

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

مریم قیاسی<sup>(۱)\*</sup>، علیرضا خسروی<sup>(۲)</sup>، مینو سلطانی<sup>(۳)</sup>، محمد بینایی<sup>(۴)</sup>، عیسی شریف پور<sup>(۵)</sup>، حسینعلی ابراهیم زاده موسوی<sup>(۶)</sup>، علیرضا باهنر<sup>(۷)</sup>

\*Ghiasimaryam4@gmail.com

۱ و ۴- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

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

۵- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۲

### چکیده

جنس ساپروولگنیا یکی از مهمترین قارچهای آبی بیماریزا در ماهیان پرورشی و وحشی است. در این مطالعه از تخمهای ماهیان قزل آلائی 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 ساپروولگنیا (۸ نمونه از تخم ماهی قزل آلائی 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 ساپروولگنیای اخذ شده از دو نمونه DNA تایید شده شامل ساپروولگنیا پارازیتیکا (*Saprolegnia parasitica*) (ACTT # 200048) با کد R1 و ساپروولگنیا دیکلینا (*Saprolegnia diclina*) (ACTT # 4206) 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 اعضاء گروه ۱ ساپروولگنیا پارازیتیکا، اعضاء گروه ۳ ساپروولگنیا دیکلینا و اعضاء 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 میکروسکوپی ۷۸٪ از نمونه های ساپروولگنیای تخم ماهی قزل آلا و ۵۵/۵٪ ساپروولگنیای تخم ماهی آزاد قابلیت تولید گامه متوالی داشتند. از سوی دیگر پدیده تولید نسلهای متوالی زئواسپور ثانویه در تمام اعضاء گروه ۱ مشاهده شد. لیکن این پدیده در دو گروه دیگر مشاهده نگردید. این مطالعه نشان میدهد که بهترین روش شناسایی برای گونه های ساپروولگنیای 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 آبریان

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیکی بسیار نزدیکی به هم دارند استفاده می‌گردد. تکثیر DNA در PCR با استفاده از الیگونوکلوئیدهای تصادفی به عنوان پرایمر یا روش RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) روشی حساس در ارزیابی درجه تفاوت ژنتیکی بین جدایه‌ها یا سویه‌های مختلف قارچی و یا دیگر میکروارگانیسم‌ها 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-Urbeondo, 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 نمونه‌ها یا گروه‌های وابسته صورت گیرد (Bangyeekhun, et al., 2001; Bangyeekhun, et al., 2003).

در این تحقیق برای نخستین بار در کشور تلاش شده تا با ارزیابی شاخص‌های فیزیولوژیکی چون ارزیابی سرعت رشد کلنی، مقاومت حرارتی، تولید گامه‌های متوالی (catenulated gammea) و تولید متوالی زئواسپور ثانویه در کنار روش RAPD - PCR شناخت دقیقتری از نمونه‌های ساپروولگنیا بدست آمده از هجری ماهیان قزل آلا و آزاد دریای خزر بدست آید.

## مواد و روش کار

نمونه برداری از هجری ماهیان قزل آلا 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 ترفا حاوی چهار سینی بصورت تصادفی از کل ترفاهای موجود انتخاب و از هر ترفا تعداد ۴۰ عدد تخم قارچ زده با پنس استریل برداشته، به ظروف پلاستیکی درپوش دار حاوی آب مقطر استریل و کلرانیکل به میزان  $10\text{ mgL}^{-1}$  منتقل و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه، در شرایط استریل محتویات تخمها تخلیه و پس از شستشو با آب مقطر استریل پوسته‌ها بصورت تلقیحی در محیط کشت گلوکز یست اکستراکت آگار (GYA) حاوی آنتی بیوتیک (کلرامفنیکل  $50\text{ mgL}^{-1}$  و جنتامایسین  $400\text{ mgL}^{-1}$ )

ساپروولگنیا (Saprolegnia) یکی از مهمترین جنس‌های کپک‌های آبی است که موجب عفونت‌های قارچی در ماهیان آب شیرین و مزارع تکثیر و پرورش است. از این نظر میتوان به گونه‌های ساپروولگنیا پارازیتیکا (*S. parasitica*)، ساپروولگنیا دیکلینا (*S. diclina*)، ساپروولگنیا فراکس (*S. ferax*)، ساپروولگنیا دلیکا (*S. delica*) و ساپروولگنیا 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 گونه‌ها 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 محیط‌ها ایجاد می‌شود (Ribeiro, 1983). معمولا بروز ساپروولگنیازیس در دمای کمتر از ۱۸ درجه سانتیگراد روی میدهد و بیشترین بروز آن در ۱۰ درجه سانتیگراد می‌باشد (Yuasa & Hatai, 1995; Kitancharoen, et al., 1997; Czeczuga & Muszynska, 1999).

در گذشته شناسایی گونه‌های ساپروولگنیا صرفا بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و ساختار تولید مثلی جنسی مانند آنتریدیوم (antheridia)، اووگونیم (oogonia) و اوواسپور (oospore) بود. لیکن بعضی از جدایه‌های پاتوژن ساپروولگنیا 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 ایزوآنزیم‌های 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 نمونه‌های ساپروولگنیا استفاده شد.

در بین روشهای مختلف، PCR-RFLP یکی از مهمترین روشها در جهت شناسایی گونه‌های ساپروولگنیا است و از آن به راحتی برای تشخیص تفریقی ساپروولگنیا پارازیتیکا از ساپروولگنیا دیکلینا که

مدت لوله های فوق به مدت ۱۵۰ دقیقه در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری و با تهیه لام از محتویات آنها آزاد شدن زئواسپوره های ثانویه در زیر میکروسکوپ بررسی شد (Díquez-Urbeondo, *et al.*, 1996).

مقدار ۰/۵ گرم پرگنه خالص به لوله در پیچ دار حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت پوئیتو 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 (Díquez-Urbeondo, *et al.*, 1996).

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 ساپرو دکستروز آگار ۰/۴ (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 میسلیمها 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

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	طولیل شدن تمامی پرایمرها و سنتز رشته های DNA در حداکثر ممکن	۱

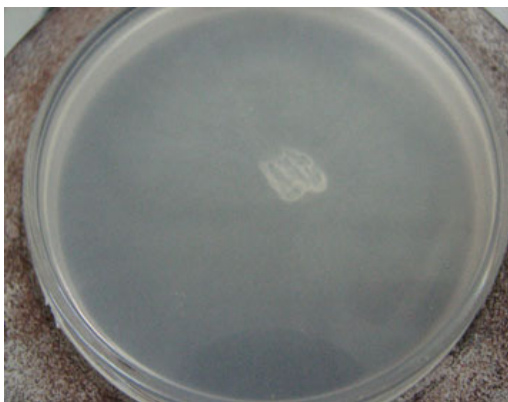
متوالی (حداقل ۲ تا حداکثر ۴ گامه) مشاهده شد. این خصوصیت به ترتیب در ۷۸٪ و ۵۵/۵٪ جدایه های بدست آمده از ماهی قزل آلا و ماهی آزاد دیده شد (شکل ۵ و ۶).



شکل ۱: نمای رویی کلنی خالص ساپروولگنیا در محیط GY



شکل ۲: نمای پشتی کلنی خالص ساپروولگنیا در محیط GY



شکل ۳: نمای رویی کلنی خالص ساپروولگنیا در محیط SD

آزمایش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۰۰ نانوگرم DNA (حدود ۱/۲ میکرولیتر)، ۱۲/۵ میکرولیتر ماستر میکس (شرکت سیناژن)، ۰/۴ میکرومول پرایمر (حدود ۱/۳ میکرولیتر) (شرکت سیناژن) و ۱۰ میکرولیتر 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'-GGC) OPU13، (5'-GTG ATC GCA G-3')، (5'-GAC CAA TGCC-3') OPT20، (TGG TTC C-3')، (5'-AGC CGC) FMI P10(-GAC AGA CGC G-3')، (CTC CAT GGC CCC AGG-3')

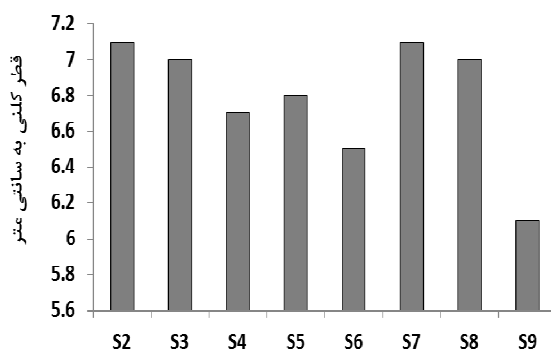
جهت مقایسه نمونه های ساپروولگنیاهای اخذ شده از دو نمونه DNA تاییدشده شامل *S. Parasitica* (ACTT # 200048) و *S. diclina* (ACTT # 4206) به ترتیب با کد R1 و S1 در آزمایشات RAPD-PCR استفاده شدند. در پایان ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR و مارکر ۱۰۰ bp روی ژل آگاروز ۱/۵٪ در دستگاه الکتروفورز قرار گرفت. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ 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.

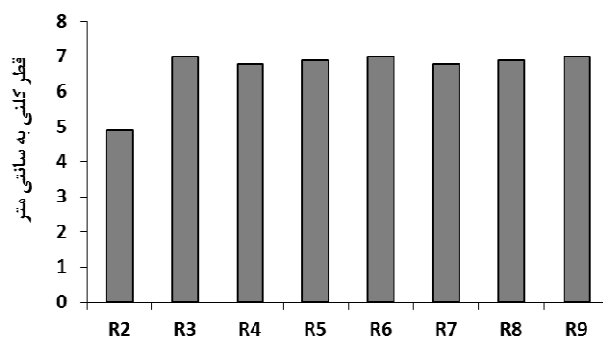
## نتایج

در محیط GYA، قوام کلنی پرزی کوتاه بود و میسلیموم 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 کاملاً 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 میکروسکوپی نمونه های کشت داده شده در محیط کشت در انتهای ریشه ها (hyphea) گامه های متعدد و

قزل آلا و ماهی آزاد در درجه حرارت ۲۰ - ۱۸ درجه سانتیگراد رشد بسیار کندی داشتند، بطوریکه پس از ۱۴ روز قطر کلنی آنها به حدود ۵ - ۴ سانتیمتر رسید.



نمودار ۱: مقایسه قطر کلنی های R2 تا R9 طی ۶ روز

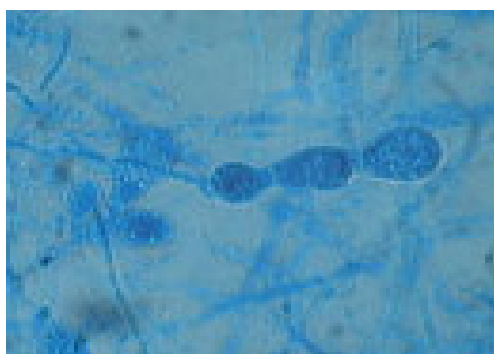


نمودار ۲: مقایسه قطر کلنی های S2 تا S9 طی ۶ روز

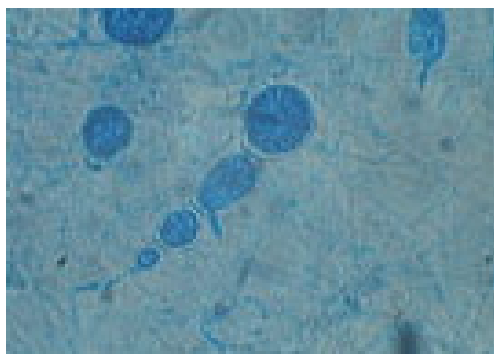
تولید متوالی زئواسپور قابلیت است که از یک اسپور کیست دار شده نسل جدیدی از زئواسپور ایجاد میگردد. این قابلیت در اعضاء گروه ۱ مشاهده شد. در این نمونه ها در حدود ۹۰ - ۸۵٪ کیستهای اولیه، زئواسپور ثانویه جدید ایجاد کردند. جدایه های



شکل ۴: نمای پشتی کلنی خالص ساپروولگنیا در محیط SD



شکل ۵: گامه متوالی در نمونه R9

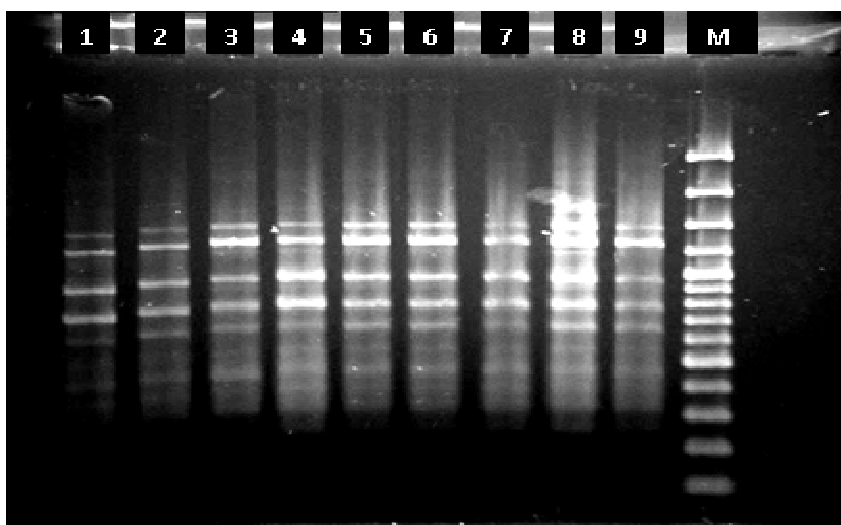


شکل ۶: گامه متوالی در نمونه S4

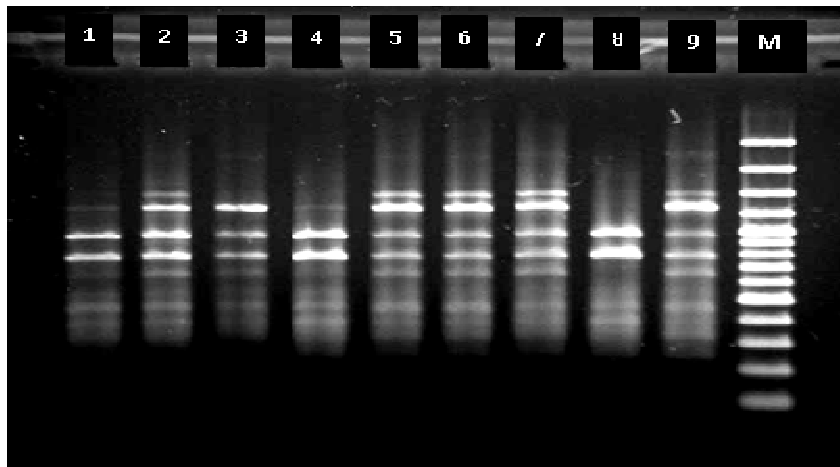
نتایج ارزیابی سرعت رشد نشان داد که در بین نمونه های بدست آمده از تخم ماهیان قزل آلا (نمودار ۱)، کمترین رشد مربوط به نمونه R2 و در نمونه های ماهیان آزاد (نمودار ۲) کمترین رشد مربوط به S9 بود. تمامی جدایه های بدست آمده از تخم ماهیان

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.

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 آنها فقط هایف زایا تولید شد، بطوریکه در همان مراحل اولیه طول هایف زایای ایجاد شده به اندازه قطر ۳ تا ۵ کیست 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

تعداد باندهای ایجاد شده توسط پرایمرهای مختلف به ترتیب برای پرایمرهای OPT20 ۳ عدد (2100, 1714, 745bp)، OPU13 ۳ عدد (1432, 1276, 968, 5 FM1)، (1759, 1360, 1039) عدد (شکل ۷ و ۸)، A10 ۶ عدد (2981, 1361, 1015, ) و برای P10 ۷ عدد (2530, 1889, 1338, )

تعداد باندهای ایجاد شده توسط پرایمرهای مختلف به ترتیب برای پرایمرهای OPT20 ۳ عدد (2100, 1714, 745bp)، OPU13 ۳ عدد (1432, 1276, 968, 5 FM1)، (1759, 1360, 1039) عدد (شکل ۷ و ۸)، A10 ۶ عدد (2981, 1361, 1015, ) و برای P10 ۷ عدد (2530, 1889, 1338, )

### جدول ۲: ضریب تشابه جدایه های ساپروولگنیا 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

### جدول ۳: گروه بندی جدایه های ساپروولگنیا *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

از ٪۹۰ بود و نمونه های هم گروه با DNA استاندارد، نمونه مشابه آن شناسایی شد.

بر اساس ضریب تشابه بدست آمده، تمامی نمونه ها به ۳ گروه تقسیم شدند (جدول ۳). ضریب شباهت در بین اعضاء هر گروه بیش

## بحث

سابقه شناسایی عوامل قارچی ایجاد کننده ساپروولگنیازیس در ایران به دهه ۱۳۶۰ باز میگردد. در تمامی این بررسیها که بر روی تخم ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهیان خاویاری (*Acipenser* sp.)، ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frissi kutum*) نیز ضایعات قارچی در سطح بدن ماهیان کپور انجام شد و شناسایی عوامل قارچی فقط بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و ساختار تولید مثل مانند آنتریدیوم، اووگونیم و اسپور 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 ساپروولگنیا بدست آمده از تخمهای آلوده قزل آلا ی 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 ساپروولگنیا پارازیتیکا (*S. parasitica* ATCC # 200048) هم گروه هستند و اعضاء آن ضریب شباهتی بیش از ۹۴٪ دارند. گروه ۳ با نمونه رفرانس ساپروولگنیا 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. اصولاً از خصوصیات فیزیولوژیکی گونه های ساپروولگنیا 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 تفاوتی 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 ۱۴ روز 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 می رسد 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 (ساپروولگنیا پارازیتیکا) در این بررسی قادر به ایجاد زئواسپورهای متوالی جدید بودند در حالیکه نمونه گروه ۳ (ساپروولگنیا دیکلینا) این قابلیت را نداشت. این قابلیت از گونه های قارچی آفانومایسس گزارش شده است و معمولاً 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 ساپروولگنیا پارازیتیکا انجام داده اند نتایج متفاوتی بدست آمده است. در بررسی که Dieguez - Uribeondo و همکاران (۱۹۹۶) روی نمونه های ساپروولگنیا 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 دادند که نمونه های ساپروولگنیا 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 ساپروولگنیای بدست آمده از ماهیان قزل آلا و آزاد نواحی مختلف سوئد و فنلاند نشان دادند که اکثر نمونه های ساپروولگنیای ساپروولگنیای 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 ساپروولگنیای انجام دادند مشخص شد بعضی نمونه های ساپروولگنیای پارازیتیکا جدا شده از آزاد ماهیان و نیز بعضی نمونه های ساپروولگنیای دیکلینا قابلیت تولید زئواسپور جدید را دارند. با

تکثیر ماهیان میگردد از پارامترهای مختلف فیزیولوژیکی و ژنتیکی میتوان استفاده نمود. تفاوتی که در فاکتورهای تحت بررسی در نمونه های مختلف مشاهده شد حاکی از گستردگی و پیچیدگی دنیای قارچهای آبی 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 آبی 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 ساپروولگنیازیس 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.** Prevalence of a single fish – pathogenic *Saprolegnia* sp. Clone in Finland and Sweden. *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* –

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 ساپروولگنیا 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 ساپروولگنیا پارازیتیکا تشخیص داده شد. در بررسی که Yuasa و Hatai (۱۹۹۶) بر روی خصوصیات بیولوژیکی نمونه های ساپروولگنیا جدا شده از قزل آلا رنگین کمان داشتند متوجه شدند که نمونه های ساپروولگنیا 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 و قدرت بیماریزایی آن عوامل بیولوژیک و غیر بیولوژیک متعددی در بروز ساپروولگنیازیس موثر است. در مطالعات مختلف نشان داده شده است آبهای الیگو تروفیک (Oligotrophic) موجب افزایش تنوع عوامل قارچی دخیل در ساپروولگنیازیس 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 پلانکتونی کم بوده ولی بیوماس آنها بسیار زیاد است (Czeczuga & Muszynska, 1999). از آنجایی که منبع آب هجری 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

- 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 Ebrahimzademosavi, H., 2010.** Characterization of *Saprolegnia* isolates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) eggs based on physiological and molecular data. *Journal de Mycologie Médicale*, 20: 1-7.
- Hatai, K. and Hoshiai, G. I., 1994.** Pathogenesis 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 Research*, 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 amplification 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* complex. *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* – *parasitica* complex. *Journal of General Microbiology*, 129(8): 2605–2619.
- Cerenius, L. and Soderhall, K., 1996.** Saprolegniaceae: Zoospore formation, virulence and pathogenesis in animal hosts. In: Dayal R (Ed) *Advance in zoosporic fungi*. MD publication Ltd., New, Dehli. pp. 97–116.
- Czczuga, B. and Muszynska, E., 1997.** Aquatic fungi growing on the eggs of some anadromus fish species of the family Clupeidae. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, XXVII (1): 83–93.
- Czczuga, B. and Muszynska, E., 1999.** Aquatic fungi growing on the eggs of 33 Cyprinid taxa (*Cyprinidae*) in laboratory condition. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, XXIV (2): 53–72.
- Czczuga, 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 Ichthyologica et Piscatoria*, XXVI(2): 113–121.
- Czczuga, 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 Ichthyologica 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–**

- 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.
- Willoughby, G., 1994.** Fungi and Fish disease. Pisces press, Stirling, Scotland, 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 sporulation 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.

## 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<sup>1\*</sup>; lireza Khosravi, A<sup>2</sup>; ino Soltani, M<sup>3</sup>; Sharifpour, I<sup>4</sup>, Binaii, M<sup>5</sup>, Ebrahimzadeh Mosavi, H<sup>6</sup>, Bahonar, A<sup>7</sup>

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 eggs were collected from rainbow trout (*Oncorhynchus 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 secondary zoospores but not observed in two other groups. Thus, catenulated gamete 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.