بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی و شناسایی مولکولی نمونه های ساپرولگنیای جداسازی شده از تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی آزاد دریای خزر(*Salmo trutta caspius*) به روش RAPD – PCR

مریم قیاسی[۱]*، علیرضا خسروی[۲]، مینو سلطانی[۳]، محمد بینایی[۴]، عیسی شریف پور[۵]، حسینعلی ابراهیم زاده موسوی[۶]، علیرضا باهنر[۷]

*Ghiasimaryam4@gmail.com

۱و ۴– پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

۲،۳، ۶ و ۷ – دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۵ – موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲**

چکیده

جنس ساپرولگنیا یکی از مهمترین قارچهای آبزی بیماریزا در ماهیان پرورشی و وحشی است. در این مطالعه از تخمهای ماهیان قزل آلای رنگین کمان و آزاد دریای خزر آلوده به قارچ در مرکز بازسازی ذخائر آزاد ماهیان (شهید باهنر کلاردشت) نمونه برداری گردید. پس از کشت و خالص سازی،۱۶ جدایه ساپرولگنیا (۸ نمونه از تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان که بصورت R2 تا R9 و ۸ نمونه از تخم ماهی آزاد دریای خزر که بصورت S2 تا S9 کد گذاری شدند) بدست آمد. در آزمایشات مولکولی جهت مقایسه نمونه های ساپرولگنیاهای اخذ شده از دو نمونه DNA تاییدشده شامل ساپرولگنیا پارازیتیکا (ACTT # 200048) (*Saprolegnia parasitica*) با کد R1 و ساپرولگنیا دیکلینا (ACTT # 4206)(*Saprolegnia diclina*) با کد S1 در آزمایشات RAPD – PCR استفاده گردید. براساس ضریب تشابه بدست آمده، نمونه ها به سه گروه تقسیم شدند و ضریب شباهت در بین اعضاء هر گروه بیش از ۹۰٪ بود. بر اساس ضریب شباهت، نمونه های هم گروه نمونه رفرانس،گونه مشابه در نظر گرفته شد. بطوریکه اعضا گروه ۱ ساپرولگنیا پارازیتیکا، اعضا گروه ۳ ساپرولگنیا دیکلینا و اعضا گروه ۲ شناسایی نگردید. تمام نمونه ها در دمای ۱۲ درجه سانتیگراد رشد داشتند لیکن در دمای ۱۸ درجه رشدشان بسیار کندی بود. همچنین در بین نمونه ها اختلاف سرعت رشد نیز وجود داشت که کمترین سرعت رشد مربوط به S8 و R2 بود. در ارزیابی میکروسکوپیک ۷۸٪ از نمونه های ساپرولگنیای تخم ماهی قزل آلا و ۵۵/۵٪ ساپرولگنیای تخم ماهی آزاد قابلیت تولید گامه متوالی داشتند. از سوی دیگر پدیده تولید نسلهای متوالی زئواسپور ثانویه در تمام اعضا گروه ۱ مشاهده شد. لیکن این پدیده در دو گروه دیگر مشاهده نگردید. این مطالعه نشان میدهد که بهترین روش شناسایی برای گونه های ساپرولگنیا روشهای مولکولی است و باید به عنوان یک روش مکمل تایید کننده در کنار سایر روشهای شناسایی مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی این گروه از قارچها مورد استفاده قرار گیرد.

لغات کلیدی: قارچ های بیماریزا ، آزاد ماهیان، بیماریهای آبزیان

*نویسنده مسئول

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

ساپرولگنیا (Saprolegnia) یکی از مهمترین جنس های کپک های آبی است که موجب عفونت های قارچی در ماهیان آب شیرین و مزارع تکثیر و پرورش است. از این نظر میتوان به گونه های ساپرولگنیا پارازیتیکا (*S. parasitica*)، ساپرولگنیا دیکلینا (*S. diclina*)، ساپرولگنیا فراکس (*S. ferax*)، ساپرولگنیا دلیکا (*S. delica*) و ساپرولگنیا مونیکا (*S. monica*) اشاره نمود. مطالعات نشان میدهد که حضور این قارچها موجب کاهش راندمان تولید لارو در مزارع تکثیر و پرورش میشود که میزان خسارت بسته به درجه حرارت آب، طول دوره انکوباسیون و نوع ماهی از ۹۰ – ۱۰٪ متغییر است (Czeczuga, *et al.*, 1995; Czeczuga, *et al.*, 1996; Cerenius & Soderhall, 1996; Czeczuga & Muszynska, 1997; Bangyeekhun, *et al.*, 2001). هرچند بعضی از گونه ها در آبهای لب شور وجود دارند لیکن شوری بیشتر از ۲/۸٪ انتشار این قارچها را محدود میکند و لذا بیشترین خسارات ناشی از این قارچها در آبهای شیرین و ماهیان عادت یافته به این محیط ها ایجاد می شود(Ribeiro, 1983). معمولا بروز ساپرولگنیازیس در دمای کمتر از ۱۸ درجه سانتیگراد روی میدهد و بیشترین بروز آن در ۱۰ درجه سانتیگراد می باشد (Yuasa & Hatai, 1995; Kitancharoen, *et al.*, 1997; Czeczuga & Muszynska, 1999).

در گذشته شناسایی گونه های ساپرولگنیا صرفا بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و ساختار تولید مثلی جنسی مانند آنتریدیوم (antheridia)، اووگونیوم (oogonia) و اوواسپور (oospore) بود. لیکن بعضی از جدایه های پاتوژن ساپرولگنیا قادر به ایجاد ساختار تولید مثلی جنسی در محیط کشت نیستند (Beakes, 1982). بنابراین بعدها در کنار خصوصیات ریخت شناسی، از تغییرات موجود در الگوی ایزوآنزیم های استراز (Beakes & Ford, 1983)، تفاوت در دامنه رشد کلنی (مهرآوران ۱۳۷۲) و آزمایشات مربوط به توانایی مصرف کربوهیدراتها و اسیدهای آمینه به عنوان منابع کربن و نیتروژن (Kitancharoen & Hatai, 1998)جهت شناسایی قطعی نمونه های ساپرولگنیا استفاده شد.

در بین روشهای مختلف، PCR-RFLP یکی از مهمترین روشها در جهت شناسایی گونه های ساپرولگنیا است و از آن به راحتی برای تشخیص تفریقی ساپرولگنیا پارازیتیکا از ساپرولگنیا دیکلینا که خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیکی بسیار نزدیکی به هم دارند استفاده می‌گردد. تکثیر DNA در PCR با استفاده از الیگونوکلوتیدهای تصادفی به عنوان پرایمر یا روش RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) روشی حساس در ارزیابی درجه تفاوت ژنتیکی بین جدایه ها یا سویه های مختلف قارچی و یا دیگر میکروارگانیسم ها است. این روش ابزاری مفید در ایجاد یک نمای ژنتیکی منحصر بفرد از یک گونه معین است. لذا RAPD – PCR روشی انتخابی در تحقیقات اپیدمیولوژیکی است (Hung, *et al.*, 1994; Diguez-Uribeondo, *et al.*, 1996). این روش نیازمند هیچ دانش قبلی از سکانسها ی DNA ارگانیسم مورد مطالعه نیست و با افزایش تعداد پرایمرهای مورد استفاده در واکنش، حجم بالایی از پلی مورفیسم DNA را میتواند نشان دهد که اجازه خواهد داد مقایسه ژنتیکی آسانی بین نمونه ها یا گروه های وابسته صورت گیرد(Bangyeekhun, *et al.*, 2001; Bangyeekhun, *et al.*, 2003).

در این تحقیق برای نخستین بار در کشور تلاش شده تا با ارزیابی شاخص های فیزیولوژیکی چون ارزیابی سرعت رشد کلنی، مقاومت حرارتی، تولید گامه های متوالی (catenulated gammea) و تولید متوالی زئواسپور ثانویه در کنار روش RAPD – PCR شناخت دقیقتری از نمونه های ساپرولگنیا بدست آمده از هچری ماهیان قزل آلا و آزاد دریای خزر بدست آید.

مواد و روش کار

نمونه برداری از هچری ماهیان قزل الای رنگین کمان و آزاد دریای خزر واقع در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت در فصل تکثیر طی دو نوبت انجام شد. نمونه برداری از دو مرحله تکثیر و در روز ۳۰ تکثیر انجام شد. برای اینکار تعداد ۵ تراف حاوی چهار سینی بصورت تصادفی از کل ترافهای موجود انتخاب و از هر تراف تعداد ۴۰ عدد تخم قارچ زده با پنس استریل برداشته، به ظروف پلاستیکی درپوش دار حاوی آب مقطر استریل و کلرافنیکل به میزان $10 mgL^{-1}$ منتقل و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه، در شرایط استریل محتویات تخمها تخلیه و پس از شستشو با آب مقطر استریل پوسته ها بصورت تلقیحی در محیط کشت گلوکز یست اکستراکت آگار (GYA) حاوی آنتی بیوتیک(کلرامفنیکل $50 mgL^{-1}$ و جنتامایسین $400 mgL^{-1}$)

Archive of SID

www.SID.ir

کشت داده و در دمای ۱۴ – ۱۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ – ۳ روز گرمخانه گذاری شدند. پس از این مرحله از نمونه های خالص جهت خالص سازی از هر نمونه در محیط GYA کشت به عمل آمد و تا کامل شدن رشد پرگنه در حرارت ۱۴ – ۱۲ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد(Kitancharoen, *et al*., 1997).

از هر نمونه خالص در دو پلیت سابرودکستروز آگار ۴٪ (SDA)کشت داده شد. یک پلیت اول در حرارت قبلی و پلیت دوم جهت مطالعه مقاومت حرارتی در ۲۰ – ۱۸ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. سرعت رشد پرگنه ها در پلیتهای گروه اول بطور روزانه ثبت و گرمخانه گذاری تا زمان کامل شدن رشد پرگنه (۶روز) انجام شد. در گروه دوم نیز وضعیت رشد پرگنه ها روزانه بررسی و گرمخانه گذاری به مدت ۱۵ روز انجام شد(Bangyeekhun, *et al*., 2001; Bangyeekhun, *et al*., 2003).

از پرگنه های خالص شده مقدار ۰/۵ گرم برداشت و به لوله های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر گلوکز یست اکستراکت براث(GYB) انتقال داده و سه روز در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. پس از این مرحله میسلیومها با آب استریل شده ورودی هچری شستشو داده شده و در ظروف پتری حاوی ۱۵ میلی لیتر از همان آب طی ۱۴ ساعت در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. سپس محتویات ظروف پتری به لوله های آزمایش منتقل شده و به مدت ۴۵ ثانیه ورتکس شد. پس از این مدت لوله های فوق به مدت ۱۵۰ دقیقه در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری و با تهیه لام از محتویات آنها آزاد شدن زئواسپورهای ثانویه در زیر میکروسکوپ بررسی شد (Diguez-Uribeondo, *et al*., 1996).

مقدار ۰/۵ گرم پرگنه خالص به لوله در پیچ دار حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت پوتیتو دکستروز براث (PDB) منتقل و در انکوباتور شیکر دار در حرارت ۲۰ – ۱۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ – ۵ روز گرمخانه گذاری گردید. پس از رشد، توده قارچی بدست آمده از محیط کشت جدا و ۵ – ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو و با کاغذ واتمن استریل خشک شدند و به میکروتیوبهای استریل ۱/۵mL منتقل و کد مربوطه آن ثبت گردید. کدهای R2 تا R9 برای نمونه های قزل آلا و کدهای S2 تا S9 برای ماهی آزاد دریای خزر ثبت گردید. پس از افزودن ازت مایع به نمونه در هاون چینی و خرد کردن آن در هاون، با استفاده از فنل – کلروفورم- ایزوآمیل الکل، DNA استخراج گردید (Diéguez-Uribeond, *et al*., 1996).

جدول ۱: برنامه حرارتی استفاده شده در آزمایشات RAPD-PCR

برنامه	حرارت	زمان	هدف	دفعات تکرار
۱	۹۵° C	۵ دقیقه	از هم باز شدن دو رشته اصلی DNA	۱
۲	۹۴° C	۴۵ ثانیه	از هم باز شدن دو رشته DNA هدف	۴۰
	۳۸° C	۴۵ ثانیه	چسبیدن پرایمر به هر رشته DNA	
	۷۲° C	۹۰ ثانیه	تاثیر آنزیم و سنتز DNA	
۳	۷۲° C	۱۰ دقیقه	طویل شدن تمامی پرایمرها و سنتز رشته های DNA در حداکثر ممکن	۱

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA (حدود ۱/۲ میکرولیتر)، ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس(شرکت سیناژن)، ۰/۴ میکرومول پرایمر(حدود ۱/۳ میکرولیتر)(شرکت سیناژن) و ۱۰میکرولیتر آب مقطر انجام شد. واکنش RAPD-PCR در دستگاه ترموسایکلر(Biotech،آلمان) تحت برنامه حرارتی (جدول ۱) و با استفاده از پنج پرایمر به شرح ذیل انجام شد:

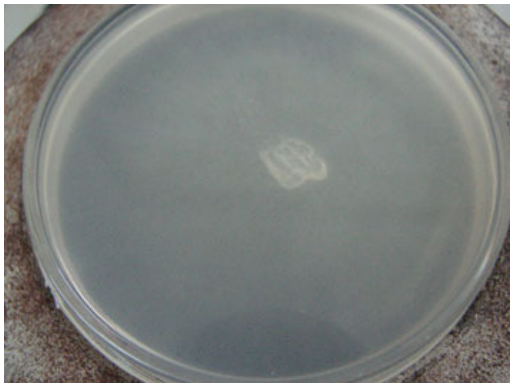
A10 (5′ - GTG ATC GCA G -3′) ، OPU13 (5′ - GGC 5′) ، OPT20 (5′-GAC CAA TGCC-3′) ، (TGG TTC C -3′ 5′) ، FM1 P10(- GAC AGA CGC G -3′ 5′ - AGC CGC (CTC CAT GGC CCC AGG -3′

جهت مقایسه نمونه های ساپرولگنیاهای اخذ شده از دو نمونه DNA تاییدشده شامل *S. Parasitica* (ACTT # 200048) و *S. diclina* (ACTT # 4206) به ترتیب با کد R1 و S1 در آزمایشات RAPD – PCR استفاده شدند. در پایان ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR و مارکر ۱۰۰bp روی ژل آگاروز ۱/۵٪ در دستگاه الکتروفورز قرار گرفت. سپس ژل با اتیدیوم برومایدرنگ آمیزی و در دستگاه مولد نور ماوراء بنفش (ترانس ایلومیناتور) قرار گرفته و از آن عکسبرداری گردید(Ghiasi, *et al.*, 2010).

جهت آنالیز آماری محصولات RAPD از حرکت نسبی باند ها استفاده و جدول ماتریس صفر و یک بر اساس وجود یا عدم وجود باند رسم گردید. با استفاده از جدول ماتریس صفر و یک و تجزیه خوشه ای با برنامه SPSS به روش UPGM و بر اساس الگوی چند شکلی DNA محصولات RAPD بطور ترکیبی آنها انجام گرفت. دوری و نزدیکی سویه ها با توجه به ضریب شباهت آنها بررسی گردید.

نتایج

در محیط GYA، قوام کلنی پرزی کوتاه بود و میسلیوم ها به شدت در داخل محیط کشت نفوذ کرده بودند. رنگ کلنی در سطح و پشت سفید و کلنی حالتی شفاف داشت، بطوریکه برای دیدن حاشیه کلنی لازم بود در مقابل نور مشاهده شود (شکل ۱ و ۲). در محیط SDA، کلنی کاملا سفید گچی و پرزی کوتاه بود. رنگ کلنی در سطح و پشت سفید بود(شکل ۳ و ۴). در بین تمام نمونه ها هیچ تفاوت از نظر ظاهری در بین پرگنه های جدا شده مشاهده نگردید. در بررسی میکروسکوپیک نمونه های کشت داده شده در محیط کشت در انتهای ریسه ها(hyphea) گامه های متعدد و متوالی(حداقل ۲ تا حداکثر۴ گامه) مشاهده شد. این خصوصیت به ترتیب در ۷۸٪ و ۵۵/۵٪ جدایه های بدست آمده از ماهی قزل آلا و ماهی آزاد دیده شد(شکل ۵ و ۶).



شکل ۱: نمای رویی کلنی خالص ساپرولگنیا در محیط GY

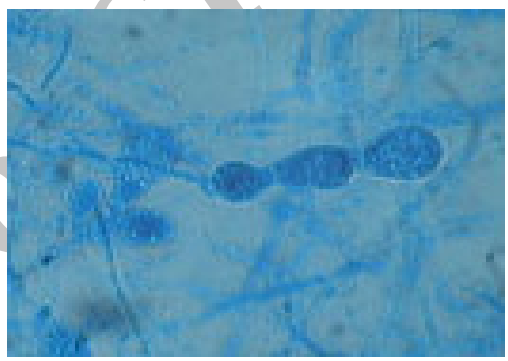
شکل ۲: نمای پشتی کلنی خالص ساپرولگنیا در محیطGY

شکل ۳: نمای رویی کلنی خالص ساپرولگنیا در محیط SD

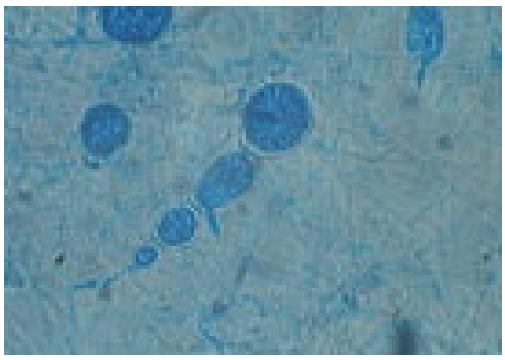
Archive of SID

www.SID.ir

شکل۴: نمای پشتی کلنی خالص ساپرولگنیا در محیط SD

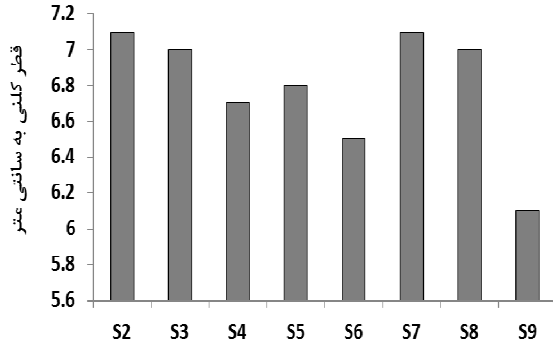


شکل ۵ : گامه متوالی در نمونه R9

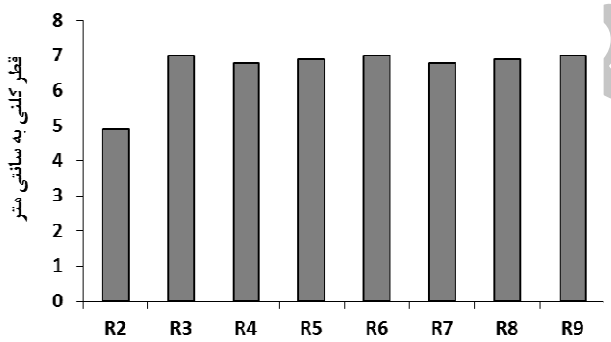


شکل ۶: گامه متوالی در نمونه S4

نتایج ارزیابی سرعت رشد نشان داد که در بین نمونه های بدست آمده از تخم ماهیان قزل آلا (نمودار ۱)، کمترین رشد مربوط به نمونه R2 و در نمونه های ماهیان آزاد (نمودار ۲)کمترین رشد مربوط به S9 بود. تمامی جدایه های بدست آمده از تخم ماهیان قزل آلا و ماهی آزاد در درجه حرارت ۲۰ – ۱۸ درجه سانتیگراد رشد بسیار کندی داشتند، بطوریکه پس از ۱۴روز قطر کلنی آنها به حدود ۵ – ۴ سانتیمتر رسید.



نمودار ۱: مقایسه قطر کلنی های R2 تا R9 طی۶ روز



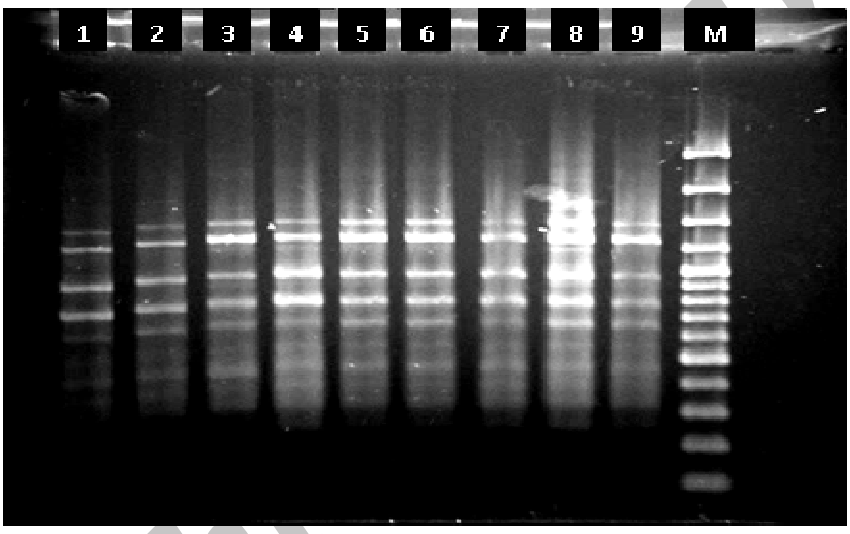
نمودار ۲: مقایسه قطر کلنی های S2 تا S9 طی۶ روز

تولید متوالی زئواسپور قابلیتی است که از یک اسپور کیست دار شده نسل جدیدی از زئواسپور ایجاد میگردد. این قابلیت در اعضاء گروه ۱ مشاهده شد. در این نمونه ها در حدود ۹۰ – ۸۵٪ کیستهای اولیه، زئواسپور ثانویه جدید ایجاد کردند. جدایه های

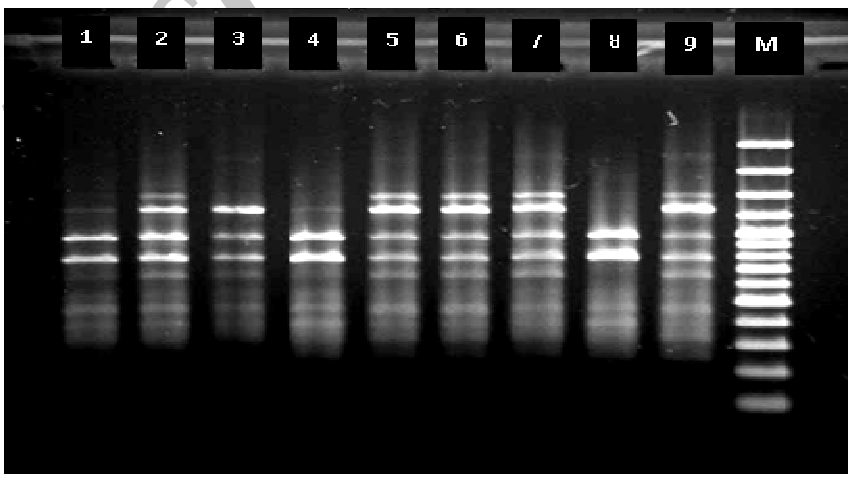
www.SID.ir

موجود در این گروه ها توانستند تا ۳ نسل زئواسپور جدید تولید کنند. این قابلیت در گروه ۲ تنها در نمونه S4 مشاهده شد یعنی این جدایه همزمان با تولید زئواسپور ثانویه جدید قابلیت تولید هایف رویشی را نیز داشت. لیکن اعضا گروه ۳ فاقد این قابلیت بوده و از اسپورهای ثانویه انها فقط هایف زایا تولید شد، بطوریکه در همان مراحل اولیه طول هایف زایای ایجاد شده به اندازه قطر ۳ تا ۵ کیست بود.

در مجموع ۲۵۳ باند واضح PCR در ۱۷ موقعیت مختلف بدست آمد که ۵ موقعیت در بین تمام نمونه ها مشترک بود. تعداد موقعیتهای مشترک در نمونه های بدست آمده از ماهی قزل آلا و ماهی آزاد به ترتیب ۱۴ و ۱۱ مورد بود.



شکل ۷ : نتیجه حاصل از RAPD – PCR در نمونه های S1 تا S9 با پرایمر FM1



شکل ۸: نتیجه حاصل از RAPD – PCR در نمونه های R1 تا R9 با پرایمر FM1

www.SID.ir

تعداد باندهای ایجاد شده توسط پرایمرهای مختلف به ترتیب برای پرایمرهایOPT20 ۳ عدد (2100, 1714, 745bp)، OPU13 ۳عدد(1759, 1360, 1039) ، FM1 ۵ عدد(1432, 1276, 968, 787bp) (شکل ۷ و ۸)، A10 ۶ عدد (2981, 1361, 1015, 785, 607, 328bp) و برای P10 ۷ عدد (2530, 1889, 1338, 1233, 900, 659, 518bp) بود. اندازه باند های بدست آمده از حداقل ۳۲۸ bp تا حداکثر ۲۹۸۱ bpبوده و ۵۷/۷٪ باندهای تولید شده بیشتر از ۱۰۰۰bp وزن داشتند. اطلاعات مربوط به ضریب شباهت نمونه های مختلف در جدول ۲ آمده است.

جدول۲: ضریب تشابه جدایه های ساپرولگنیا بر اساس پروفایل RAPD-PCR

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	S2	S5	S6	S7	S9	S4	S8	S1	S3
R1	1																	
R2	0.93	1																
R3	1	0.93	1															
R4	0.93	1	0.93	1														
R5	0.98	0.91	0.98	0.91	1													
R6	0.91	0.93	0.91	0.93	0.88	1												
R7	0.91	0.93	0.91	0.93	0.88	0.91	1											
R8	0.93	0.96	0.93	0.96	0.91	0.93	0.98	1										
R9	0.91	0.93	0.91	0.93	0.88	0.91	0.95	0.98	1									
S2	0.93	0.95	0.93	0.9	0.88	0.88	0.88	0.91	0.88	1								
S5	0.98	0.91	0.98	0.91	0.95	0.88	0.93	0.95	0.93	0.9	1							
S6	0.98	0.91	0.98	0.91	0.95	0.88	0.88	0.91	0.88	0.95	0.95	1						
S7	0.93	0.91	0.93	0.91	0.9	0.88	0.93	0.95	0.93	0.9	0.95	0.95	1					
S9	0.95	0.93	0.95	0.93	0.93	0.91	0.95	0.98	0.95	0.93	0.98	0.93	0.93	1				
S4	0.6	0.63	0.6	0.69	0.63	0.6	0.6	0.7	0.6	0.62	0.65	0.64	0.61	0.6	1			
S8	0.66	0.6	0.63	0.6	0.61	0.61	0.69	0.6	0.63	0.61	0.64	0.66	0.65	0.61	0.91	1		
S1	0.61	0.65	0.67	0.62	0.7	0.65	0.63	0.7	0.64	0.6	0.61	0.65	0.63	0.65	0.7	0.7	1	
S3	0.61	0.65	0.67	0.62	0.7	0.65	0.63	0.7	0.64	0.6	0.61	0.65	0.63	0.65	0.7	0.68	0.93	1

جدول۳: گروه بندی جدایه های ساپرولگنیا *Saprolegnia* sp. بر اساس ضریب شباهت بدست آمده از آنالیز آزمایشات RAPD-PCR

شماره گروه	اعضاء	متوسط ضریب شباهت
گروه ۱	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, S2, S5, S6, S7, S9	٪۹۴/۵
گروه ۲	S4, S8	٪۹۳/۴
گروه ۳	S1, S3	٪۹۳/۹

براساس ضریب تشابه بدست آمده، تمامی نمونه ها به ۳ گروه تقسیم شدند(جدول ۳). ضریب شباهت در بین اعضاء هر گروه بیش از ۹۰٪ بود و نمونه های هم گروه با DNA استاندارد، نمونه مشابه آن شناسایی شد.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

سابقه شناسایی عوامل قارچی ایجاد کننده ساپرولگنیازیس در ایران به دهه ۱۳۶۰ باز میگردد. در تمامی این بررسیها که بر روی تخم ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهیان خاویاری(*Acipencer* sp.)، ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus frrissi kutum*) نیز ضایعات قارچی در سطح بدن ماهیان کپور انجام شد و شناسایی عوامل قارچی فقط بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و ساختار تولید مثلی مانند آنتریدیوم، اووگونیوم و ااسپور استوار بوده است(ابراهیم زاده موسوی، ۱۳۷۶؛ حسینی، ۱۳۸۵؛ رهبری و همکاران، ۱۳۶۱؛ سادات اخوی، ۱۳۷۲؛ شریف روحانی، ۱۳۸۴؛ قیاسی و خسروی، ۱۳۸۶؛ Shahbazian *et al*., 2010). در تحقیق حاضر، برای اولین بار شناسایی ایزوله های ساپرولگنیا بدست آمده از تخمهای آلوده قزل آلای رنگین کمان و ماهی آزاد دریای خزر بر اساس ساختار مولکولی صورت گرفت. اطلاعات حاصله در این مطالعه، تنوع ژنتیکی در بین نمونه های بدست آمده را نشان می دهد و آنها را در سه گروه دسته بندی می کند. بزرگترین دسته گروه ۱ است که با نمونه رفرانس ساپرولگنیا پارازیتیکا(*S. parasitica* ATCC # 200048) هم گروه هستند و اعضاء آن ضریب شباهتی بیش از ۹۴٪ دارند. گروه ۳ با نمونه رفرانس ساپرولگنیا دیکلینا (S1 = *S. diclina* ATCC# 4206) هم گروه بوده و ضریب شباهت بین اعضا این گروه بیش از ۹۳٪ بود. از آنجایی که در مطالعات قبلی آزمایشات RAPD-PCR نمونه های هم گروه با نمونه رفرانس که واجد قرابت ژنتیکی بیش از ۸۰٪ بودند را گونه مشابه نمونه رفرانس در نظر گرفته اند(Hung, *et al*., 1994; Bangyeekhun, *et al*., 2001; Bangyeekhun, *et al*. 2003) لذا در این بررسی نیز نمونه های گروه ۱ *S. parasitica* و گروه ۳ *S. diclina* و گروه ۲ *Saprolegnia* sp. شناسایی گردید. اصولا از خصوصیات فیزیولوژیکی گونه های ساپرولگنیا مانند الگوی ایزوآنزیمهای استراز و نیز ارتباط بین دامنه رشد و درجه حرارت جهت طبقه بندی تحت گروه های موجود در یک گونه استفاده میشود(Beakes & Ford, 1983; Hatai, *et al*., 1990). در بررسیهای مربوط به وضعیت رشد مشخص گردید که تفاوتهای موجود از الگوی ژنتیکی بدست آمده تبعیت نمیکند زیرا دو نمونه R2 و R4 با اینکه ۱۰۰٪ قرابت ژنتیکی داشتند و از شرایط یکسان کشت و گرمخانه گذاری برخوردار بودند، سرعت رشد یکسانی نداشتند. همچنین R2 و S9 با بیش از ۹۴٪ ضریب شباهت با سایر اعضا کمترین سرعت رشد را در حرارت مناسب داشتند. از سوی دیگر تمامی نمونه ها در حرارت ۲۰ – ۱۸ درجه سانتیگراد رشدی بسیار کند داشتند بطوریکه پس از ۱۴روز قطر کلنی رشد یافته آنها در حدود ۵ – ۴ سانتیمتر بود. این در حالی است که Ghiasi و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند گونه های پارازیتیکا و دیکلینا جدا شده از تخم ماهیان قره برون در دمای ۱۴ – ۱۲ درجه سانتیگراد هیچگونه رشدی ندارند. به نظر می‌رسد که این مسئله به قابلیت سازگاری مناسب قارچ با شرایط رشد طبیعی آن مرتبط است و بیش از آنکه جنبه ژنتیکی داشته باشد بیشتر به تغییرات در سیتوپلاسم وابسته است (Bangyeekhun, *et al*., 2001; Willoughbay, 1994). نمونه های گروه ۱ (ساپرولگنیا پارازیتیکا) در این بررسی قادر به ایجاد زئواسپورهای متوالی جدید بودند در حالیکه نمونه گروه ۳(ساپرولگنیا دیکلینا) این قابلیت را نداشت. این قابلیت از گونه های قارچی آفانومایسس گزارش شده است و معمولا زمانی اتفاق می افتد که قارچ مکان مناسبی برای جوانه زدن نیابد تا تولید هایف کند. وجود این توانایی محققین را قانع نموده که این روش نوعی سازگاری با زندگی انگلی است(Cerenius & Suderhal, 1996). در مطالعاتی که دیگران در مورد این خصوصیت در نمونه های ساپرولگنیا پارازیتیکا انجام داده اند نتایج متفاوتی بدست آمده است. در بررسی که Dieguez – Uribeondo و همکاران (۱۹۹۶) روی نمونه های ساپرولگنیا پارازیتیکا جدا شده از ضایعات بدن قزل آلا های قهوه ای داشتند متوجه شدند که هیچکدام از نمونه های فوق قادر به ایجاد زئواسپورهای متوالی جدید نیستند.

Bangyeekhun و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادندکه نمونه های ساپرولگنیا پارازیتیکا بدست آمده از گربه ماهیان پرورشی قادر به تولید زئواسپور جدید هستند لیکن نمونه های دیکلینا چنین قابلیتی ندارند. در مطالعه ای دیگر وی و همکاران (۲۰۰۳) در خصوص ساپرولگنیا های بدست آمده از ماهیان قزل آلا و آزاد نواحی مختلف سوئد و فنلاند نشان دادند که اکثر نمونه های ساپرولگنیا و ساپرولگنیا پارازیتیکا جدا شده از ماهیان قزل آلا و آزاد واجد این توانایی نمی باشند. در بررسی دیگری که Dieguez – Uribeondo و همکاران (۲۰۰۷) بر روی بیش از ۱۲۸ نمونه مختلف ساپرولگنیا انجام دادند مشخص شد بعضی نمونه های ساپرولگنیا پارازیتیکا جدا شده از آزاد ماهیان و نیز بعضی نمونه های ساپرولگنیا دیکلینا قابلیت تولید زئواسپور جدید را دارند. با

Archive of SID

www.SID.ir

توجه به اینکه زئواسپورهای ثانویه نسبت به زئواسپور اولیه قدرت تحرک بیشتری دارند و نیز برای مدت طولانی تر متحرک می مانند، نقش اصلی را در ایجاد بیماری دارند(Willouhbay & Copland, 1984; Hatai & Hoshiai, 1994; Espeland, 2004; Van West, 2006). به نظر میرسد که این قابلیت در کلونیزه شدن قارچ در سطح پوست و یا غشاء تخم موثر بوده و موجب گسترش بیشتر آلودگی میگردد.

گامه نوعی اندام تولید مثل غیر جنسی است که در اکثر گونه های ساپرولگنیا ایجاد میشود. در نمونه های بدست آمده مشخص گردید که نمونه های بدست آمده از تخم ماهی قزل آلا بیشترین درصد تولید این اندام را داشته (زنجیره هایی متشکل از ۲ تا ۴ گامه)و بر اساس نتایج حاصل از آزمایشات مولکولی نیز تمام نمونه ها ساپرولگنیا پارازیتیکا تشخیص داده شد. در بررسی که Yuasa و Hatai(۱۹۹۶) بر روی خصوصیات بیولوژیکی نمونه های ساپرولگنیا جدا شده از قزل الای رنگین کمان داشتند متوجه شدند که نمونه های ساپرولگنیا پارازیتیکا از نظر قدرت بیماریزایی به سه گروه حاد(مرگ و میری در حدود ۱۰۰ – ۹۳٪ در لارو قزل آلا)، متوسط (با مرگ و میری حدود ۵۳ – ۳۳٪ در لارو قزل آلا) و خفیف (با مرگ و میری حدود ۹ – ۰٪ در لارو قزل آلا)تقسیم میشوند. مشاهدات آنها نشان داد که گروه اول (گروه حاد) بیش از همه گروه ها گامه های متوالی ایجاد نموده که زنجیره های ایجادی از ۲ تا ۷ گامه را در بر داشته است. آنها نتیجه گرفتند که این خصوصیت ممکن است به قدرت بیماریزایی قارچ مرتبط باشد. به غیر از نوع قارچ وقدرت بیماریزایی آن عوامل بیولوژیک و غیر بیولوژیک متعددی در بروز ساپرولگنیازیس موثر است. در مطالعات مختلف نشان داده شده است آبهای الیگو تروفیک(Oligotrophic) موجب افزایش تنوع عوامل قارچی دخیل در ساپرولگنیازیس میشود. در حالیکه چنین شرایطی در آبهای ائوتروفیک (Eutrophic) وجود ندارد. این مسئله به وضعیت هیدروبیولوژی آب بازمیگردد. در آبهای الیگوتروفیک تنوع پلانکتونی زیاد است ولی جمعیت هر یک از آنها کم است در حالیکه در آبهای ائوتروفیک تنوع پلانگتونی کم بوده ولی بیوماس آنها بسیار زیاد است(Czeczuga & Muszynska, 1999). از آنجایی که منبع آب هچری در این بررسی چشمه(ائوتروفیک) بوده است شاید این دلیلی بر تنوع کم عوامل قارچی جداشده(سه گونه) باشد. این مطالعه نشان داد که در زمینه شناسایی عوامل قارچی بیماریزا که موجب تلفات تخم درمراکز تکثیر ماهیان میگردد از پارامترهای مختلف فیزیولوژیکی و ژنتیکی میتوان استفاده نمود. تفاوتهایی که در فاکتورهای تحت بررسی در نمونه های مختلف مشاهده شد حاکی از گستردگی و پیچیدگی دنیای قارچهای آبزی است. لذا پیشنهاد میگردد که بررسی دقیقتر عوامل قارچی بیماریزا در مراکز تکثیر ماهیان آزاد دریای خزر که از جهت باسازی ذخایر حائز اهمیت هستند و نیز عوامل قارچی بیماریزا در مراکز تکثیر ماهیان قزل آلا که یکی از مهمترین و با ارزش ترین گونه های پرورشی درآبهای داخلی و آبزی پروری است، صورت گیرد.

منابع

ابراهیم زاده موسوی، ح.، ۱۳۷۶. بررسی فلور قارچی کپور ماهیان پرورشی در مجتمع تکثیر و پرورش ماهی سفید رود، پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشگاه تهران، ۱۵۰ صفحه.

رهبری، ص.، ۱۳۶۱. گزارش مواردی از ساپرولگنیازیس ماهیان قرمز حوض در ایران، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵: (۱)۳۸.

سادات اخوی، ر.، ۱۳۷۲. بررسی الودگیهای قارچی تخم تاسماهیان کارگاه تکثیر و پرورش ماهی شهید بهشتی، پایان نامه دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۲۲۲۵، ۱۶۸ صفحه.

مهرآوران، ح.، ۱۳۷۲. مبانی قارچها، انتشارات دانشگاه ارومیه ، چاپ اول، ۵۳۳ صفحه.

Bangyeekhun, E., Pylkko, P., Vennerstrom, P., Kuronen, H. and Cerenius, K., 2003. Perevalence of a single fish – pathogenic *Saprolegnia* sp. Clone in Finland and Sweeden. Disease of Aquatic Organisms, 53: 47–53.

Bangyeekhun, E., Quiniou, S. M. A., Bly, J. E. and Cerenius, K., 2001. Characterization of *Saprolegnia* sp. isolation from channel cat fish. Disease of Aquatic Organisms, 45: 53–59.

Beakes G., 1982. A comparative account of cyst coat ontogeny in saprophytic and fish – lesion (pathogenic) isolates of *Saprolegnia diclina* –

Archive of SID

www.SID.ir

Gancedo J. M., Telleria, M. T., Soderhall, K. and Martin, M. P., 2007. Re-evaluation of the enigmatic species complex *Saprolegnia diclina* – *Saprolegnia parasitica* based on morphological, physiological and molecular data. Fungal Genetic and Biology, 44(7): 585–601.

Espeland, S., 2004. Prevention Saprolegnia on Rainbow trout egg. BSc thesis, Faroe University. Island. 52 pp.

Ghiasi, M., Khosravi, A. R., Soltani, M., Binaii, M., Shokri, H., Tootian, Z., Rostamibashman, M. and 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.

Hatai, K. and Hoshiai, G. I., 1994. Pathogenisity of *Saprolegnia parasitica* Coker. *In:* Muller GJ (Ed), *Salmon saprolegniasis*.University of Washington, Seattle, WA. pp. 87–98.

Hatai, K., Willoughby, L. G. and Beakes, G. W., 1990. Some characteristics in saprolegnia obtained from fish hatcheries in Japan. Mycology Resarch, 94: 182–190.

Huang, T. S., Cerenius, L. and Soderhall, K., 1994. Analysis of genetic diversity in the cray fish plague fungus, *Aphanomyces astaci* by random ampelification of polymorphic DNA. Aquaculture, 24: 1-10**.**

Kitancharoen, N., Hatai, K., 1998. Some biochemical characteristics of isolated from Salmonid eggs. Mycoscience, 39: 249–255.

Kitancharoen, N., Hatai, K. and Yamamoto, A., 1997. Aquatic fungi developing on eggs of salmonids. Journal of Aquatic Animal Health, 9: 314–316.

parasitica compelex. Canadian Journal of Botany, 61: 603–625.

Beakes, G. and Ford, H., 1983. Esterase isoenzyme variation in genus Saprolegnia, with particular reference to the fish pathogenic *Saprolegnia diclina* – *parsiticus* complex. Journal of General Microbialogy, 129(8): 2605–2619.

Cereninus, L. and Soderhall, K., 1996. Saprolegniacea: Zoospore formation, virulence and pathogenesis in animal hosts. *In:* Dayal R (Ed) Advance in zoosporic fungi. MD publication Ltd., New, Dehli. pp. 97–116.

Czeczuga, B. and Muszynska, E., 1997. Aquatic fungi growing on the eggs of some anadromus fish species of the family Clupeidae. Acta Icthyologica et Piscatoria, XXVII (1): 83–93.

Czeczuga, B. and Muszynska, E., 1999. Aquatic fungi growing on the eggs of 33 Cyprinid taxa (*Cyprinideae*) in laboratory condition. Acta Icthyologica et Piscatoria,, XXIV (2): 53–72.

Czeczuga, B., Muszynska, E. and Tryggvadottir, S.V., 1996. Aquatic fungi growing on the eggs on nine salmonid species of the genus Huco, Salmo and Salvelinus. Acta Icthyologica et Piscatoria, XXVI(2): 113–121.

Czeczuga, B., Muszynska, E., Wossughi, G. H., Kamaly, A. G. and Kiziewicz, B., 1995. Aquatic fungi growing on the eggs of several species of Acipenserid fishes. Acta Icthyologica et Piscatoria, XXV (2): 71–79.

Dieguez – Uribeondo, J., Cerenius, L. and Soderhall, K., 1996. Physiological characterization of *Saprolegnia parasitica* isolates from brown trout. Aquaculture, 140: 247–257.

Dieguez – Uribeondo, J., Fregeneda – Grands, J. M., Cerenius, L., Perez– Iniesta, E., Aller–

Archive of SID

www.SID.ir

Iranian Journal of Fisheries Sciences, 9(1): 151-160.

Van West, P., 2006. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: New challenge for an old problem. Mycologist, 20: 99–104.

Willoughbay, G., 1994. Fungi and Fish disease. Pisces press, Stirling, Scottland, 57P.

Willoughby, L. G., Copland, J. W., 1984. The temperature-growth relationship of Saprolegnia pathogenic to fish, especially eels cultivated in warm water. Nova Hedwigia, 39; 35–55.

Ribeiro, O. K., 1983. Physiology of asexual sporolation and spore germination in phytophthora. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao pH (Eds) *Phytophthora*: its biology, taxonomy, ecology and pathology. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press. pp. 55–70.

Shahbazian, N., Ebrahimzadeh, Mousavi, H. A., Soltani, M., Khosravi, A. R., Mirzargar, S., Sharifpour, I., 2010. Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah Province propagations with emphasis on Saprolegniaceae.

Archive of SID

www.SID.ir

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

Ghiasi, M[1]*; lireza Khosravi, A[2]; ino Soltani, M[3]; Sharifpour, I[4], Binaii, M[5], Ebrahimzadeh Mosavi, H[6], Bahonar, A[7]

1,4 – Ecology Research Center of Caspian Sea

2,3,6,7 – Faculty of Veterinary Medicine of Tehran University

5 - Iranian Fisheries Research Organization

Ghiasimaryam4@gmail.com

Received: July 2013 Accepted: October 2013

Key words: Saprolegnia, Physiological aspects, Molecular identification, Rainbow trout. Caspian trout

Abstract

The genus of saprolegnia is one of the most important pathogenic aquatic fungi in farmed and wild fish. In the present study, fungal infected egss were collected from rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) and Caspian trout (*Salmo trutta caspius*). After purification, 16 isolates were obtained (8 isolates from rainbow trout and 8 isolates from Caspian salmon, respectively). The isolates were then coded as R2 – R9 (rainbow trout) and S2 – S9 (Caspian trout).The registered DNA for *S. parasitica* (ACTT # 200048) and *S. diclina* (ACTT # 4206) were used and coded as R1 and S1, respectively. Based on the RAPD profile obtained all samples were divided to 3 groups and members of each group had more than 90% similarity among themselves. According to matrix of similarity and reference strains, the isolates were classified as three groups. Therefore, all of isolates in group 1 and 3 were *S. parasitica* and *S. diclina*, respectively, and the members of group 2 were known as *Saprolegnia* sp. The results of thermal resistance assessment showed that the isolates of rainbow trout and Caspian salmon eggs had slow growth in the temperature between 18 – 20 °C. Thus, R2 and S8 isolates had the lowest radial growth compared to other isolates. The isolates categorized in *S. parasitica* (group 1) created secoundry zoospores but not observed in two other groups. Thus, catenulated gamme was found in 78% and 55.55% isolates of rainbow trout and Caspian trout eggs, respectively.

This study indicated that molecular methods were the best methods for identification of *Saprolegnia* spp. and it could be applied as a supplementary confirming method.

Archive of SID

www.SID.ir