	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	MH644831
	Sa-2-5	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	-
	Sa-2-6	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	-

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1 (contd) **جدول ۱ (ادامه)**

Taxon	Isolate	Substrate	Date	Location	Coordinates	Accession Number*
Saprolegnia aff. *australis* (contd)						
	Sa-2-7	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	-
	Sa-2-8	Decayed leaves	18.1.2018	Kermanshah: Sahne	34°29'32.04"N 47°41' 53.63"E	-
Saprolegnia mixta						
	S-gh-1	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-2	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-3	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-7	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-8	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	MH644832
	S-gh-9	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-15	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-16	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-18	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
Saprolegnia sp.						
	S-gh-19	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-21	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-22	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	MH644833
Saprolegnia anomala						
	B1-sap	Decayed leaves	4.2.2018	Kermanshah: Bisotun	34°23'20.69"N 47°26' 10.6"E	-
	B2-sap	Decayed leaves	4.2.2018	Kermanshah: Bisotun	34°23'20.69"N 47°26' 10.6"E	MH644830
	B33-sap	Decayed leaves	4.2.2018	Kermanshah: Bisotun	34°23'20.69"N 47°26' 10.6"E	-
Achlya americana						
	S-gh-16	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-20	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-31	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-
	S-gh-32	Decayed leaves	20.1.2018	Kermanshah: Sarab-Ghanbar	34°28'86.00"N 47°05' 42.37"E	-

*GenBank accession number for internal transcribed spacer (ITS) of rDNA

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقایسه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی گونه‌های *Saprolegnia* و *Achlya* جدا شده از استان‌های فارس و کرمانشاه

Table 2. Comparison of morphological and morphometrical characteristics of *Saprolegnia* spp. and *Achlya* spp. isolated from Fars and Kermanshah provinces (Iran)

Character	*S. ferax*	*S. anomala*	*S. mixta*	*S.* aff. *australis*	*Saprolegnia* sp.	*S. parasitica*	*A. americana*
Hyphae							
Average diam. (µm)	10.6±2.46	29.73±5.64	38.96±0.89	174.09±3.92	57.7±2.22	48.42±21.57	87.83±35.35
Range (µm)	7–15	20–40	38-40	167–181	54–62	20–87	30–159
Sporangia							
Shape	C	C	F,I	F,I	F,I	C	C
Average diam. (µm)	46.51±13.06	154.2	328±108.16	236.56±30.46	323.83±64.67	77.96±16.65	339.14±95.44
Range (µm)	22–73	143.1–162	125–488	175–300	214–247	44–100	179–489
Oogonium							
Shape	F,S	S	S, E	S	S	S	S
Average diam. (µm)	25.37±3.51	176.18±14.88	151.19±32.48	91.83	97.68±22.97	70.64±6.13	62.43±15.15
Range (µm)	20–30	154–205.15	99.11–205.5	70–123	58–135	59–83	35–90
Oospore							
Type	A	A	A	A	A	A	A
Average diam. (µm)	18.12±1.75	21.95±1.98	17.26±1.88	24.23±3.59	28.6±4.14	23.13±2.09	23.42±2.37
Range (µm)	15–20	19–25.2	15–20	18–31	23–34.2	20–26	19–27

E: Elliptical, F: Filamentous, I: Inflated, C: Cylindrical, A: aplerotic, S: Spherical

تعداد نوکلیوتیدهای ناحیه ای‌تی‌اس این جدایه ۶۸۲ جفت باز بود. جست‌وجوی این توالی در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن نشان داد که این جدایه با ۹۹ درصد هم‌پوشانی و ۱۰۰ درصد شباهت به گونه *S. anomala* (DQ322632) (Gandhe & Kurne 2003) شباهت دارد. این جدایه در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر ناحیه ای‌تی‌اس در تباری جداگانه در کنار گونه‌های *S. ferax* AM228788، *S. mixta* EF126339 و *S. diclina* EU240107 قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استراپ، میزان اطمینان از پدید آمدن این تبار برابر با ۸۴ درصد بود.

این گونه برای نخستین بار از ایران در این پژوهش معرفی می‌شود. مشخصات ریخت‌شناختی جدایه‌های شناسایی شده این گونه در استان کرمانشاه، با مشخصات این گونه در پژوهش گاندی و کورنی (Gandhe & Kurne 2003) که نخستین بار این گونه را توصیف کرده‌اند مطابقت داشت. شکل اُآگونیوم مطابق با توصیف‌های گاندی و کورنی (۲۰۰۳) بیضوی و کروی بود، با این تفاوت که قطر این اندام در جدایه‌های استان کرمانشاه بین ۲۰۵-۱۵۴ میکرومتر، ولی در جدایه‌های پژوهش گاندی و کورنی (۲۰۰۳)، ۸۰-۴۰ میکرومتر بود. مشخصه اصلی این گونه داشتن اُآگونیوم‌های بیضوی و انتریدیوم رشته‌ای و بسیار منشعب است که در جدایه‌های شناسایی شده این گونه در استان فارس مشاهده شد. مشاهدات ریخت‌شناختی با نتایج واکاوی‌های فیلوژنتیکی مطابقت داشت. بررسی منابع موجود نشان داد که به غیر از نخستین توصیف این گونه توسط گاندی و کورنی (۲۰۰۳) که آن را از آب دریاچه جداسازی کردند، گزارش دیگری در دست نیست. این پژوهش، دومین گزارش از جداسازی این گونه در جهان و تنها گزارش جداسازی آن از مواد آلی پوسیده است.

Saprolegnia mixta de Bary 1883

جدایه‌های این گونه از کرمانشاه، منطقه سراب قنبر جداسازی شد (جدول ۱). ریسه‌ها منشعب، ریسه اصلی دارای میانگین قطری معادل ۳۸/۹۶ میکرومتر، اسپورانژیوم به میزان فراوان، به شکل‌های استوانه‌ای و رشته‌ای دارای میانگین طول ۳۲۸ میکرومتر و قطر ۵۵-۲۲ میکرومتر، دارای لوله تخلیه کوتاه، اُآگونیوم کروی و بیضوی، دارای دیواره صاف، با میانگین قطر ۱۵۱/۱۹، تعداد اُآسپورها ۹-۵ عدد در هر اُآگونیوم و دارای میانگین قطر ۲۰-۱۵ میکرومتر، انتریدیوم چماقی شکل، به حالت دوبُن، در اغلب موارد ساده و بدون انشعاب بود (شکل ۱، D و جدول ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

تعداد نوکلیوتیدهای ناحیه ای‌تی‌اس این جدایه ۶۸۲ جفت باز بود. جست‌وجوی این توالی در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن نشان داد که این جدایه با ۹۹ درصد هم‌پوشانی و ۱۰۰ درصد شباهت به گونه *S. ferax* (AM228788) (Diéguez-Uribeondo *et al*. 2007) و با ۹۸ هم‌پوشانی و ۹۹ درصد شباهت به گونه *S. mixta* (EF126339) (Belbahri *et al*. 2006) شباهت دارد. این جدایه در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر ناحیه ای‌تی‌اس در تباری جداگانه در کنار گونه‌های *S. ferax* AM228788، *S. mixta* EF126339 و *S. diclina* EU240107 قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استراپ، میزان اطمینان از پدید آمدن این تبار برابر با ۸۴ درصد بود.

طبق منابع موجود، این گونه برای نخستین بار از ایران از استان کرمانشاه گزارش می‌شود. بررسی کلید توصیف گونه (Khulbe 2001) نشان داد که ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های استان کرمانشاه با توصیف این گونه در کلید شناسایی مطابقت دارد. میانگین طول اسپورانژیوم در جدایه‌های استان کرمانشاه ۳۲۸ میکرومتر بود و این مقدار در کلید شناسایی ۴۸۸-۱۲۵ میکرومتر ذکر شده که نتایج با هم تطابق داشتند. اُآگونیوم در جدایه‌های این پژوهش دارای قطری معادل ۱۵۱ میکرومتر بود و این مقدار در کلید شناسایی این گونه ۳۷۵-۲۵ میکرومتر است. نتایج واکاوی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های این پژوهش از نظر توالی ناحیه فاصله ترانویسی شده داخلی ژن اران‌ای ریبوزومی شباهت بسیار زیاد به گونه *S. ferax* داشتند، اما برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی از جمله شکل اُآگونیوم و اسپورانژیوم منجر به تمایز این دو گونه شد. اُآگونیوم در گونه *S. mixta* کروی و انتریدیوم معمولا دوبُن است، در حالی که در *S. ferax* اُآگونیوم معمولا بیضوی، گلابی شکل و یا استوانه‌ای است (Khulbe 2001). اسپورانژیوم در *S. ferax* معمولا استوانه‌ای است، ولی در گونه *S. mixta* علاوه بر شکل استوانه‌ای، این اندام‌ها رشته‌ای، متورم با لوله تخلیه کوتاه هم مشاهده شد. پیش از این گزارشی از جداسازی این گونه از مواد آلی پوسیده وجود نداشته است و اغلب جداسازی‌ها از آب بوده است (Khulbe 2001).

Saprolegnia* aff. *australis

جدایه‌های این گونه ظاهرا توصیف نشده، از کرمانشاه (دربند صحنه) به دست آمد (جدول ۱). اسپورانژیوم این جدایه‌ها دارای شکل‌های متنوع، غیرمنظم دارای پستانک بسیار بلند مانند لوله تخلیه زئوسپور در جنس پیتیوم بود. میانگین طول اسپورانژیوم ۲۳۶/۱۷ میکرومتر، عرض ۸۱/۵۳ میکرومتر و طول لوله تخلیه ۱۱۵ میکرومتر بود. اُآگونیوم دارای قطری با میانگین ۹۱/۸۳ میکرومتر، تعداد اُآسپورها ۱۱-۹ عدد و دارای میانگین قطر ۲۴/۲۳ میکرومتر بودند. در هر اُآگونیوم، انتریدیوم‌ها رشته‌ای و به حالت دوبُن بودند و این ساختارهای جنسی پس از گذشت ۲۰ روز تشکیل شدند (شکل ۱، B و جدول ۲).

تعداد نوکلیوتیدهای ناحیه ای‌تی‌اس جدایه Sa-2 شامل ۶۸۸ جفت‌باز بود. جست‌وجوی این توالی در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن نشان داد که جدایه مورد بررسی با ۹۹ درصد هم‌پوشانی و ۹۹ درصد شباهت به گونه (AM228826) *S. australis* (Diéguez-Uribeondo *et al*. 2007) و همچنین با ۹۸ درصد هم‌پوشانی و ۹۹ درصد شباهت به گونه (DQ393560) *Saprolegnia* sp. (Hulvey *et al*. 2007) این جدایه در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر ناحیه ای‌تی‌اس در کنار *S. australis* قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استراپ میزان اطمینان از پدید آمدن این تبار حاوی این گونه برابر با ۹۹ درصد بود.

با وجود خالص‌بودن جدایه‌های این گونه، در محیط آب و شاهدانه سترون شکل‌های متنوعی از اسپورانژیوم با لوله تخلیه زئوسپور بسیار بلند مشاهده شد. بررسی کلید توصیف گونه (Khulbe 2001) و مقالات مختلف در مورد گونه‌هایی که اخیرا توصیف شده‌اند، نشان داد که این شکل‌های اسپورانژیوم منحصربه‌فرد هستند. واکاوی‌های فیلوژنتیکی در مورد این گونه نشان داد که جدایه مورد بررسی از نظر توالی ناحیه فاصله ترانویسی شده داخلی ژن اران‌ای ریبوزومی به گونه R.F. Elliott 1968 *S. australis* و یک گونه توصیف نشده دیگر، شباهت بسیار زیادی دارد. به دلیل همین قرابت، نام موقت *Saprolegnia* aff. *australis* به آن داده شد. مقایسه ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های این پژوهش با گونه *S. australis* در پژوهش الیوت (Elliott 1968) نشان داد که تفاوت‌های ریخت‌شناختی بارزی بین آن‌ها وجود دارد. مهم‌ترین تفاوت به شکل اسپوانژیوم‌ها مربوط می‌شود. جدایه‌های این پژوهش دارای اسپوانژیوم‌هایی با شکل‌های متنوع از استوانه‌ای تا قلبی شکل و رشته‌ای متورم با لوله تخلیه زئوسپور بسیار بلند بودند (شکل ۱، B)، در صورتی که در توصیف *S. australis*، اسپورانژیوم این گونه فقط دارای شکل استوانه‌ای است. تفاوت دیگر مربوط به تعداد اُآسپورهای موجود در اُآگونیوم می‌شود. میانگین تعداد اُآسپورها در *S. australis*، ۱۴ عدد ذکر شده است، در حالی که این تعداد در جدایه‌های پژوهش حاضر به ۲۰ عدد هم می‌رسید. میانگین طول اسپورانژیوم در جدایه‌های بررسی شده ۲۳۶/۱۷

www.SID.ir

Archive of SID

میکرومتر بود، در حالی که در *S. australis* طول اسپورانژیوم ۱۰۰-۲۰ میکرومتر است. با توجه به مطالب ذکر شده، جدایه‌های توصیف شده در بالا احتمالا مربوط به یک گونه جدید و توصیف نشده هستند.

Saprolegnia sp.

جدایه‌های مربوط به این آرایه از کرمانشاه و از برگ‌ها و مواد آلی شناور در سطح اب‌های منطقه سراب قنبر جداسازی شد. ریسه‌های این شبه‌قارچ ضخیم و دارای میانگین طول ۵۷/۷ میکرومتر و عرض ۸۷-۵۳ میکرومتر بود. اسپورانژیوم‌ها معمولا خمیده و ضخیم دارای میانگین قطر ۳۲۳/۸۳ میکرومتر، دارای پستانک و استوانه‌ای، اُاگونیوم به میزان فراوان با میانگین قطر ۹۷/۶۸ میکرومتر، اغلب کروی، انتریدیوم معمولا تک‌بُن و طویل، اُاسپورها به تعداد ۷-۴ عدد در هر اُاگونیوم است (شکل ۱، E و جدول ۲).

تعداد نوکلیوتیدهای ناحیه ای‌تی‌اس این جدایه ۷۰۴ جفت‌باز بود. جست‌وجوی این توالی در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن نشان داد که این جدایه با ۹۸ درصد هم‌پوشانی و ۱۰۰ درصد شباهت به *Saprolegnia* sp. (FJ794908) (Wolinska *et al*. 2009) و با ۹۸ هم‌پوشانی و ۹۹ درصد شباهت به *S. mixta* (EF126339) (Belbahri *et al*. 2006) نزدیک است. این جدایه در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر ناحیه ای‌تی‌اس در تباری جداگانه در کنار گونه‌های *S. ferax* (AM228788)، *S. mixta* (EF126339) و *S. diclina* (EU240107) قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استراپ میزان اطمینان از پدید آمدن این تبار برابر با ۸۴ درصد بود.

شکل متفاوت اسپورانژیوم که به صورت رشته‌ای متورم و خمیده و مهم‌تر از همه، منشعب بودن اسپورانژیوم و عدم وجود اُاگونیوم گلابی شکل، رشته‌ای و یا بیضوی این گونه را از آرایه خواهری آن یعنی گونه *S. ferax* تفکیک می‌کند (Khulbe 2001). تک‌بُن بودن انتریدیوم نیز باعث تفکیک این گونه از دیگر عضو این گروه یعنی *S. diclina* می‌شود (Khulbe 2001). همچنین، شکل منحصربه‌فرد انتریدیوم که مانند اسپورانژیوم برخی از گونه‌ها به صورت رشته‌ای متورم است، یکی از دلایلی است که باعث شد در این پژوهش، این گونه به عنوان یک گونه احتمالا توصیف نشده در نظر گرفته شود (شکل ۱، E). نتایج واکاوی فیلوژنتیکی نیز نشان داد که این گونه بیشترین شباهت را به گونه‌ای از *Saprolegnia* دارد (Wolinska *et al*. 2009) که در مورد آن هیچ گونه توصیف ریخت‌شناسی انجام نشده تا بتوان آن را با جدایه‌های پژوهش حاضر مورد مقایسه قرار داد و لذا شناسایی منحصرا براساس مطالعات مولکولی بوده است. نتایج مطالعات فیلوژنتیکی جدایه‌های استان کرمانشاه با پژوهش مذکور (Wolinska *et al*. 2009) مشابه بود یعنی در هر دو این گونه توصیف نشده در کنار آرایه‌های خواهری خود یعنی *S. ferax* و *S. diclina* قرار گرفتند. شناسایی و توصیف دقیق‌تر این گونه نیاز به مطالعات ملکولی و ریخت‌شناسی بیشتر دارد.

Saprolegnia parasitica Coker 1923

جدایه‌های این گونه بیمارگر آبزیان، از تخم و پوست ماهی‌های بیمار در استخرهای پرورش ماهی در مناطق شش‌پیر و دلخان از شهرستان سپیدان جداسازی شد (جدول ۱). ریسه‌های این گونه بسیار قطور و به طور میانگین ۴۸/۲۴ میکرومتر قطر داشتند. اسپورانژیوم بسیار فراوان، استوانه‌ای و مستقیم دارای میانگین طول ۷۷/۶۹ میکرومتر و میانگین قطر ۸۰-۱۵ میکرومتر بودند. اُاگونیوم با دیواره صاف با میانگین قطر ۷۰/۶۴ میکرومتر، تعداد اُاسپورها ۸-۵ عدد در هر اُاگونیوم، انتریدیوم‌ها تک‌بُن، منشعب، به تعداد ۷-۱ انتریدیوم به ازای هر اُاگونیوم بود (شکل ۱، C و جدول ۲).

گونه *S. parasitica* یکی از مهم‌ترین گونه‌های بیمارگر آبزیان به خصوص ماهیان قزل‌الا (*Oncorhynchus mykiss*) در سراسر جهان است (Neish & Hughes 1980). اهمیت این گونه به قدری است که در اکثر بازدیدهای این پژوهش از نقاط مختلف استان فارس، مشاهده شد که اکثر استخرهای پرورش ماهی در این استان به علت الودگی به این گونه بیمارگر تخلیه شده‌اند. گزارش‌های بسیاری از این گونه در ایران موجود است که بیشتر مربوط به جداسازی این گونه از تخم ماهیان مبتلا به بیماری ساپرولگنیازیس است (Ebrahimzadeh Mousavi *et al*. 2007, Ghiasi *et al*. 2010, Ghiasi *et al*. 2014). ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جدایه‌های استان فارس با گزارش‌های موجود از این گونه در ایران کاملا مطابقت داشت.

Achlya americana Humphery 1893

جدایه‌های این گونه از برگ‌ها و مواد آلی شناور در سطح برکه‌ای در منطقه سربست از شهرستان سپیدان استان فارس جداسازی شد. ریسه‌های این جنس بسیار قطورتر از گونه‌های *Saprolegnia* است و دارای میانگین قطری معادل ۸۷/۸۳ میکرومتر، بلند و مستقیم و استوانه‌ای شکل، اسپورانژیوم فراوان، بسیار طویل با طول ۳۳۹/۱۴ میکرومتر و قطر ۱۰۰-۷۰ میکرومتر بود. نحوه تخلیه زئوسپورها با جنس

www.SID.ir

Archive of SID

Saprolegnia متفاوت است، به این صورت که زئوسپورها پس از تشکیل در اسپورانژیوم از آن جا خارج شده در سر اسپورانژیوم تجمع یافته و سپس آزاد می‌شوند. به این شکل خاص از تخلیه که ویژگی جنس *Achlya* است، Achlyoid گفته می‌شود (Khulbe 2001). اُاُگونیوم با دیواره صاف با میانگین قطر ۶۲/۴۳ میکرومتر، تعداد اُاُسپورها ۸-۵ عدد در هر اُاُگونیوم، انتریدیوم‌ها تک‌بُن، منشعب، به تعداد ۷-۱ انتریدیوم به ازای هر اُاُگونیوم است (شکل ۱، G و جدول ۲).

بررسی منابع علمی موجود نشان داد که این گونه، گزارشی جدیدی برای ایران است. نحوه آزادسازی زئوسپورها و ریسه‌های بسیار قطور باعث تمایز جنس *Achlya* از جنس *Saprolegnia* می‌شود (Khulbe 2001). وجود اُاُگونیوم‌های فراوانی که در طول ریسه‌های قطور به طور منظم قرار می‌گیرند، انتریدیوم‌های منشعب و تک‌بُن از ویژگی‌های بارز این گونه است (Khulbe 1980) (شکل ۱، G) که این ویژگی‌ها در جدایه‌های این گونه از استان کرمانشاه مشاهده شد. علاوه بر شباهت‌های ذکر شده، تفاوت‌های در ویژگی‌های ریخت‌سنجی مشاهده شد به عنوان مثال، قطر اسپورانژیوم جدایه‌های این پژوهش، ۱۰۰-۷۰ میکرومتر بود در حالی در کلید توصیفی این گونه این مقدار ۶۰-۱۵ میکرومتر گزارش شده است. سایر ویژگی‌های با توصیف موجود در کلید شناسایی مطابقت داشت.

نتایج این پژوهش نشان داد که بهترین فصل نمونه‌برداری برای جداسازی شبه‌قارچ‌های آبزی تیره *Saprolegniaceae*، فصول پاییز و زمستان است. مهم‌ترین عامل در جداسازی این شبه‌قارچ دما است و بهترین درجه حرارت برای جداسازی جدایه‌های این جنس، ۱۵ تا ۱۸ درجه سلسیوس است (Markovskaja 2006). براساس نتایج حاصل از این پژوهش، تنوع گونه‌های مورد بررسی وابسته به تنوع بوم‌شناختی مناطق نمونه‌برداری بود، به طوری که نوع گونه‌ها در آب‌های راکد، چشمه‌ها و باتلاق‌ها با هم متفاوت بود. براساس مشاهدات این پژوهش، به دلیل آب و هوای گرم و خشک استان فارس، نمونه‌برداری از مناطق مختلف در این استان نتایج رضایت‌بخشی نداشت و تنها جدایه‌های محدودی از شهرستان سپیدان، با آب و هوای خنک‌تر از میانگین استان، جداسازی شدند. به همین دلیل استان کرمانشاه با داشتن آب و هوای خنک‌تر و منابع آبی متعدد برای نمونه‌برداری انتخاب شد و تعداد زیاد از جدایه‌های به دست آمده مربوط به این استان بود.

براساس بررسی منابع مختلف در این پژوهش، مطالعات انجام شده در مورد شبه‌قارچ‌های تیره *Saprolegniaceae* در ایران بسیار اندک است و این پژوهش نخستین مطالعه در مورد استرامنوپیل‌های آبزی در ایران محسوب می‌شود. مناطقی از کشور که دارای آب و هوای خنک و منابع آبی مانند چشمه، برکه یا دریاچه هستند، بهترین محل برای جداسازی این شبه‌قارچ‌ها خواهند بود. بنابراین، به دلیل پژوهش‌های کم و انگشت‌شمار در این زمینه، پیشنهاد می‌شود مطالعات ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی جامع‌تری در این زمینه انجام شود. واکاوی ژن ای‌تی‌اس جدایه‌های جنس *Saprolegnia* نشان داد که این جدایه‌ها علی‌رغم تفاوت‌های ریخت‌شناختی بارز، دارای ناحیه ای‌تی‌اس مشابهی بودند. در اغلب مطالعات مولکولی جنس مذکور، تنها از ژن ای‌تی‌اس استفاده شده است. بنابراین، علاوه بر ناحیه ای‌تی‌اس استفاده از سایر ژن‌ها مانند زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی (*COX I*) (Robideau *et al.* 2011)، زیرواحد دو سیتوکروم اکسیداز سی (*COX II*) و یا ژن بتاتوبولین که در مطالعات فیلوژنتیکی شبه‌قارچ‌های اُاُمیستی دیگر مانند *Pythium* Pringshem موفقیت‌آمیز بوده (Villa *et al.* 2006)، ممکن است در مورد جنس *Saprolegnia* نیز مفید باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از حمایت و پشتیبانی اعضای محترم گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه و همچنین جناب آقای دکتر عباسی معاون محترم آموزشی دانشکده کمال قدردانی را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

Belbahri, L., Oszako, T., Calmin, G. & Lefort, F. 2006. Survey of forest soil fungi and Oomycetes in Poland. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF126339.

Diéguez-Uribeondo, J., Fregeneda-Grandes, J.M., Cerenius, L., Pérez-Iniesta, E., Aller-Gancedo, J.M., Tellería, M.T., Söderhäll, K. & Martín, M.P. 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina-Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. Fungal Genetics and Biology 44(7): 585–601.

Ebrahimzadeh Mousavi, H.A., Hoosseinifard, S.M., Khosravi, A.R., Soltani, M. & Yosefian, M. 2007. Isolation and identification of parasite and saprophyte fungi from fungal affected eggs of the rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) in Mazandaran province. Iranian Journal of Veterinary Research 62(3): 163–168.

Elliott, R.F. 1968. Morphological variation in New Zealand Saprolegniaceae: 2. *Saprolegnia terrestris* Cookson and *S. australis* sp. nov. New Zealand Journal of Botany 6(1): 94–105.

Gandhe, R.V. & Kurne, A. 2003. A new species of Indian watermould *Saprolegnia*. Zoos' Print Journal 18: 127.

Ghiasi, M., Khosravi, A.R., Soltani, M., Binaii, M., Shokri, H., Tootian, Z., Rostamibashman, M. & Ebrahimzademousavi, H. 2010. Characterization of *Saprolegnia* isolates from Persian sturgeon (*Acipencer persicus*) eggs based on physiological and molecular data. Journal de Mycologie Médicale 20: 1–7.

Ghiasi, M., Khosravi, A., Soltani, M., Sharifpour, I., Binaii, M., Ebrahimzadeh Mosavi, H. & Bahonar, A. 2014. Evaluation of physiological aspects and molecular identification of *Saprolegnia* isolates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Caspian trout (*Salmo trutta caspius*) eggs based on RAPD–PCR. Iranian Scientific Fisheries Journal 22(4): 82–92.

Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41: 95–98.

Hulvey, J.P., Padgett, D.E. & Bailey, J.C. 2007. Species boundaries within *Saprolegnia* (Saprolegniales, Oomycota) based on morphological and DNA sequence data. Mycologia 99(3): 421–429.

Jeffers, S.N. & Martin, S.B. 1968. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease 70(11): 1035–1043.

Khulbe, R.D. 2001. A Manual of Aquatic Fungi: Chytridiomycetes & Oomycetes. Daya Publishing House, Delhi, India.

Khulbe, R.D. 1980. Occurrence of watermolds in some lakes of Nainital, Kumaun, Hill, India. Hydrobiologia 74(1): 77–80.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33(7): 1870–1874.

Ke, X.L., Wang, J.G., Gu, Z.M., Li, M. & Gong, X.N. 2009. Morphological and molecular phylogenetic analysis of two *Saprolegnia* sp. (*Oomycetes*) isolated from silver crucian carp and zebra fish. Mycological Research 113(5): 637–644.

Markovskaja, S. 2006. Saprolegniaceae (Peronosporomycetes) in Lithuania II. The genus *Saprolegnia*. Botanica Lithuanica 12(2): 97–112.

Markovskaja, S. 2007. Contribution to the Lithuanian water moulds. New reports of critical *Achlya* (Saprolegniaceae, Peronosporomycetes) species. Botanica Lithuanica 13(1): 39–44.

Masigol, H., Khodaparast, S.A. & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. 2017. The first report of aquatic Oomycetes *Brevilegnia variabilis*, *Achlya* spp. and *Saprolegnia* spp. from Anzali lagoon in Gilan province. Proceedings of the 3rd Iranian

www.SID.ir

Archive of SID

Mycological Congress, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran: 112.

Mirsoleimani Z. & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. 2013. Characterization of *Phytophthora pistaciae*, the casual agent of *pistachio gummosis*, based on host range, morphology and ribosomal genome. Phytopathologia Mediterranea 53: 501–506.

Safdari, M., Mohammadipour, M. & Tajick-Ghanbari, M.A. 2008. *Isoacklya unispora* a new species for microflora of Iran. Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran: 621.

Neish, G.A. & Hughes, G.C. 1980. Diseases of Fishes, Book 6, Fungal Diseases of Fishes. T.W.F. Publications, Neptune, New Jersey, USA.

Robideau, G.P., de Cock, A.W., Coffey, M.D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D.W., Désaulniers, N., Eggertson, Q.A., Gachon, C.M. & HU, C.H. 2011. DNA barcoding of *oomycetes* with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. Molecular Ecology Resources 11(6): 1002–1011.

Sandoval-Sierra, J.V. & Diéguez-Uribeondo, J. 2015. A Comprehensive Protocol for Improving the Description of Saprolegniales (Oomycota): Two Practical Examples (*Saprolegnia aenigmatica* sp. nov. and *Saprolegnia racemosa* sp. nov.). PloS One 10(7): e0132999.

Sandoval-Sierra, J.V., Martín, M.P. & Diéguez-Uribeondo, J. 2014. Species identification in the genus *Saprolegnia* (Oomycetes): defining DNA-based molecular operational taxonomic units. Fungal Biology 118(7): 559–578.

Seymour, R.L. 1970. The genus *Saprolegnia*. Nova Hedwigia 19(1–2): 1–124.

Tajick-Ghanbari, M.A., Safdari, M., Sharifi, R. & Abbasi, V. 2008. A new *Saprolegnia* species for microflora of Iran. Proceedings of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran: 617.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25: 4876–4882.

Van Den Berg, A.H., McLaggan, D., Diéguez-Uribeondo, J. & Van West, P. 2013. The impact of the water moulds *Saprolegnia diclina* and *Saprolegnia parasitica* on natural ecosystems and the aquaculture industry. Fungal Biology Reviews 27(2): 33–42.

Van West, P. 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. Mycologist 20(3): 99–104.

Villa, N.O., Kayeyama, K., Asona, T. & Suga, H. 2006. Phylogenetic relationship of *Pythium* and *Phytophtora* species Based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β-tubulin gene sequences. Mycologia 98: 410–422.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. *In*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. eds). Academic Press, San Diego. USA.

Wolinska, J., Giessler, S. & Koerner, H. 2009. Molecular identification and hidden diversity of novel *Daphnia parasites* from European lakes. Applied and Environmental Microbiology 75(22): 7051–7059.

www.SID.ir