

جداسازی و شناسایی استرمانوپیل‌های آبی 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 قلم‌فارسا✉: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، شیراز ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶ (rmostofi@shirazu.ac.ir) ایران

چکیده

راسته *Saprolegniales* شامل گونه‌های بیمارگر گیاهان آبی، خشکی‌زی و جانوران آبی از جمله ماهی‌هاست. این شبه‌قارچ‌های استرمانوپیلی 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، سرپست، سپدان، شش‌پیر و کفترک) و کرمانشاه (بیستون، پاره، 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. mixta*، *S. aff. australis* و *Saprolegnia sp.*، *Achlya americana* بودند. همچنین، آرایه‌های *S. aff. australis* و *Saprolegnia sp.* جدا شده از مواد آلی پوسیده با هیچ یک از گونه‌های قبلاً گزارش شده از جنس *Saprolegnia* قرابت نداشته و به احتمال زیاد گونه‌های جدیدی برای این جنس محسوب می‌شوند. گونه‌های *S. mixta*، *S. anomala* و *Achlya americana* برای میکروبیوتای 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 (Bahrehgan, 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*

مقدمه

در مورد این میکروارگانیسم‌ها وجود ندارد. علت اصلی نبود آرایه‌بندی دقیق، این است که توصیف گونه در این جنس عمدتاً مبتنی بر خصوصیات ساختارهای جنسی مانند آگونیوم، آسپور 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-Urbeondo 2015).

مطالعات بسیار اندکی روی شبه‌قارچ‌های متعلق به تیره *Saprolegniaceae* در کشور ایران وجود دارد که شامل گزارش دو گونه *Isoacklya unispora* و *S. ferax* (Gruih.) Kütz. 1843 (Tajick-Ghanbari 1970) است (Coker & Couch) R.L. Seym 1970 (Safdari et al. 2008, et al. 2008). در پژوهشی دیگر، گزارشی از گونه‌های جدید و توصیف نشده‌ای از جنس‌های *Saprolegnia* و *Achlya* ارائه شده است (Masigol et al. 2017). به دلیل اثرات شدید و مخرب گونه‌های انگل این تیره (مخصوصاً 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، سرپست، سیدان، سپیدان، شش‌پیر و کفتک) و کرمانشاه (بیستون، پاه، 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

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 (Markovskaja 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 آبی 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 اکلئوید (*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 آبی 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 آبی، 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-Urbeondo 2015). علی‌رغم نیاز روزافزون به درک بهتر از زیست‌شناسی این موجودات، آرایه‌بندی دقیقی

(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 ریپوزومی 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 آگارز حاوی ۰/۰۰۵ اتیدیوم بروماید در بافر تی‌بی‌بی (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم بی‌دی‌تی‌ای، 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 متحده امریکا) عکس‌برداری و اندازه‌نوارهای به دست آمده در مقایسه با یک نشانگر دی‌ان‌ای ۱۰۰ جفت‌بازی (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/>) جهانی با استفاده از نرم‌افزار BankIt (GenBank, NCBI, USA) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/> [Online]) و اخذ رس‌شمار برای مطالعات بعدی استفاده شد.

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

(*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 ریشه‌های 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 نوک‌ریشه 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 ریشه‌های قارچی و همچنین ماهی‌هایی دارای علائم 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 ماهی‌های آلوده نیز با خراش دادن 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، آگونیوم، انتریدیوم و نحوه اتصال آن به آگونیوم و همچنین براساس کلید شناسایی قارچ‌های آبی (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 & Mostowfzadeh- 2013) و با استفاده از کیت DNGTM-PLUS

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). ریشه‌های این شبه‌قارچ، استوانه‌ای، منشعب و با میانگین قطر ۱۰/۶ میکرومتر، اسپورانژیوم‌ها از ریشه قطورتر با میانگین قطر ۴۶/۵۱ میکرومتر، آگونیوم به شکل‌های متفاوت از کروی (با میانگین قطر ۲۵/۳۷) تا استوانه‌ای، آسپور با دیواره صاف، دارای میانگین قطری معادل ۱۸/۲۱ میکرومتر، در تعداد زیاد، معمولا ۱۵ تا ۲۰ عدد بودند که کل فضای آگونیوم را پر می‌کردند. انتریدیوم تک‌بُن، به ندرت تشکیل می‌شدند که در اکثر موارد یک عدد در اطراف هر آگونیوم وجود داشت (شکل ۱، A و جدول ۲).

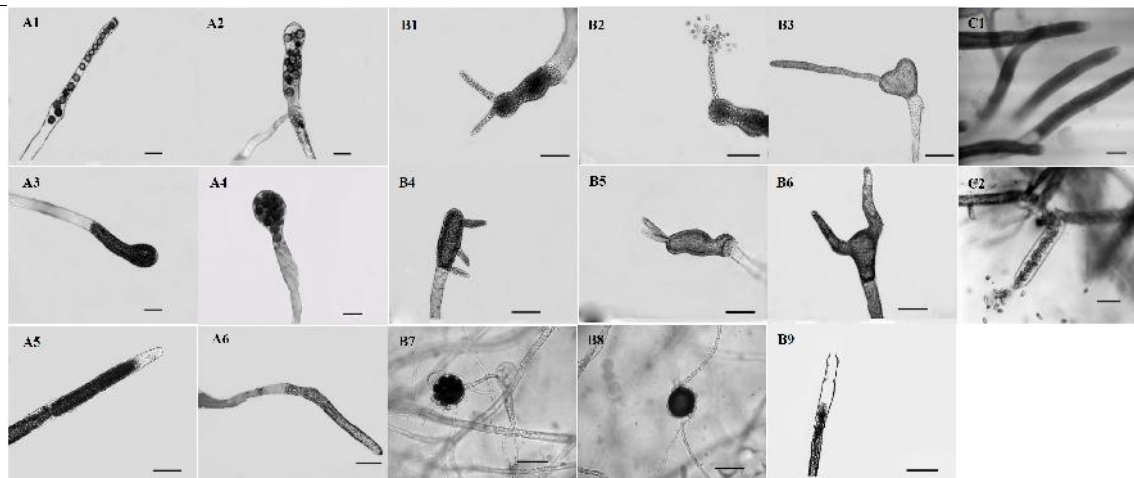
دو جدایه 159 و 165 از این گونه به نمایندگی جهت توالی‌سنجی انتخاب شد. تعداد نوکلئوتیدهای ناحیه ای‌تی‌اس جدایه 159، ۶۹۱ و جدایه 165، ۶۸۳ جفت باز بود. جست‌وجوی هر دوی این توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن نشان داد که این جدایه با ۹۹ درصد هم‌پوشانی و ۱۰۰ درصد شباهت به گونه *S. ferax* (AM228788) (Diéguez-Urbeondo *et al.* 2007) 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 بوت‌استرپ میزان اطمینان از پدید آمدن این تبار برابر با ۸۴ درصد بود.

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 بوت‌استرپ 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: *S. ferax*، *Saprolegnia parasitica*، *S. anomala*، *S. aff. australis*، *S. mixta*، *S. ferax* sp. 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 ترانویسی شده داخلی (ای‌تی‌اس) ژن اران‌ای ریپوزومی 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

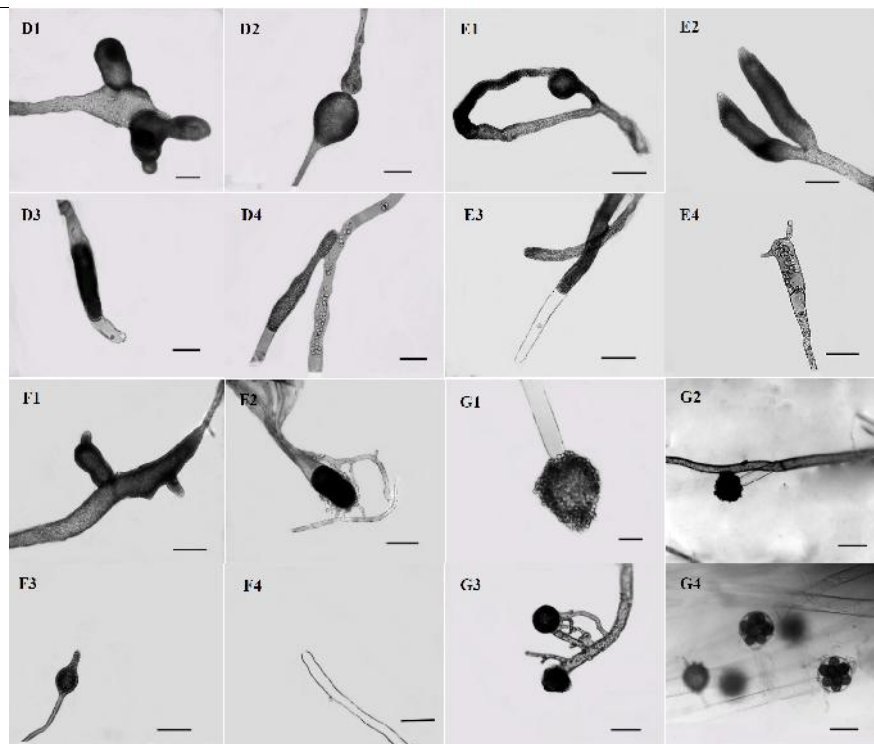


شکل ۱- ریخت‌شناسی گونه‌های *Saprolegnia* جدا شده از استان‌های فارس و کرمانشاه: A. ریخت‌شناسی *Saprolegnia ferax* جدایه 165: A1. آگونیوم رشته‌ای و استوانه‌ای بالغ و آسپوره‌های ناپرساز، A2. آگونیوم بالغ رشته‌ای متورم به همراه انتریدیوم دوئین در پایه آن، A3. آگونیوم نابالغ، A4. آگونیوم گلابی شکل با تعداد متعدد آسپور 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. آگونیوم و انتریدیوم دوئین، B9. آگونیوم و انتریدیوم و آسپوره‌های متعدد در آگونیوم (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 declinous antheridium in the base of oogonium, A3. Immature oogonium, A4. Pyriform oogonium with a lot of oospore, A5 & A6. Cylindrical sporangia (Bar = 50 μ m); 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 & declinous, paragynous antheridium, B8. Oogonium & antheridium (Bar = 100 μ m); C. *Saprolegnia parasitica* isolate De-S1: C1. Immature & cylindrical sporangium, C2. Zoospore release and cytoplasmic discharge from sporangia (Bar = 50 μ m).

شد، ولی در جدایه‌های تاجیک قنبری و همکاران (۲۰۰۸)، ۱۹-۲۲ میکرومتر ذکر شده است. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی جدایه‌های این پژوهش با توصیف این گونه در پژوهش مارکواس کایا (Markovaskaja 2006) مطابقت داشت. شکل آگونیوم در پژوهش آن‌ها کروی و گلابی شکل توصیف شده بود، با این تفاوت که در جدایه‌های پژوهش حاضر، علاوه بر داشتن شکل‌های مذکور، آگونیوم استوانه‌ای نیز مشاهده شد. همچنین، قطر آگونیوم در جدایه‌های این پژوهش ۲۰-۳۰ میکرومتر، اما در جدایه‌های پژوهش مارکواس کایا (۲۰۰۶)، این اندام‌ها قطورتر با قطری معادل ۵۰-۱۰۰ 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.

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 قبلاً 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 آگونیوم بود که جدایه‌های این پژوهش دارای آگونیوم‌های کروی، بیضوی و استوانه‌ای، ولی در توصیف تاجیک قنبری و همکاران (۲۰۰۸)، شکل این اندام‌ها فقط کروی توصیف شده بود. همچنین، قطر آگونیوم در جدایه‌های این پژوهش ۲۰-۳۰ میکرومتر مشاهده



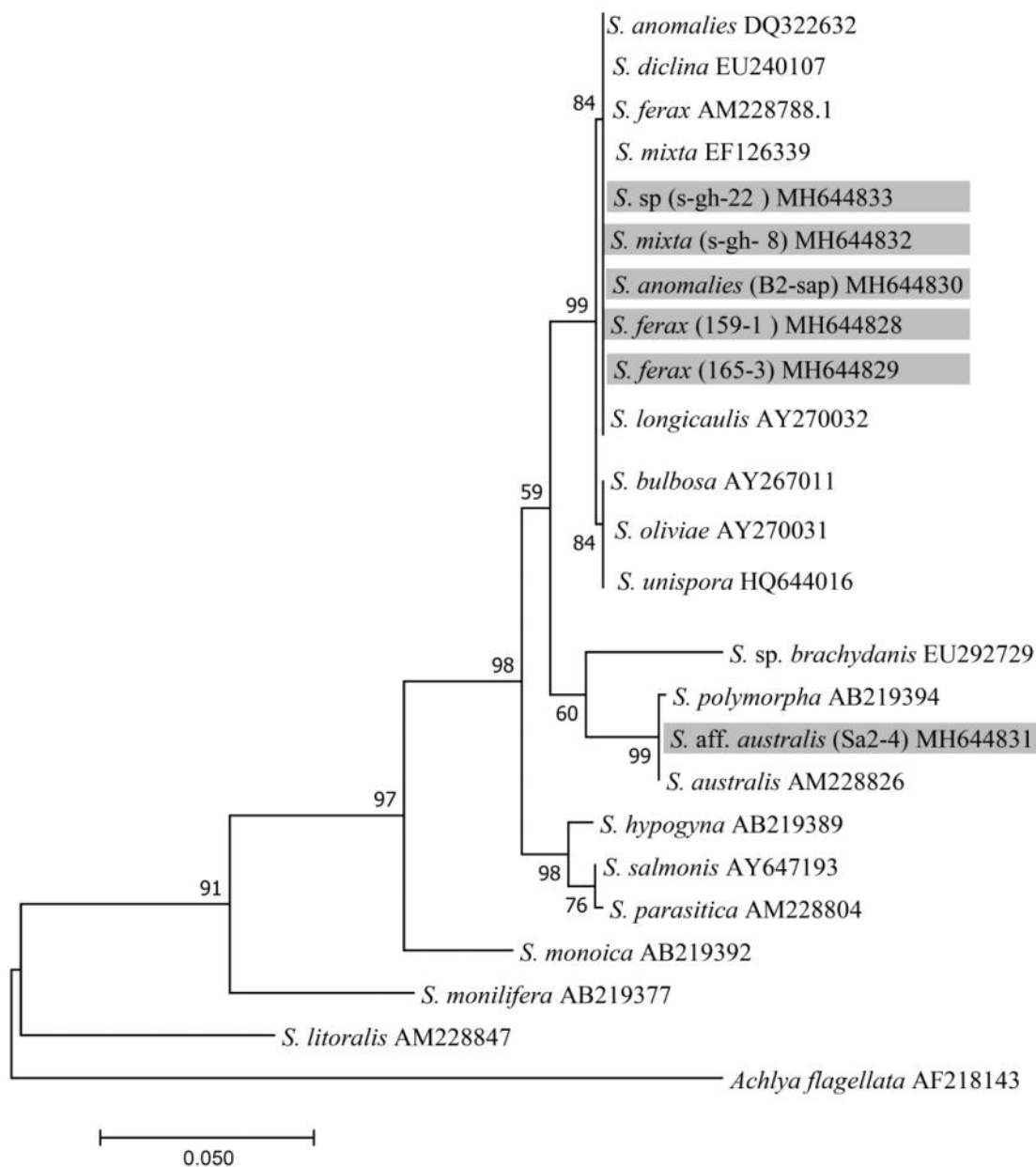
شکل ۱ (ادامه) - D. ریخت شناسی *Saprolegnia mixta* جدایه S-gh-8: D1. اسپورانژیوم رشته‌ای متورم و منشعب، D2. آگونیوم کروی و انتریدیوم زنگوله‌ای شکل و تک‌بن، D3. اسپورانژیوم استوانه‌ای با اپرکولوم، D4. اسپورانژیوم استوانه‌ای (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)؛ E. ریخت شناسی *Saprolegnia* sp. جدایه S-gh-22: E1. آگونیوم همراه با انتریدیوم تک‌بن و رشته‌ای بلند، E2-E4. اسپورانژیوم رشته‌ای متورم و خمیده و همراه با پستانک (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)؛ F. ریخت شناسی *Saprolegnia anomala* جدایه B2-Sap: F1. اسپورانژیوم استوانه‌ای و ضخیم، F2. آگونیوم بیضوی با انتریدیوم‌های دو بن، رشته‌ای و منشعب، F3. آگونیوم نابالغ، F4. اسپورانژیوم استوانه‌ای تخلیه شده (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)؛ G. ریخت شناسی *Achlya americana* جدایه S-gh-32: G1 و G2. اسپورانژیوم تخلیه شده و زئوسپورهایی سیست شده در انتهای اسپورانژیوم، G3. آگونیوم و انتریدیوم تک‌بن، G4. آگونیوم و اسپوره‌های 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 declinous and bell shape antheridium, D3. Cylindrical sporangium with an operculum, D4. Cylindrical sporangium (Bar = 100 μ m); E. *Saprolegnia* sp. isolate S-gh-22: E1. Spherical oogonium with monoclinalous and filamentous inflated antheridium, E2-E4. Filamentous inflated sporangium (Bar = 100 μ m); F. *Saprolegnia anomala* isolate B2-sap: F1. Thick and cylindrical sporangium, F2. Elliptical oogonia with declinous filamentous and branched antheridium, F3. Immature oogonium, F4. Discharged filamentous sporangium (Bar = 100 μ m); G. *Achlya americana* isolate S-gh-32: G1. Discharged sporangium with a lot of zoospore, G2. Monoclinalous antheridium and oogonium, G3. Oogonium with oospores within the oogonium (Bar = 50 μ m).

معادل ۱۵۴/۲ میکرومتر و میانگین قطر ۲۲-۵۵ میکرومتر، دارای لوله تخلیه کوتاه، آگونیوم به شکل‌های مختلف کروی و بیضوی، دارای میانگین قطری معادل ۱۷۶/۱۸ میکرومتر، انتریدیوم به حالت دو بن، به میزان فراوان و منشعب در اطراف آگونیوم بود (شکل ۱، F و جدول ۲).

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). ریشه‌ها منشعب، ریشه اصلی دارای میانگین قطری معادل ۲۹/۷۳ میکرومتر، اسپورانژیوم به میزان فراوان، به شکل‌های استوانه‌ای و رشته‌ای دارای میانگین طولی



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

Fig. 2. Phylogeny of the *Saprolegnia* spp. isolates in Fars and Kermanshah provinces (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 .

جدول ۱- گونه‌های *Saprolegnia* و *Achlya* جدا شده از استان‌های فارس و کرمانشاهTable 1. *Saprolegnia* spp. and *Achlya* spp. isolates collected from Fars and Kermanshah provinces (Iran)

Taxon	Isolate	Substrate	Date	Location	Coordinates	Accession Number*
<i>Saprolegnia parasitica</i>						
	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	-
<i>Saprolegnia ferax</i>						
	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	-
<i>Saprolegnia aff. australis</i>						
	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	-

Table 1 (contd)

جدول ۱ (ادامه)

Taxon	Isolate	Substrate	Date	Location	Coordinates	Accession Number*
<i>Saprolegnia aff. australis</i> (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	-
<i>Saprolegnia mixta</i>						
	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	-
<i>Saprolegnia</i> 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
<i>Saprolegnia anomala</i>						
	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	-
<i>Achlya americana</i>						
	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

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	<i>S. ferax</i>	<i>S. anomala</i>	<i>S. mixta</i>	<i>S. aff. australis</i>	<i>Saprolegnia</i> sp.	<i>S. parasitica</i>	<i>A. americana</i>
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

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). ریشه‌ها منشعب، ریشه 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، آگونیوم کروی و بیضوی، دارای دیواره صاف، با میانگین قطر ۱۵۱/۱۹، تعداد آسپورها ۹-۵ عدد در هر آگونیوم و دارای میانگین قطر ۲۰-۱۵ میکرومتر، انتریدیوم چماقی شکل، به حالت دوئین، در اغلب موارد ساده و بدون انشعاب بود (شکل ۱، D و جدول ۲).

تعداد نوکلئوتیدهای 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. dictina* EU240107 قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استرپ، 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 آگونیوم 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 آگونیوم‌های بیضوی و انتریدیوم رشته‌ای و

اسپورانژیوم ۲۳۶/۱۷ میکرومتر، عرض ۸۱/۵۳ میکرومتر و طول لوله تخلیه ۱۱۵ میکرومتر بود. آگونیوم دارای قطری با میانگین ۹۱/۸۳ میکرومتر، تعداد آسپورها ۹-۱۱ عدد و دارای میانگین قطر ۲۴/۲۳ میکرومتر بودند. در هر آگونیوم، انتریدیوم‌ها رشته‌ای و به حالت دوئین بودند و این ساختارهای جنسی پس از گذشت ۲۰ روز تشکیل شدند (شکل ۱، B و جدول ۲).

تعداد نوکلپوتیدهای 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 بوت‌استرپ 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 اخیراً 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 ترانوسی 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 اسپورانژیوم‌ها مربوط می‌شود. جدایه‌های این پژوهش دارای اسپورانژیوم‌هایی 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 آسپورهای موجود در آگونیوم می‌شود. میانگین تعداد آسپورها 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

تعداد نوکلپوتیدهای ناحیه ای‌تی‌اس این جدایه ۶۸۲ جفت‌باز بود. جست‌وجوی این توالی در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن نشان داد که این جدایه با ۹۹ درصد هم‌پوشانی و ۱۰۰ درصد شباهت به گونه (AM228788) *S. ferax* (Diéguez-Uribeondo et al. 2007) و با ۹۸ هم‌پوشانی و ۹۹ درصد شباهت به گونه (EF126339) *S. mixta* (Belbahri et al. 2006) شباهت دارد. این جدایه در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر ناحیه ای‌تی‌اس در تباری جداگانه در کنار گونه‌های *S. ferax* AM228788 و *S. mixta* EF126339 و *S. dictina* EU240107 قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استرپ، 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. آگونیوم 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 ترانوسی شده داخلی ژن اران‌ای ریبوزومی شباهت بسیار زیاد به گونه *S. ferax* داشتند، اما برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی از جمله شکل آگونیوم و اسپورانژیوم منجر به تمایز این دو گونه شد. آگونیوم در گونه *S. mixta* کروی و انتریدیوم معمولاً دوئین است، در حالی که در *S. ferax* آگونیوم معمولاً بیضوی، گلابی شکل و یا استوانه‌ای است (Khulbe 2001). اسپورانژیوم در *S. ferax* معمولاً 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 ظاهراً توصیف نشده، از کرمانشاه (در بند 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

آن را با جدایه‌های پژوهش حاضر مورد مقایسه قرار داد و لذا شناسایی منحصر 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 آبیان، از تخم و پوست ماهی‌های بیمار در استخرهای پرورش ماهی در مناطق شش‌پیر و دلخان از شهرستان سپیدان جداسازی شد (جدول ۱). ریشه‌های 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 ۱۵-۸۰ میکرومتر بودند. آگونیوم با دیواره صاف با میانگین قطر ۷۰/۶۴ میکرومتر، تعداد آسپورها ۵-۸ عدد در هر آگونیوم، انتریدیومها تک‌بُن، منشعب، به تعداد ۷-۱ انتریدیوم به ازای هر آگونیوم بود (شکل ۱، C و جدول ۲).

گونه *S. parasitica* یکی از مهم‌ترین گونه‌های بیمارگر آبیان به خصوص ماهیان قزل‌الا (*Oncorhynchus mykiss*) در سراسر جهان است (Neish & Hughes 1980). اهمیت این گونه به قدری است که در اکثر بازدهی‌های 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 ساپروولگنیازیس است (Ebrahimzadeh Mousavi et al. 2014, Ghiasi et al. 2010, Ghiasi et al. 2007). 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. ریشه‌های 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 ۷۰-۱۰۰ میکرومتر بود. نحوه تخلیه زئوسپورها با جنس

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 آب‌های منطقه سراب قنبر جداسازی شد. ریشه‌های 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، آگونیوم به میزان فراوان با میانگین قطر ۹۷/۶۸ میکرومتر، اغلب کروی، انتریدیوم معمولا تک‌بُن و طویل، آسپورها به تعداد ۴-۷ عدد در هر آگونیوم است (شکل ۱، E و جدول ۲).

تعداد نوکلئوتیدهای 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) و *S. mixta* (EF126339) و *S. diclina* (EU240107) قرار گرفت (شکل ۲). براساس آزمون بوت‌استرپ 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 آگونیوم گلایی 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

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 آبی 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 ژن‌ای‌تی‌اس 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 آمیستی 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.

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). آگونیوم با دیواره صاف با میانگین قطر ۶۲/۴۳ میکرومتر، تعداد آسپورها ۸-۵ عدد در هر آگونیوم، انتریدیوم‌ها تک‌بُن، منشعب، به تعداد ۷-۱ انتریدیوم به ازای هر آگونیوم 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 ریشه‌های بسیار قطور باعث تمایز جنس *Achlya* از جنس *Saprolegnia* می‌شود (Khulbe 2001). وجود آگونیوم‌های فراوانی که در طول ریشه‌های 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، ۷۰-۱۰۰ 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 آبی 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

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/nucleotide/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 (*Acipenser 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 water molds 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*

- 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 *Phytophthora* species Based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and -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.