*دراسة مسحية لأنواع الجنس *Saprolegnia* في مياه محافظة الديوانية وتوصيفها جزيئيا

تاريخ الاستلام 2015/4/18 تاريخ القبول 2015/6/4

ماجد كاظم عبود الشبلي
كلية التربية/جامعة القادسية

معتز محمد عزوز الزاملي *
كلية التربية/جامعة القادسية

الخلاصة:

تضمنت الدراسة عزل الفطرين وهما *Saprolegnia Parasitic* و *Saprolegnia Ferax* ومن الأنهار والبحيرات والأسماك ، وتم قياس الخصائص البيئية الفيزيائية والكيميائية ثم جرى استخلاص الـ DNA ولغرض أجراء فحص التأكد من وجود أنزيم Proteases فيهما باستخدام تقنية الـ Polymerase Chain Reaction PCR لأنهما كانا الأكثر عزلاً في مناطق الدراسة علما أن الدراسة الحالية هي الأولى من نوعها في العراق.

أظهرت نتائج العزل والتشخيص النسبة المئوية لظهور النوعين المذكورين في أعلاه في مواقع الدراسة (الأنهار 64% وفي البحيرات 40% وفي حالة الأسماك 50%) وتمثلت هذه النسب من خلال عدد العينات المفحوصة والبالغة 60 عينة ، إذ كان النوع *S.parasitica* أكثر تردداً في ظهوره خلال شهر شباط 2014 وكان عدد العينات 12 أما أقل تردد لظهوره فكان في شهر نيسان 2014 إذ كان عدد العينات 3 ، أما النوع *S.ferax* فكان أكثر تردداً لظهوره في شهر شباط 2014 وكان عدد العينات 10 أما اقل تردد لظهوره فكان في شهر نيسان 2014 إذ كان عدد العينات 2 ، وأظهرت نتائج الدراسة عدد العزلات من جنس *Saprolegnia* في مواقع الدراسة إذ كان عدد عزلات النوع *S.parasitica* في الموقع الأول وهو الأنهار 6 عزلة والموقع الثاني وهو البحيرات 2 عزلة والعزل المباشر من الأسماك فكان عدد العزلات هو 3 أما النوع الثاني *S.ferax* كان عدد عزلاته المتواجدة في الأنهار 10 عزلة وفي البحيرات 8 عزلة أما في حالة العزل المباشر من الأسماك فكان عدد العزلات 2 .

أظهرت نتائج التشخيص باستخدام فحص الـ PCR للتحري عن فطر *Saprolegnia* عن طريق استخدام البادئات الخاصة بجين الـ rDNA gene والتحري عن جين Proteases وبيان وجوده في نوعين من الفطر المذكور وهما *S.parasitica* و *S.ferax* وقد استعملت الطريقة السريعة لاستخلاص الـ DNA وحسب تعليمات الشركة المصنعة وتم الحصول على DNA بتركيز في النوع الأول 73,0-121,8 مايكرو غرام/مايكروليتر وبنقاوة 1,80-1,87 أما النوع الثاني فكان تركيز الـ DNA 166,9-2360,4 مايكرو غرام/مايكروليتر وبنقاوة 1,75-2 وكانت نسبة النقاوة 1,8 ، إذ كان النوع *S.parasitica* أقل انتشاراً في الأنهار بنسبة 66.6% وفي البحيرات والأسماك بنسبة 100%. بينما النوع *S.ferax* كان أكثر انتشاراً وبنسبة 70%، أما في البحيرات كان بنسبة 62% وفي الأسماك بنسبة 100%.

بينت نتائج الدراسة باستخدام تقنية الـ(PCR) وجود الأنزيم المحلل للبروتين Protease في النوع الأول في الأنهار 25% وفي البحيرات والأسماك 100% أما النوع الثاني فكانت نسبة وجود الأنزيم فيه في الأنهار 42% وفي البحيرات 40% أما في الأسماك فكانت النسبة 50%.

نستنتج من الدراسة الحالية تباين وجود الأنواع الفطرية في مواقع الدراسة وإفراز الأنزيم Protease في مراحل الإصابة الفطرية وكذلك فان الأنزيم يتواجد بنسبة أكبر في النوع *S.parasitica* مقارنة مع النوع *S.ferax* .

الكلمات المفتاحية : جنس السابرولكينيا ، إنزيم البروتيز ، التوصيف الجزيئي

Microbiology Classification QR 74.5

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

المقدمة Introduction :

تشكل الأنهار والبحيرات بيئة مناسبة لنمو مجتمعات إحيائية عدّة وبهذا فان الثروة السمكية أحد هذه المجتمعات وأحد الجوانب الاقتصادية المهمة وتتعرض هذه الثروة لمخاطر الإصابة بعدد من الأحياء المجهرية مثل الفطريات والبكتيريا والطفيليات والفيروسات (10).

وتعد الفطريات البيضية (Oomycetes) المنتشرة في البيئة المائية واحدة من أهم الآفات التي تهاجم الأسماك وبيوضها ، إذ تكمن خطورة الإصابة في وجود الأبواغ السابحة لهذه الفطريات التي قد تصل إلى بيوض الأسماك فيؤدي إلى اختزال عدد الأسماك بسبب تلف البيوض والهلاكات الناجمة عن ذلك ، ومن أهم تلك الفطريات هي التابعة إلى رتبة أعفان الماء (Saprolegniales) وهي المسؤولة عن الهلاكات الشديدة للأسماك وتلف بيوضها (15).

إن الأمراض الفطرية التي تسببها أنواع الجنس *Saprolegnia* للكائنات التي تعيش في البيئة المائية ينتج عنها خسائر اقتصادية كبيرة فمثلا في اليابان الهلاكات السنوية تتجاوز 50% في سمك السلمون (كوهو) بسبب النوع *S.parasitica* وفي تشيلي التي هي ثاني اكبر منتج لسمك السلمون الهلاكات في البيوض تتراوح من 15% إلى 25% (8). وتعد الأنزيمات المحللة للبروتينات Protease من عوامل الضراوة المهمة المنتجة من قبل الفطريات الممرضة للأسماك والقشريات والحشرات (2) ، كما لوحظ أن لأنزيم Protease المنتج من قبل الفطر Trichoderma أهمية في المكافحة الحيوية لعدد من الممرضات (7) ، كما أن أنتاج أنزيم (Protease) قد يساهم في إصابة بيض الأسماك بالأبواغ السابحة لما تحتويه البيوض من محتوى بروتيني عال (5) وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره(14). من أن الفطريات السابرولكينية لها المقدرة على أنتاج الأنزيم كأحد الأنزيمات المستخدمة من قبل هذه الفطريات لمهاجمة الأسماك وبيوضها.

أن الغرض من الدراسة هو أجراء مسح لأنواع الفطريات المائية وبالأخص أنواع الفطر *Saprolegnia* في مياه محافظة الديوانية وأجراء التشخيص المظهري والوراثي(البايولوجي الجزيئي) للأنواع المعزولة.

المواد وطرق العمل Materials and methods

جمع العينات Samples collection

جمعت عينات المياه شهرياً للفترة من كانون الأول 2013 ولغاية أيار 2014 من مواقع الدراسة الساعة العاشرة صباحاً وذلك لملائمة الوقت لي وكذلك لان الجو يكون معتدلا وتم الحصول على العزلات من العينات في هذا الوقت أفضل من غيره من باقي الأوقات التي شملت مياه الأنهار المتمثلة بنهر مدينة الديوانية ومياه البحيرات التي هي مخصصة لتربية الأسماك وتم اخذ عينات المياه من جميع مناطق النهر من أطرافه ووسطه أي بشكل مربع وكذلك هو الحال بالنسبة إلى البحيرات وذلك خلال الفترة المذكورة أعلاه أي في فصل الشتاء والربيع وبداية فصل الصيف ، واستخدمت لهذا الغرض قناني زجاجية معتمة سعة 500 مل فتحت تحت سطح الماء وبعمق من 20 – 30 سم بعد امتلائها سدت بشكل محكم وهي تحت سطح الماء ونقلت بعد ذلك إلى المختبر لإجراء الفحوصات المختبرية عليها.

أما بالنسبة إلى عينات الأسماك فقد تم الحصول على الأسماك المصابة من السوق المحلية للأسماك وهي من نوع سمك البني وبعمر تقريبا خمسة إلى ستة أشهر ونقلت هي أيضا إلى المختبر لإجراء الفحوصات التكميلية عليها.

عزل الفطريات:

العزل بطريقة الطعوم Baitting method

تم عزل الفطريات المائية في الدراسة الحالية بطريقة الطعوم Baitting method وفق ما أورده

كل من (1;13) واستخدمت لهذا الغرض بذور الدخن Pennisetum spicatum كطعوم.

تنقية وحفظ المزارع الفطرية Purification and Maintenance of pure cultures

بعد ظهور النموات الفطرية تمت عملية التنقية عن طريق قطع خيط فطري واحد قرب القمة بوساطة ملقط معدني معقم ، ونقل بظروف معقمة إلى وسط (PDA) حضنت الأطباق بدرجة حرارة 20 مْ لمدة ثلاثة أيام فحصت بعدها لملاحظة تكون مستعمرات نقية من عدمها. نقلت قطعة من الوسط ألزرعي الحاوي على النهايات الفطرية بوساطة ثاقبة فلين (cork borer) قطرها 6 Mm أو 5 الى أطباق بتري معقمة حاوية على ثلاث بذور دخن و 15 µl ماء مقطر معقم ومقدار واحد مل من مضاد الكلورومفينيكول.بعد ذلك حفظت العينات بإتباع طريقة (6).

تشخيص الفطريات المائية

تم تشخيص الفطريات النامية والمعزولة بطريقة العزل المباشر ، التخافيف والطعوم بالاعتماد على الصفات المظهرية والزرعية للمستعمرات النامية وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التي أوردها كل من (4) و(11).

طريقة التشخيص باستخدام فحص PCR Polymerase chain reaction

تم إجراء فحص PCR للتحري عن أنواع الفطر *Saprolegnia* وذلك باستخدام البادئات الخاصة بجين إل rDNA gene بتشخيص الفطر والتحري عن جين protease gene وبيان وجوده في نوعين من الفطر المذكور وهما *S.parasitica* و *S.ferax* وحسب ما جاء بطريقة (9).

فحص الحمض النووي المستخلص DNA profile

كشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من العينات الفطرية وذلك من خلال استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووية (DNA and RNA) حيث يتم الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي(ng\µl) DNA وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260-280nm) وتم استخدام الجهاز على النحو الآتي :-

1. بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA.
2. صفرت ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من(ddH2O) باستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وجراء التصفير وبعدها نقوم بتنظيف الركيزة لقياس العينات.
3. ضغط على زر البدء لتبدأ عملية قياس تركيز الـ DNA وذلك باستخدام 1 مايكروليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص ومن ثم نقوم بتنظيف ركيزة المقياس الجهاز مرة أخرى لقياس العينة الأخرى.
4. حددت نقاوة عينات الـ DNA المستخلص للعزلات الفطرية بقراءة الامتصاصية باستخدام جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجبين 260-280 nm حيث أن الحمض النووي DNA المستخلص هو نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي 1.8.

تحليل نتائج فحص الـ PCR

اجري الترحيل الكهربائي Agarose gel electrophoresis باستخدام هلام الاكاوز بنسبة 1% وذلك قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product analysis كما يأتي:

1. أذيب 1 غم من هلام الاكاوز Agarose gel في 100 µl من محلول ألـ TBE buffer الدارئ

بتركيز 1X وباستخدام جهاز Microwave لمدة 5 دقيقة.

2. ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 مْ وبعدها تم إضافة 3 مايكروليتر من صبغة الحمض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

3. صب هلام الاكاوز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد أماكن عينات الـ PCR ، وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم أزيل المشط من الهلام بعناية.

4. حملت العينات التي هي ناتج الفحص PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5. استخدم سلم القياس DNA ladder 100 لقياس ناتج PCR product ووضع في الحفرة الأولى.

6. بعد اكتمال عملية التحميل غمر هلام الاكاوز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 100 فولت و 80 أمبير لمدة ساعة واحدة.

7. بعد انتهاء عملية الترحيل فحص الهلام الحاوي على ناتج الـ PCR باستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الناتج مع وحدة القياس.

التحليل الإحصائي

أخضعت النتائج للتحليل الإحصائي لمعرفة الفروق المعنوية بين المواقع المدروسة وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى احتمال 5% باستخدام اختبار اقل فرق معنوي (LSD) واختبار (Chi-square) وتم حساب النسبة المئوية لظهور الفطريات في المواقع المدروسة من خلال المعادلة التالية:

عدد العزلات × 100

النسبة المئوية =

Results and Discussion النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص Isolation and identification

العزلات الفطرية

يبين الجدول 4-1 أعداد الفطريات المائية المعزولة في هذه الدراسة والنسبة المئوية لها باستخدام وسط سابرويد دكستروز أكار وباستخدام طريقة الطعوم ، إذ تم عزل وتشخيص اثنين من أنواع الجنس *Saprolegnia* وهما *S. parasitica* و *S. ferax* في الدراسة الحالية التي أجريت على الأنهار والبحيرات والعزل من الأسماك إذ يظهر من الجدول أدناه بان العدد الكلي للعينات كان 60 عينة توزعت بواقع 25 عينة من مياه الأنهار و 25 عينة من مياه البحيرات و 10 عينات من الأسماك وقد أعطت عينات الأنهار أعلى عدد للعزلات بلغت 16 عزلة وبنسبة مئوية مقدارها 64% تلتها عينات البحيرات بواقع 10 عزلات وشكلت نسبة مئوية مقدارها 40 % أما عينات الأسماك فكانت بعدد 5 عزلات وبنسبة مئوية مقدارها 50 % .

جدول 4-1 الفطريات المائية المعزولة وعدد العزلات والنسبة المئوية على

نوع العينة	عدد العينات المفحوصة	عدد العزلات	النسبة المئوية
الأنهار	25	16	%64
البحيرات	25	10	%40
الأسماك	10	5	%50

وسط السابرويد أكار

وتمثل ذلك خلال الدراسة التي بدأت من شهر كانون الأول لسنة 2013 ولغاية شهر أيار 2014 وقد ظهر أنَّ هنالك فرقاً معنوياً ($P<0.05$) في أعداد هذه الفطريات من موقع إلى أخر خلال مدة الدراسة لغرض عزل وتشخيص أنواع الفطر المذكور إذ تمثل الأنهار بيئة مناسبة لنمو أنواع الفطر *Saprolegnia* نظرا لتوفر الظروف المحيطة المناسبة من درجة الحرارة والدالة الحامضية والتركيز الملائم للأوكسجين المذاب والإضاءة وسرعة الجريان وخاصية الشد السطحي وقلة نسبة التلوث ولهذا كانت نسبة العزل 64% ، وجاءت البحيرات بنسبة اقل من حيث العزلات بالمقارنة مع الأنهار لكون البحيرات تكون ذات بيئة

اقل ملائمة لتواجد ونمو الفطريات المائية لان المياه راكدة وقليلة الحركة وبالتالي لاتعطي وفرة غذائية وأوكسجين مناسب لنمو هذه الفطريات ولا توجد تيارات مائية قوية تساهم في نشر سبوراتها ولهذا أعطت نسبة عزل 40% ويمكن أن يعزى التباين في نسب العزلات الفطرية في المواقع المدروسة إلى الاختلاف في الخصائص الوارد ذكرها وهو يتفق مع ما ذكره (1) الذي ذكر بأنه يمكن إن يعزى التباين في الفطريات التي تعيش في المياه العراقية بصورة عامة إلى التلوث الحاصل فيها والاختلاف في الخصائص الفيزيائية والكيميائية وغيرها من المؤثرات البيئية التي لها الأثر المباشر في تواجد هذه الفطريات.

لقد أعطت الأسماك نسبة عزل 50% مما يشير إلى أن الأسماك تتعرض بشكل كبير لمهاجمة الفطريات المائية لاسيما وان قشور الأسماك تشكل مادة غذائية مهمة لهذه الفطريات إذ أنها مؤلفة من مادة الكيراتين وهو يتفق مع ما ذكره (3) الذين ذكروا بان هذه الفطريات تهاجم الأسماك وتسبب تقرحات جلدية عند الإصابة وهي ناتجة عن النشاط الايضي الذي تمارسه أنواع هذا الفطر على الأنسجة بإفراز الإنزيمات الهاضمة اللازمة لتحليلها.

التوزيع المكاني للفطريات المعزولة

يبين الجدول (4-2) التوزيع المكاني للفطريات المعزولة خلال الدراسة الحالية وعدد العزلات للأنواع الفطرية المائية التابعة إلى الجنس *Saprolegnia* وهما *S.parasitica* و *S.ferax* حيث يلاحظ أنّ عدد العزلات التي تم الحصول عليها للنوعين المذكورين أعلاه متباينة من موقع إلى آخر ويعود سبب التباين في وجودها بتلك المواقع(الأنهار والبحيرات) إلى الاختلاف فيما بينها من ناحية الخصائص الكيميائية والفيزيائية ، إذ يظهر في الجدول أدناه بأنّ هنالك فرقاً معنوياً ($P<0.05$) واضحا بين النوعين في مواقع الدراسة حيث ظهر في الموقع الأول وهو الأنهار الذي كان الأكثر غزارة من ناحية تواجد هذه الفطريات عدد عزلات النوع الأول بواقع 6 عزلة وفي الموقع الثاني وهو البحيرات كان عدد العزلات بواقع 2 عزلة والعزل من الأسماك كان بواقع 3 عزلة ، أما النوع الثاني فان عدد عزلاته في الأنهار 10 عزلة وفي البحيرات 8 عزلة أما عدد العزلات من الأسماك فكان بواقع 2 عزلة وبهذا يكون العدد الكلي لمجوع عزلات النوعين في الأنهار 16 عزلة وفي البحيرات 10 عزلة أما العزل من الأسماك 5 عزلة.

جدول (4-2) الفطريات المعزولة حسب التوزيع المكاني.

نوع الفطر	الأنهار	البحيرات	العزل المباشر من الأسماك المصابة
S.parasitica	6	2	3
S.ferax	10	8	2
العدد الكلي للعزلات	16	10	5

إن سبب ارتفاع نسبة العزل بإعداد أكثر في الموقع الأول الأنهار من الموقع الثاني البحيرات في الدراسة الحالية يعود إلى كون الأنهار تمتاز ببعض الخصائص التي تميزها عن البحيرات من ناحية العوامل البيئية المتمثلة بالخصائص الكيميائية والفيزيائية وكذلك فإن الأنهار مناطق مفتوحة وتتغير مياهها باستمرار وهذا يصاحبه تغير في مكونات خصائصها الداخلية بالمقارنة مع البحيرات التي تكون مغلقة إذ أن درجة الحرارة في الأنهار تكون دائما مناسبة أكثر من البحيرات وذلك لأن الأنهار متحركة و هذا يؤدي إلى التقليل من نسبة التبخر وكذلك تتغير قيم الحامضية والكدرة و زيادة تركيز الأوكسجين المذاب وزيادة الشد السطحي وسرعة جريان الماء لتكون ملائمة أكثر لنمو الفطريات المائية والأحياء المتواجدة فيها وإن هذه الخصائص وغيرها هي التي تميز الأنهار وتجعلها أفضل بالمقارنة مع البحيرات التي تكون مياهها راكدة وتقل قيم الخصائص الكيميائية والفيزيائية فيها وكذلك تزداد معدلات التبخر للمياه كونها راكدة وتزداد نسبة الملوحة ويرافق هذا زيادة في القاعدية وتقل قيم الأوكسجين المذاب في الماء بالإضافة إلى التلوث فان له دورا مهما أيضاً في تحديد عدد العزلات والأنواع الفطرية إذ لوحظ انخفاض تواجد قسم من هذه الفطريات في المياه الملوثة ومن الأنواع التي لها القابلية على تحمل المعيشة والتواجد في المياه قليلة التلوث النوع *S.ferax* وهو يتفق مع ما ذكره (16) .

التوزيع الشهري للفطريات المعزولة وتأثير الخصائص الكيميائية والفيزيائية

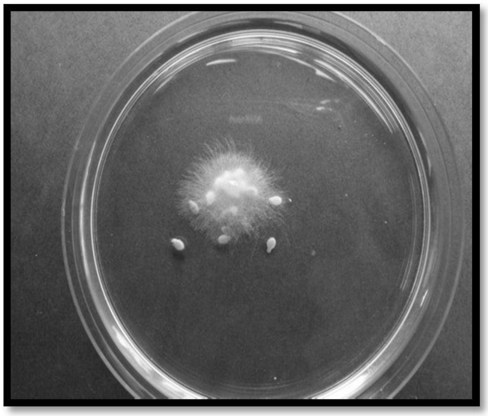
يبين الجدول 4-3 التوزيع الشهري وقياس مدى درجات الحرارة وأنواع الجنس *Saprolegnia* والمجموع الكلي لعدد العزلات وقيمة LSD لها ،إذ سجلت درجة الحرارة أدناها وكانت من 11-12 مْ في بداية الدراسة في شهر كانون الأول لسنة 2013 أما أقصاها فكانت في شهر أيار لسنة 2014 حيث كان مدى درجة الحرارة من 27–28 مْ أو أقل من ذلك بدرجة أو درجتين وهذا يتفق مع ما ذكره (2) في دراستهم على أنواع الفطر *Saprolegnia* في مياه شط العرب وفحص الإمراضية فيها، إذ كانت درجات الحرارة المسجلة في تلك المنطقة مقاربة إلى مواقع الدراسة الحالية.

جدول 4-3 التوزيع الشهري وقياس مدى درجات الحرارة وأنواع الجنس *Saprolegnia* والمجموع الكلي لعدد العزلات وقيمة LSD .

الأشهر	مدى درجة الحرارة (مْ)	*S.parasitica*	*S.ferax*
كانون الأول 2013/	12-11	4	3
كانون الثاني 2014/	11-10	5	7
شباط / 2014	16-12	12	10
آذار / 2014	19-18	6	8
نيسان / 2014	22-20	3	2
أيار / 2014	28-27	0	0
المجموع الكلي		30	30
قيمة LSD		2.60	3.24

إن أفضل شهر تم الحصول فيه على العزلات الفطرية بصورة وفيرة هو شهر شباط 2014 حيث تم عزل 12 عزلة من النوع الأول وهو *S.parasitica* و10 عزلة من النوع الثاني وهو *S.ferax* حيث كان قياس مدى درجة الحرارة من 12-16 مْ ، أما اقل عدد من العزلات التي تم الحصول عليها من الأنواع الفطرية فكان في شهر نيسان 2014 إذ تم عزل 3 عزلة من النوع الأول

و 2 عزلة من النوع الثاني وكان قياس مدى درجة الحرارة من 20-22 مْ ولم يتم الحصول على أي عزلة في شهر أيار 2014 وهو الشهر الأخير من مرحلة العزل والتشخيص حيث كان قياس مدى درجة الحرارة من 27-28 مْ .والصورة (1) تبين أنواع الفطر أو المستعمرة الفطرية ونموها على بذور الدخن خلال فترة العزل والتشخيص بطريقة الطعوم .

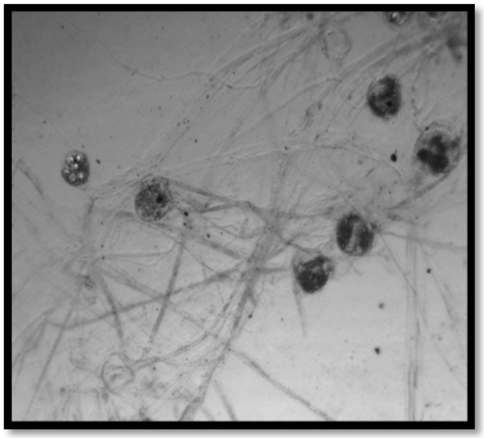


صورة (1)أنواع الفطر *Saprolegnia* النامية على بذور الدخن بطريقة الطعوم وعمر المستعمرة (72) ساعة.

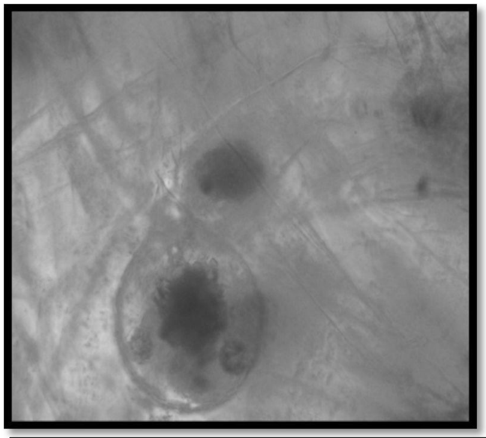
أنواع الفطر *Saprolegnia* المعزولة خلال الدراسة الحالية

النوع الأول *Saprolegnia parasitica* Coker

تراوح قطر مستعمرة هذا الفطر بعد أسبوعين من النمو على بذور الدخن 1- 1.5 سم وبلغ قطر الخيط الفطري عند القاعدة 25- 45 مايكرون،الخيوط الفطرية قليلة التفرع ، الجيمات غزيرة ذات أشكال مختلفة منتظمة غالباً وأحياناً غير منتظمة الشكل طرفية أو بينية الموقع وتتواجد بهيئة سلاسل، الحافظات السبورية طولية أو اسطوانية تتراوح أبعادها بين 35- 60 × 250- 950 مايكرون، قطر السبورات المتحوصلة يبلغ 12 مايكرون ،الحافظات السبورية كروية أو كمثرية الشكل وتكون طرفية أو جانبية الموقع يتراوح قطر الحافظات البيضية بين 45- 95 مايكرون وجدرانها ملساء ومنقرة عند التلامس مع الأنثريديا،حوامل الحافظات أسطوانية مستقيمة أبعادها 15- 30 × 50- 200 مايكرون ، قطر السبورات البيضية اللامركزية يبلغ 10- 25 مايكرون وعدده في الحافظة الواحدة 2- 40 يملأ التجويف ،الأنثريديا ثنائية الميل ويمتاز هذا الفطر بالقدرة على إصابة الأسماك وبيوضها وهو مطابق لما ذكره(11) وأشكاله هي :-



صورة (2) الفطر *S.parasitica*



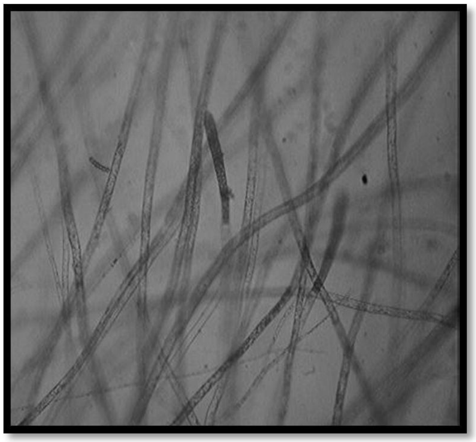
صورة (3) الحافظة السبورية للفطر *S.parasitica*

النوع الثاني *Saprolegnia ferax* (Gruith.)Thuret

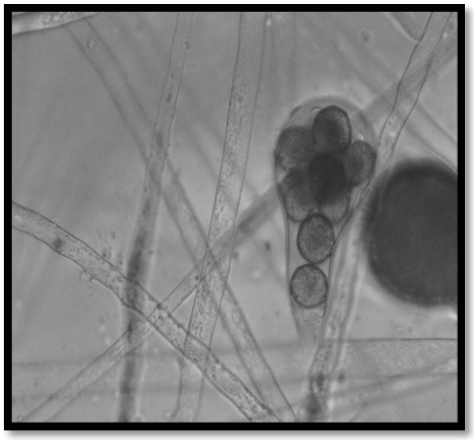
بلغ قطر مستعمرة هذا الفطر بعد تركها لمدة أسبوعين 1.7- 2.9 سم وقطر الخيط الفطري عند القاعدة بلغ 21-50 مايكرون ، الحافظات السبورية أسطوانية الشكل أبعادها 30-50 × 590−1115 مايكرون، قطر السبورات المتحوصلة 10-12 مايكرون ، الجيمات غزيرة وبأشكال مختلفة ، الحافظات البيضية كروية أو بيضوية الشكل أقطارها 40- 90 مايكرون ، فتكون أما جانبية أو طرفية أو بينية الموقع وقد تترتب بهيئة سلاسل ، وهذه الحافظات ذات جدار سميك ومنّقر. حامل الحافظات البيضية بأبعاد 20- 30 × 30-50 مايكرون ، السبورات البيضية المركزية أقطارها 25-35 مايكرون ، ويتراوح أعدادها بين 2-40 وغالباً ما تملأ التجويف ونادرا ما تلاحظ الأنثريديا وهذه الصفات مشابهة لما ذكره(11) وأشكاله هي -:

النوع الثاني *Saprolegnia ferax* (Gruith.)Thuret

بلغ قطر مستعمرة هذا الفطر بعد تركها لمدة أسبوعين 1.7- 2.9 سم وقطر الخيط الفطري عند القاعدة بلغ 21-50 مايكرون ، الحافظات السبورية أسطوانية الشكل أبعادها 30-50 × 590−1115 مايكرون، قطر السبورات المتحوصلة 10-12 مايكرون ، الجيمات غزيرة وبأشكال مختلفة ، الحافظات البيضية كروية أو بيضوية الشكل أقطارها 40- 90 مايكرون ، فتكون أما جانبية أو طرفية أو بينية الموقع وقد تترتب بهيئة سلاسل ، وهذه الحافظات ذات جدار سميك ومنّقر. حامل الحافظات البيضية بأبعاد 20- 30 × 30-50 مايكرون ، السبورات البيضية المركزية أقطارها 25-35 مايكرون ، ويتراوح أعدادها بين 2-40 وغالباً ما تملأ التجويف ونادرا ما تلاحظ الأنثريديا وهذه الصفات مشابهة لما ذكره(11) وأشكاله هي -:



صورة (4)الفطر *Saperolegnia ferax* – حافظة بوغية لاجنسية



صورة (5) الفطر *S.ferax* حافظة مشيجية أنثوية وبداخلها سبورات بيضية

تشخيص أنواع الجنس *Saprolegnia* بتقنية الـ PCR

اجري فحص الـ PCR وذلك للتحري عن أنواع جنس *Saprolegnia* وذلك باستخدام البادئات الخاصة بجين الـ rDNA gene بتشخيص الجنس والتحري عن جين protease gene وبيان وجوده في نوعين من الجنس المذكور وهما

S.parasitica و *S.ferax* وقد استعملت الطريقة السريعة لاستخلاص DNA وهي طريقة العدة الجاهزة وحسب ما تم ذكره في تعليمات الشركة المصنعة لغرض استخلاص DNA من العزلات الفطرية وقد بينت النتائج كفاءة الطريقة في الاستخلاص إذ تم الحصول على DNA بتراكيز في النوع *S.parasitica* منها 73,0-121,8 مايكروغرام/ مايكروليتر و بنقاوة 1,87-1,80علماً أنَّ نسبة النقاوة المعتمدة للتفاعل هي 1,8 وذلك باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووية DNA and RNA حيث تم الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي(DNA (ng\µl وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين 260-280nm وكما في جدول (4-4) الذي يوضح ذلك :-

الجدول 4-4 عينات الفطر *S.parasitica* ونسب التراكيز والنقاوة لها في فحص PCR باستخدام جهاز Nanodropspectrophotometer.

العينة	التركيزng/ml	النقاوة 1,8
***S.parasitica* 1**	73,0	1,80
***S.parasitica* 2**	76,0	1,80
***S.parasitica* 3**	81,8	1,82
***S.parasitica* 4**	84,3	1,83
***S.parasitica* 5**	96,5	1,83
***S.parasitica* 6**	117,8	1,84
***S.parasitica* 7**	119,3	1,85
***S.parasitica* 8**	120,7	1,85
9 *S.parasitica*	121,8	1,87

أما فيما يخص النوع الثاني *S.ferax* فكانت التراكيز 166,9- 2360,4 مايكروغرام/مايكروليتر وبنقاوة 1,75 – 2 علماً أن نسبة النقاوة المعتمدة للتفاعل هي 1,8 وأيضاً تم استخدام الجهاز نفسه الخاص بقياس التركيز والنقاوة وكما في الجدول الآتي:-

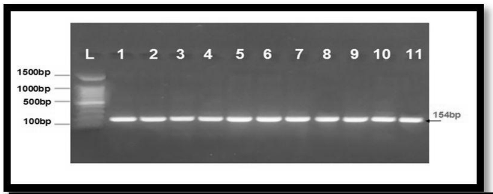
الجدول 4-5 عينات الفطر *S.ferax* ونسبة التركيز والنقاوة لها في فحص PCR باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer.

العينة	التركيزng/ml	النقاوة 1,8
***S.ferax* 1**	166,9	1,75
***S.ferax* 2**	205,4	1,78
***S.ferax* 3**	216,2	1,80
***S.ferax* 4**	355,2	1,82
***S.ferax* 5**	476,3	1,85
***S.ferax* 6**	574,9	1,87
***S.ferax* 7**	618,7	1,88
***S.ferax* 8**	870,4	1,89
***S.ferax* 9**	1336,7	1,91
***S.ferax* 10**	1489,2	1,93
***S.ferax* 11**	1655,1	1,95
***S.ferax* 12**	1843,5	1,96
***S.ferax* 13**	2163,7	1,98
***S.ferax* 14**	2360,4	2

القدرة على أنتاج الأنزيم المحلل للبروتين Protease

أن الغرض الأساسي من هذا الفحص أو الاختبار هو المقارنة بين النوعين الفطريين المعزولين في هذه الدراسة والتابعان إلى الجنس *Saprolegnia* من حيث أيهما يحتوي على هذا الأنزيم ، وبيان وجوده في أي نوع منهما يكون بتركيز أو نسبة عالية حسب مصدر العزلة ، لأن الأنزيم المحلل للبروتين يلعب دوراً رئيساً في الامراضية للأحياء المائية وهو ما أكده (12) أن هذا الأنزيم من الأنزيمات الرئيسية في الامراضية المتواجدة في الفطريات البيضية المائية حيث يحلل مكونات الجدار البروتينية ويتفاعل معها للأحياء

المائية ، ومن خلال ما ظهر في الترحيل الكهربائي على هلام الآكاروز بتركيز 1% فقد لوحظ عند فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية ظهور حزم برتقالية فاتحة ناتجة عن عملية التضاعف في أشارة إلى ارتباط البادئ مع التسلسل المكمل له في DNA القالب للأنواع الفطرية وقد أعطت نتيجة موجبة وكما في الصورة(4-13).



الصورة (4-13): الترحيل الكهربائي بهلام الآكاروز الذي يظهر نتائج فحص الـ PCR للتحري عن وجود الجين الخاص بأنزيم البروتيز Protease في الفطر *Saprolegnia parasitica* و *Saprolegnia ferax* حيث يمثل الخط(L)السلم القياسي(1500-100bp) والخط من (1-11) حزم جين rDNA gene الموجبة لفحص الـ PCR بطول(154bp) علما أن الترحيل الكهربائي بهلام الآكاروز بتركيز 1% وبتيار كهربائي 100 فولت و80 أمبير.

وممّا تقّدم نلاحظ أن الأنواع الفطرية أعطت نتيجة موجبة للفحص وهذا يتفق مع ما ذكره (2) في دراستهم البيئية على الفطريات المائية في مياه شط العرب واختبار فعاليتها الأنزيمية، وإن النتيجة الايجابية للفحص تعود إلى القدرة العالية لهذه الأنواع على تحليل البروتين الذي يلعب دوراً فعالاً في أمراضية هذه الفطريات إذ يقوم بتحليل مكونات الغشاء البروتينية للأسماك أو البيوض عند أصابتها (14).

المصادر العربية

1- الدوسري، يحيى عبد الجليل.(2006). دراسة فسلجية وبيئية لبعض أجناس العائلة السابرولكينيسية من نهر الفرات في مركز الرمادي والحبانية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الانبار.

2- محسن، توفيق محمد، عبد الحافظ ، الدبون وسناء، قاسم بدر.(2010). دراسة بيئية للفطريات المائية في مياه شط العرب وأحواض تربية الأسماك واختبار فعاليتها الأنزيمية، مجلة أبحاث البصرة (العلميات). العدد(37).

المصادر الأجنبية

1- **Al-Rekabi , S.A. ; Naeem , R.A. and Butty , K.N.(1996).** Specificity of Baits in isolation Saprolegniaceae Al-Mustansiriyah J.Sci. , 7(1):20-22.

2- **Anderson , G. (2001).** Differentiation and pathogenicity Within the Saprolegniaceae. Acta Univ. Upsal.

3- **Anderson, V.,Ssecombes, C.J.and Van West,P.(2006).** Developing avaccine against the fish pathogen ***Saprolegnia parasitica*** in Salmonid. http://www.pmgn.vbi.vt.edu.May.

4- **Cocker, W.C. (1965).**The Saprolegnaceae with notes on anther water molds. UNIV. N. C. Press, Chapl Hill, North Carolina., 201pp.

5- **Cerenius, L. and Soderball, K. (1996).** Saprolegniaceae , zoospore formation virulance and pathogenesis in animal hosts.In Adv. Zoosporic fungi . Publ. New Delhi :97-116.

6- **Dick , M. W. (1965).** The maintenance of stock cultures of saprolegniaceae . Mycola., 57 (5) : 828 – 831.

7- **Gohel, V, ; Singh, A. ; Vimal, M. ; Ashwini, P. and Chhapter, H. S. (2006).** Bioprospcting and antifungal potential of chitinolytic microorgamnisms. African Journal of Biotechnology, 5 (2) : 54-72.

8- **Hatai K, Hoshiai GI. (1994).** Pathogenicity of ***Saprolegnia parasitica*** Coker. In:Mueller GJ, editor. ***Salmon*** Saprolegniasis. Portland, Oregon, U.S. Department of Energy, Bonneville power Administration;. Pp.87-98.

9- **Jiang RHJ, de Bruijn I, Haas BJ, Belmonte R, L€obach L, Christie J,van den Ackerveken G, Bottin A, Bulone V, D_ıaz-Moreno SM,Dumas B, Fan L, Gaulin E, Govers F, Grenville-Briggs LJ, Broad Genome Annotation GroupHorner NR, Levin JZ, Mammella M,Meijer HJG, Morris M, Nusbaum C, Oome S, Phillips AJ,Rzeszutek E, Saraiva M, Secombes CJ, Seidl M, Snel B,Stassen JHM, Sykes S, Tripathy S, van den Berg AH,van Rooyen D, Vega-Arreguin JC, Wawra S, Young S,Dieguez-Uribeondo J, Russ C, Tyler BM, van West P, .(2013).**Distinctive repertoire of potential virulence genes in thegenome of the oomycete fish pathogen ***Saprolegnia parasitica***.PLOS-Genetics 9: e1003272.

10- **Moeller ,JR . ; Robert , B. (2001).** Diseases of fish. Armed Forces Institute of pathology washing tog D.C.

11- **Seymour, R. L. (1970).** The Genus *Saprolegnia* verlag von j. Gramar Germany. 124 pp.

12- **Stephen G.Kales.(2001).** Extracellular Serine Protease Activity among Selected Members of the Saprolegniales : Potential Role in Pathogenicity .University of Windsor , Ontario , Cananda.

13- **Sparrow, F. K. (1960).** Aquatic phycomycetes. 2nd. ED. Univ. of Mich. Press. Ann arober, Mich. 1187 pp.

14- **St-Leger, R. J. ; Joshi, L. and Roberts, D. (1997).** Adabtation of protease and carbohydrases of saprophytic , phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirments of their ecological niches. Microbiolo.,143:1983-1992.

15- **Webster,J.and Weber,R.(2007).**Introduction to fungi 3rd ed. Cambridge University Press,New York : 875pp.

16- **Willoughby, L. G. and Roberts, J.R.(1991).** Occurance of the sewage fungus ***Leptomitus Lacteus***.

Studying The Spreading Of Genus *Saprolegnia* In Waters Of Diwaniyah Province And Characterization The Molecularly

Receved :18/4/2015 Accepted : 4/6/2015

Muataz Mohammed Azooz Al-Zamli
Al-Qadisiya University
College of Education

Majid Kadhim Aboud
Al-Qadisiya University
College of Education

Abstract

The present study is concerned with isolation and identification of some aquatic fungi, including its species of *Saprolegnia* in the waters of Al-Diwaniyah province and molecular characterization. The study is regarded as the first in Iraq according to the information available to us.

Two species, *Saprolegnia parasitica* and *Saprolegnia ferax*, have been isolated from rivers, lakes and fish. The physical and chemical environmental characteristics have been measured. The types above have been examined to extract the DNA. The (PCR) technique has been used to examine the presence of proteases enzyme.

The results of isolation and identification showed that the percentage of the two types were 64% in rivers areas 40% in the lakes areas and 50% in fish. The rates represented the examined samples which were 60 samples. The *S. parasitica* species is more apparently found during (February, 2014), the number of samples was 12, the less presence of this species in (April, 2014), where the number of sample, was 3. The *S. ferax* species is more apparently presented in (February, 2014), the number of samples was 10. The less presence was in (April, 2014), the number of samples was 2. The results showed that the number of isolation of *Saprolegnia* species in study area was 6 in rivers, 2 in lakes, and 3 in fish.

The second species, *S. ferax* showed number of isolations which were 10 in rivers, 8 in lakes, and 2 in fish.

The PCR examination has used to detect the rDNA gene which responsible for proteases gene and whether it is found in the two species of fungi. The express way has been used to extract DNA and according to the instructions of manufacturer company. The concentrations of DNA in first species were 121.8-73.0 mcg/microliter and purity 1.87-1.80 .In the second species the concentrations of DNA were 2360.4-166.9 mcg/microliter and purity 2-1.75. The standard rate according to the instructions of company is 1.8, this has been measured by using the Nanodrop Spectrophotometer and reading the absorbing with wave length 260-280 nm and the efficiency of method used and molecular confirmation for fungi species and the determination of fungi species according to the sources of fungi isolation, which one of them is more spread in the study area and which one is more infections for fish. The *S. parasitica* species was less spread in rivers with percentage of 66.6%. And the percentage of the in lakes and fish was 100%. The second species *S.ferax* was more spread in rivers with percentage of 70%.The percentage of the in lakes 62% and fish was 100%.

The results, by using PCR technique, showed that the percentage of protease in first species was 25% in rivers. In lakes and fish was 100% .Concerning the second species, the percentage of enzyme was 42% in rivers, 40%in lakes, and 50% in fish.

It can be concluded that there is a diversity in fungi species with respect to study areas and enzyme secretion in the stages of fungi infection. The enzyme is more apparently found in *S.parasitica* species compared with *S.ferax* species.

Key word: *Saprolegnia* , *parasitica* , molecular confirmation

Microbiology Classification QR 74.5

The Research is apart of on MSC thesis in the case of the second Research .