مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۴، ۴۸۰-۴۷۳
Journal of Veterinary Research. 71,4:473-480, 2016
Original Article

شناسایی و جداسازی قارچ‌های شکمبه گوسفند بلوچی در سیستان

عیسی یعقوبی[۱] محمد رضا دهقانی[۲*] محمد چمنی[۳] مصطفی یوسف الهی[۲]
۱) دانش آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، زابل، ایران
۳) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۲۰ تیر ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: براساس اطلاعات تاکنون پژوهشی برای شناسایی و جداسازی قارچ‌های بی‌هوازی موجود در شکمبه گوسفند بلوچی در اقلیم خشک انجام نشده است. **هدف:** هدف از این تحقیق، جداسازی و مطالعه ریخت شناسی ظاهری قارچ‌های بی‌هوازی موجود درشکمبه گوسفند بلوچی در منطقه سیستان بود. **روش کار:** در این آزمایش از محیط کشت نیمه تعریف شده جهت کشت، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های بی‌هوازی استفاده گردید. نمونه برداری از محتویات جامد و مایع شکمبه ۵۰ راس گوسفند بلوچی به صورت تصادفی در کشتارگاه زابل انجام شد و از این نمونه‌ها به عنوان منبع قارچ جهت تلقیح به محیط کشت استفاده گردید. از روش رول باتل برای خالص‌سازی قارچ‌های شکمبه استفاده شد. از محلول آنتی بیوتیکی (آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، اکسی‌تتراسایکلین و کلرامفنیکل) برای ممانعت از رشد باکتری هااستفاده گردید . نمونه‌های خالص‌سازی پرگنه قارچ به محیط کشت منتقل و بعد از رشد به روی اسلاید شیشه‌ای قرار داده و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. قارچ‌های جداسازی شده همگی مونوسنتریک و دارای ریزوئید بودند. **نتایج:** با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی، جنس‌های *Neocallimastix*, *Piromyces* و گونه‌های *Piromyces communis*, *Piromyces minutus*, *Piromyces rhizinflata*, *Caecomyces communis* در شکمبه گوسفند بلوچی شناسایی شدند. **نتیجه‌گیری نهایی:** با شناسایی این گونه‌های قارچ در شکمبه گوسفند بلوچی، آزمایش‌های مولکولی و استخراج آنزیم برای بررسی بیشتر خصوصیات این گونه‌ها در پژوهش‌های آینده توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مورفولوژی، شکمبه، قارچ‌های بی‌هوازی، گوسفند بلوچی

مقدمه

توده میکروبی در شکمبه شامل طیف گسترده‌ای از انواع گونه‌های میکروبی می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، تک یاخته‌های مژکدار و تاژک دار و قارچ‌های بی‌هوازی بوده و ارتباط اکولوژیکی، فیزیولوژیکی، متابولیکی، تغذیه‌ای و ایمنی شناختی تنگاتنگی با میزبان خود برقرار می‌کنند (۱۴). استقرار و گسترش جمعیت میکروبی در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان مدتی پس از تولد صورت می‌گیرد (۱). قارچ‌های بی‌هوازی نخستین بار توسط Orpin در سال ۱۹۷۵ از شکمبه گوسفند جدا شدند. تا پیش از این کشف تصور بر این بود که باکتری‌ها و تک یاخته‌ها تنها ساکنان دستگاه گوارش نشخوارکنندگان هستند (۲۰). قارچ‌های شکمبه‌ای حدود ۸ ٪ توده زنده موجود در شکمبه را به خود اختصاص می‌دهند؛ آن‌ها معمولاً نخستین حمله کننده‌ها به مواد گیاهی در شکمبه بوده و با رشد و تخریب فیزیکی بافت‌های گیاهی، آن‌ها را برای دیگر میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها قابل دسترس می‌کنند (۱۶). قارچ‌ها در دستگاه گوارش تمام مناطق مختلف جغرافیایی جهان یافت شدند که در پیش معده نشخوارکنندگان مثل گاو، بز، آهو (۱۲) و گاومیش وحشی (۲۳) وجود دارند. *Piromyces* communis از پستانداران مختلفی استخراج شده است که از جمله می‌توان به استخراج آن از شکمبه گاو (۳)، شکمبه گوسفند (۲۲) و شکمبه بز (۲۵) اشاره کرد. *Neocallimastix* و *Piromyces* از شکمبه گوسفند (۲۷) جداسازی شده‌اند. گونه‌های *Piromyces minutus* و *Piromyces rhizinflata* از شکمبه گوسفند در مالزی (۱۳) و *Caecomyces communis* از شکمبه گوسفند در فرانسه (۹) استخراج شده است. بنابراین قارچها نقش مهمی در سست کردن و تجزیه بافت‌های فیبری، مقاوم و لیگنینی گیاهان دارند و جداسازی و شناسایی قارچها می‌تواند به فهم نقش آن‌ها درهضم خوراک‌های فیبری در حیوان کمک نماید. گوسفند بلوچی از جمله فراوان‌ترین نژاد گوسفند در ایران است که در منطقه سیستان و بلوچستان نیز جمعیت زیادی از این نژاد وجود دارد. تا کنون پژوهشی در مورد ریخت شناسی قا رچهای شکمبه این نژاد انجام نشده لذا هدف از این تحقیق جدا سازی و ریخت شناسی قارچهای شکمبه گوسفند بلوچی درمنطقه سیستان بوده است.

مواد و روش کار

در این آزمایش از محیط کشت نیمه تعریف شده که دارای مایع شکمبه صاف شده (Clarified Rumen Fluid) بود استفاده گردید (۱۷). از محلول‌های نمکی A و B در محیط کشت استفاده شد. محلول نمکی A شامل: ۳g پتاسیم هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، آمونیوم سولفات ۶ g ($(NH_4)_2SO_4$) (سدیم کلرید ۶ g ($NaCl$)، منیزیم سولفات ۰/۶g ($MgSo_4$)، کلرید کلسیم ۰/۶ g ($CaCl_2$) (به حجم ۱ l) و محلول نمکی B شامل: ۳ g دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) (به حجم ۱ l) تهیه شدند. محیط کشت نهایی شامل محلول نمکی A (۱۵۰ ml) + محلول

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۵۱-۳۲۲۴۴۴۴۳، نمابر: ۰۵۱-۳۲۲۴۴۴۴۳ Email: Mohrezadehghani@yahoo.com

نمکی B (۱۵۰ ml) + مایع شـکمبه صاف شده (۱۵۰ ml) + پپتون پروتئاز (۱۰ g) + عصاره مخمر (۲/۵ g) + بیکربنات سـدیم (۶ g) + ال- سیستئین هیدروکلراید (۱ g) + محلول رزازورین (۱ ml) بودند که با آب مقطر به حجم یک لیتر تهیه شـدند. از رزازورین برای نشان دادن شرایط اکسیداسیون – احیاء استفاده شد. محلول محیط کشت بعد از گازدهی با دی اکسید کربن و خارج کردن اکسـیژن در بطری‌های شیشـه‌ای (حجم ۹ ml) در شرایط بی‌هوازی منتقل گردید و بعد از گذاشتن درپوش به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰°C بـرای از بیـن بردن باکتری‌ها اتوکلاو شـد. بعلاوه برای ممانعت از رشـد باکتری‌ها ۰/۲ ml از محلول آنتی‌بیوتیک که شامل تتراسایکلین، کلرامفنیکل، استرپتومایسـین سولفات، پنی‌سیلین-جی، آمپی سیلین (به مقدار ۰/۵ g در ۱۰۰ ml آب مقطر تهیه شد) به بطری‌های شیشه‌ای دارای محیط کشت تزریق گردید. مایع شکمبه (محتویات جامد و مایع) از ۵۰ رأس گوسفند بلوچی به مدت ۱۰ روز به طور تصادفی در کشتارگاه شهرستان زابل اسـتخراج گردید. مایع شکمبه در فلاسک آب گرم (۳۹°C) نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس با پارچه چند لایه صاف گردید. مایع شکمبه به مقدار ۱ ml به هر بطری دارای محیط کشت منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. بطری‌ها دارای رشد قارچ (محیط کشت شفاف رنگ بوده و بالا آمدن سوبسترای نامحلول مثل ذرات کاه) جدا شدند. برای خالص سـازی گونه‌های قارچ از روش رول باتل (Roll bottle) استفاده شد (۱۵). در این روش یک لایه نازک آگار درون لوله شیشه‌ای منتقل و با سرد کردن بر روی یخ این لایه تثبیت شد و از محیط کشت دارای قارچ به این لوله‌ها انتقال داده شد. چندین مرحله این روش انجام شد تا نمونه‌های خالص رشد قارچ هر گونه حاصل و بعد از رشد به روی اسلاید شیشه‌ای منتقل گردید. گونه‌ها با میکروسـکوپ نـوری مـدل (Hund wetzlar, Germany) متصل به رایانه مشاهده و از هر گونه عکس تهیه شد.

نتایج

قارچ‌هـای جداسـازی شـده در این تحقیـق براسـاس خصوصیات مورفولوژیکی شناسـایی شـدند که همگی جزء انواع مونوسنتریک بودند (جدول ۱).

Neocallimastix sp.: جنس نئوکالیماستیکس از دستگاه گوارش گوسفند بلوچی استخراج گردید. قارچ‌های جنس نئوکالیماستیکس دارای تالوس مونوسـنتریک و اسپورانژیوم‌های اندوژنوس یا اگزونوس می‌باشند) تصویر ۱).

Piromyces sp.: ایـن قارچها از نظر ریخت‌شناسـی و به‌ویژه دارا بودن زئوسپورهای تک تاژکی، مونوسنتریک و سیستم ریزوییدی رشته‌ای از جنس پیرومایسـس بودند. زئوسپور در این جنس کروی تا گلابی شکل است و اغلب با یک تاژک دیده می‌شود. اسپورانژیوم در جنس پیرومایسس تخم مرغی شکل، کشـیده، بی‌قاعده (نامنظم) و نیز دارای برآمدگی‌های پاپیلا و غیر پاپیلا همراه با تارهای ریزوئیدی می‌باشد (تصویر۲).

جدول ۱. جنس و گونه‌های جدا شده از شکمبه گوسفند بلوچی.

جنس/گونه		
Neocallimastix	***Piromyces***	**Caecomyces**
----	***Piromyces communis***	***Caecomyces communis***
---	***Piromyces minutus***	
---	***Piromyces rhizinflata***	

Piromyces communis: ویژگی‌های ریخت‌شناسـی زیر، وجود قارچ‌های گونه پیرومایسـس کومونیس در شکمبه گوسفند بلوچی را مورد تأییـد قرار می‌دهد. در گونه پیرومایسـس کومونیـس ریزوییدها از یک (و بندرت دو) محور اصلی که معمولاً در پایه اسپورانژیوم اندوژنوس قرار دارد، منشأء می‌گیرند. پهنای ریزوییدهای اصلی حدود پنج تا پانزده میکرومتر است. ریزوییدهای اصلی فاقد تنگ شدگی (یا تنگ شدگی بسیار اندک در ناحیه گردن) است (تصویر ۳،۴).

Piromyces minutus:گونـه پیرومایسـس مینوتـوس دارای تالوس‌های مونوسـنتریک با اسپورانژیوم‌های منحصراً اندوژنوس هستند. اسپورانژیوم به شـکل‌های بیضوی، گلابی شکل یا کروی دیده می‌شوند. ریزوییدهـا از یک و گاهی بیـش از یک ریزوییدهای اصلی منشـأء می‌گیرند (تصویر۵).

Piromyces rhizinflata: پیرومایسـس ریزینفلاتـا دارای تالـوس مونوسـنتریک و اسـپورانژیوم اندوژنوس یا اگزوژنـوس و گاهی چنداسپورانژیومی می‌باشند که اسپورانژیوم‌های کوچک معمولاً طویل بوده درحالی که اسپورانژیوم‌های بزرگ‌تر، گلابی شکل، تخم مرغی، بیضوی و یا تقریباً کروی با قطری ۷۰µm تا ۱۰۰ هستند (تصاویر ۶،۷).

Caecomyces communis: سکومایسس کومونیس دارای رشد مونوسـنتریک یا مونوسنتریک چنداسـپورانژیومی با یک، دو و گاهی سه تا چهار اسـپورانژیوم بیضوی می‌باشـد که دارای اسپورانژیوم اندوژنوس یا اگزوژنوس هستند (تصویر ۸).

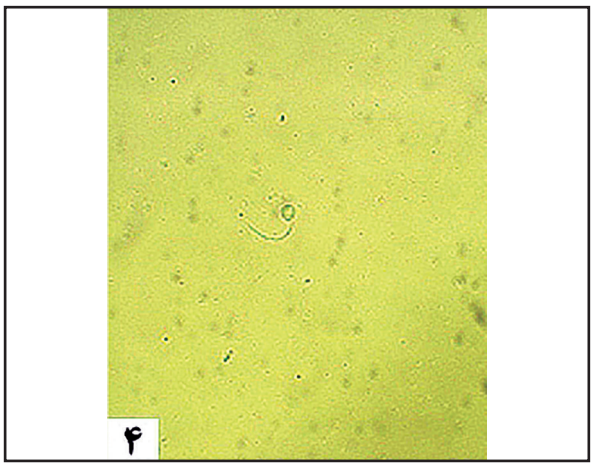
بحث

قارچ‌هـای بی‌هـوازی مانند سـایر کیتریدهـا دارای دو حالت ریخت شناسـی اصلی مونوسنتریک (تولید یک اندام تولید مثلی) و پلی سنتریک (تولید چندین اندام تولید مثلی) هستند. مونوسنتریک یا پلی سنتریک بودن از ویژگی‌های غیر قابل تغییر اسـت. زئوسـپور بسته به شرایط محیطی و جنس و گونه قارچ، سـه الگوی گسـترش بـرای ایجاد تالـوس دارد: ۱- اندوژنوس و مونوسـنتریک ۲- اگزوژنوس و مونوسنتریک۳- اگزوژنوس و پلی سـنتریک (۴). قارچ‌های مونوسنتریک سیستم ریزوئیدی، در حالی که قارچ‌های پلی سـنتریک، سیستم ریزومیسیلیومی تولید می‌کنند. در حالت اندوژنوس زئوسـپور هسـته را حفظ و اسـپورانژیوم جدید تولید می‌کند در حالی که در حالت اگزوژنوس هسـته از زئوسـپور خارج شده واسپورانژیوم

تصویر ۱. قارچ جنس *Neocallimastix*.

تصویر ۲. قارچ جنس *Piromyces*.

تصویر ۳. قارچ‌های جنس *Piromyces communis*.

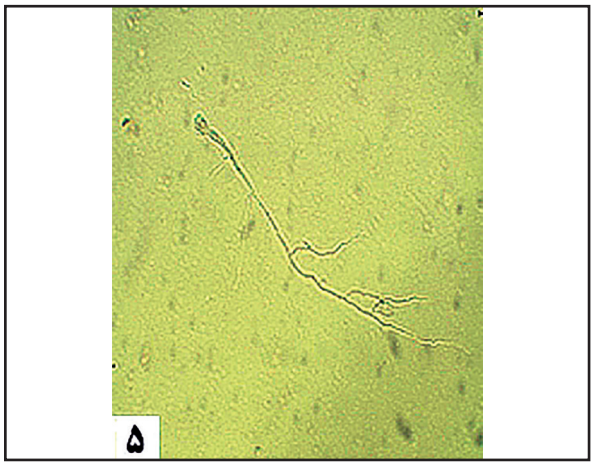


تصویر ۴. قارچ‌های جنس *Piromyces communis*.

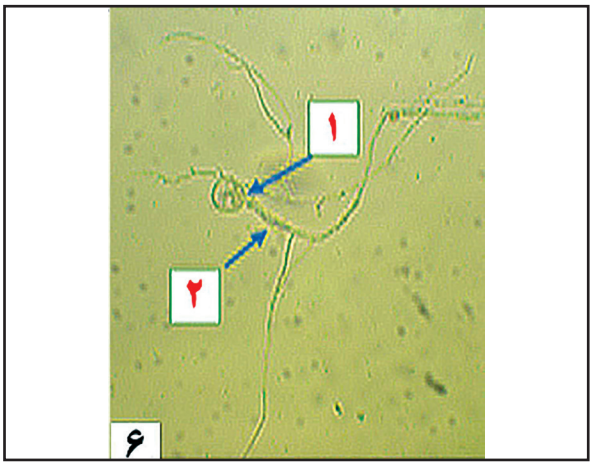
را تشکیل می‌دهد(۲۷). قارچ‌ها با سیستم ریزوییدی به بافت‌های گیاهی که برای دیگر میکروب‌ها قابل دسترس نیست، نفوذ می‌کنند. گونه‌های *Piromyces Neocallimastix* و orpinomyces با شدت زیادی فیبر را تجزیه می‌کنند. Caecomyces به دلیل نداشتن سیستم ریزوییدی توسعه یافته و منشعب، فیبر را کمتر تجزیه می‌نماید(۱۴).

Neocallimastix sp.: اسپورانژیوم‌های اگزوژنوس نئوکالیماستیکس به شکل کروی، بیضوی کشیده، تخم مرغی شکل و گاهی اوقات بی‌قاعده هستند و اسپورانژیوم‌های اندوژنوس آن بیضوی، گلابی شکل یا تخم مرغی شکل با اندازه‌های متغیر قطر طولی بین ۱۰ تا بیش از ۱۰۰µm می‌باشند. سیستم ریزوییدی جنس نئوکالیماستیکس بسیار منشعب و شاخه‌دار است. ریزوییدها ممکن است دارای نقاط به شدت تنگ شده باشند. زئوسپورها چندتاژکی و دارای شکل‌ها و اندازه‌های گوناگونی هستند. زئوسپورها کروی حدود ۱۵-۱۰ µm قطر داشته و دارای تعداد نسبتاً زیادی تاژک (بیش از ۱۰ تاژک) می‌باشد. این ویژگی‌ها با ویژگی‌های ریخت‌شناسی ارایه شده در تحقیق‌های انجام شده (۲،۱۸) مطابقت داده شد و با این تحقیق همخوانی دارند. وجود قارچ‌های جنس نئوکالیماستیکس در دستگاه گوارش پستانداران گیاهخوار نخستین بار با جداسازی گونه نئوکالیماستیکس فرونتالیس از شکمبه گوسفند به اثبات رسید. این کار توسط Orpin در سال ۱۹۷۵ در انگلستان صورت گرفت (۲۰). تصویر ۱ دارای تالوس با اسپورانژیوم اگزوژنوس و اسپورانژیوفورهای نسبتاً کوتاه می‌باشد. اسپورانژیوم اندوژنوس و اسپورانژیوفور نسبتاً کوتاه که دارای ریزوئیدهای فراوانی هست که این ریزوئیدها در هضم فیزیکی و شیمیایی مواد فیبری نقش بسزایی دارند. تحقیقات دیگر محققان نشان داد که بر روی انواع خوراک به ویژه خوراک‌های خشبی، زئوسپورهای تک تاژکی و چند تاژکی، تالوس مونوسنتریک و ریسه‌های افشان و غیر افشان با اسپورانژیوفورهای تخم مرغی شکل وجود دارند. اغلب قارچ‌های مشاهده شده از جنس‌های نئوکالیماستیکس و پیرومایسس بوده‌اند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۱۳). گونه‌هایی از قارچ‌های این جنس از دستگاه گوارش گوسفند و بز استخراج شده و از این لحاظ با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

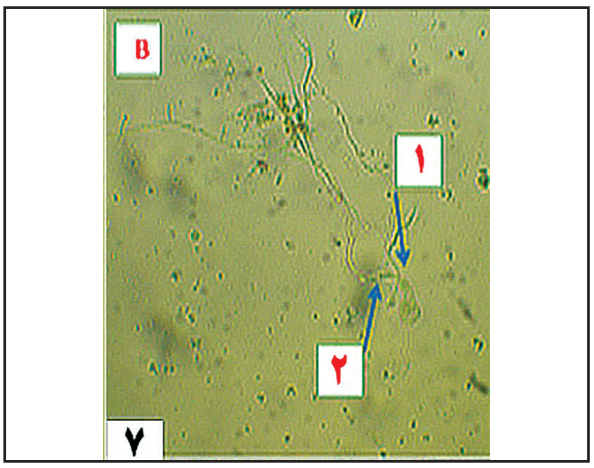
Piromyces sp.: تصویر ۲ نوعی قارچ از جنس پیرومایسس را نشان می‌دهند که دارای اسپورانژیوم‌های دمبلی شکل هستند و اسپورانژیوم‌های مونوسنتریک و دارای ریسه‌های بسیار ظریف می‌باشند. در تصویر ۲ در اسپورانژیوم برآمدگی‌های پاپیلا وجود دارد و دارای ریزوئیدهای گسترده،



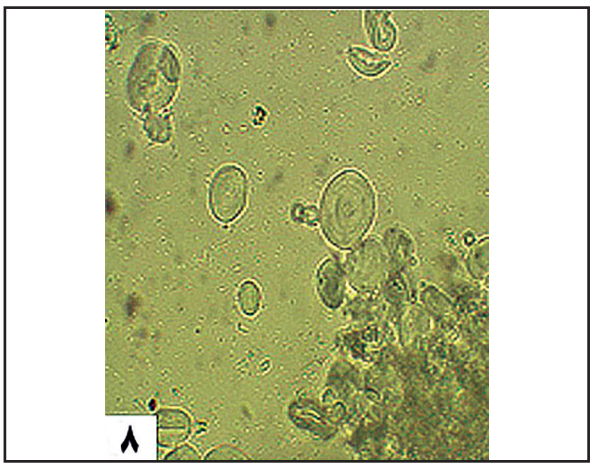
تصویر ۵. قارچ جنس *Piromyces minutus*.



تصویر ۶. قارچ‌های جنس *Piromyces rhizinflata*.



تصویر ۷. قارچ‌های جنس *Piromyces rhizinflata*.



تصویر ۸. قارچ جنس *Caecomyces communis*.

منشـعب و شاخه‌دارتر از نئوکالیماستیکس می‌باشد. وجود قارچ‌های جنس پیرومایسـس در دسـتگاه گوارش پسـتانداران گیاهخوار نخسـتین بار با جداسـازی گونه پیرومایسس کومونیس از شکمبه گوسفند به اثبات رسید. این کار توسـط Orpin در سـال ۱۹۷۷ در انگلستان صورت گرفت (۲۲). تاکنون گونه‌هایـی از قارچ‌های این جنس از پسـتانداران مختلف مناطق گوناگون اسـتخراج شده اسـت که از جمله می‌توان گوسفند و گاو (۳،۱۹) اشاره کرد.

Piromyces communis: گونه پیرومایسـس کومونیس در گروه تک قطبی‌ها (تالوس مونوسنتریک) قرار دارد و دارای اسپورانژیوم اندوژنوس یا اگزونوس می‌باشد. اسـپورانژیوم اغلب پس از بلوغ از اسپورانژیوفور جدا می‌شـود. اسـپورانژیوم‌های اندوژنوس کروی (۲۰µm تا ۱۰۰)، بیضوی یا گلابی شـکل، درحالی که اسـپورانژیوم‌های اگزوژنوس عموماً بیضوی تا گلابی شـکل و گاهی اوقات بی‌قاعده هستند. اسـپورانژیوفور دارای طول متغیر ازچند میکرون تا بیش از صد میکرون است .سیستم ریزوییدی بسیار منشـعب بوده و اغلب دارای بخش‌های تنگ شـده در طول ریزوییدها است (تصویر ۳). این ویژگی‌ها با ویژگی‌های ریخت‌شناختی ارائه شده (۷،۱۱،۲۵) همخوانی دارد. در تصاویر ۴ زئوسـپور تک تاژکی دیده می‌شوند. باتوجه به اینکه زئوسپور زنده و متحرک است در زیر میکروسکوپ حرکت تاژک آن مشاهده شد (در تصویر ۴ تاژک آن خمیده‌تر شده است). زئوسپورهای یک تاژکی معمولاً کوچک تر از چند تاژکی‌ها (قطر ۴µm تا ۱۱ در مقابل ۷µm تا ۲۲) هستند (۱۶). Chamani و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند زئوسپور در گونه پیرومایسس کومونیس تک تاژکی و در بیشتر موارد کروی شکل است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. تحقیقات دیگر محققان نشان داد زئوسـپور در گونه‌هایی که به تک تاژکی مشهورند، معمولاً یک تاژک داشته ولی در برخی موارد ممکن است زئوسپوهای ۲ تا ۴ تاژکی نیز در بین آن‌ها دیده شـود. زئوسـپورهای فعال گونه‌های چند تاژکی همیشه بیش از ۴ تاژک دارند (۱۶). گردن باریک یکی از ویژگی‌های متمایز کننده این گونه از سایر گونه‌های پیرومایسس است که این ویژگی مشابه گزارش Chamani و همکاران در سـال۲۰۰۴ می‌باشـد. پیرومایسس کومونیس نخستین بار توسط Orpin در سال ۱۹۷۷ در انگلستان از شکمبه گوسفند استخراج شد (۲۲). تاکنون این گونه از پستانداران مختلف مناطق گوناگون استخراج شده است که از جمله می‌توان به استخراج آن از شکمبه گوسفند در فرانسـه (۸،۱۰) و انگلسـتان (۲۲) اشـاره کرد. این گونه نیز از دسـتگاه

گوارش گوسفند و بز استخراج شده و از این لحاظ با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد.

Piromyces minutus: تصویر ۵ گونه *Piromyces minutus* را نشان می‌دهند که سیستم ریزوئیدی آن‌ها دارای یک ریزوئید اصلی غیر منشعب و مستقیم است که سیستم ریزوئیدی با انشعاب کم دارند. همانگونه که از شکل پیداست این گونه دارای کوچکترین اسپورانژیوم در بین جنس پیرومایسس می‌باشد که به راحتی می‌توان این گونه را شناسایی کرد و ریسه تالوس دارای تنگ شدگی‌ها و تورم می‌باشد. زئوسپورها در این گونه به دنبال اضمحلال بخش وسیعی از رأس اسپورانژیوم و ایجاد یک روزنه بزرگ آزاد می‌شوند. در اسپورانژیوم‌های بزرگ ممکن است دو روزنه ایجاد شود. دیواره اسپورانژیوم پس از رها شدن زئوسپورها سالم باقی می‌ماند. زئوسپورها کروی (پنج تا ده میکرومتر) و تک تاژکی می‌باشند. تنگ شدگی‌هایی ممکن است در ریزوئیدها دیده شوند این با ویژگی‌های ریخت شناختی ارایه شده (۴،۱۳) همخوانی دارد پیرومایسس مینوتوس نخستین بار توسط Ho و همکاران در سال ۱۹۹۳در مالزی از شکمبه گاو وگوسفنداستخراج شد (۱۱). محققان دیگر این گونه را از شکمبه بز و گوسفند (۱۱،۱۳) جداسازی کردند.

Piromyces rhizinflata: اسپورانژیوم‌های اندوژنوس کوچک تا متوسط، اغلب دارای انتهای باریک بخصوص در محل اتصال به ریزوییید اصلی هستند و گردن (محل اتصال اسپورانژیوفور به ریزوئید) باریکی دارند. اسپورانژیوم‌های اگزوژنوس دارای اسپورانژیوفورهای با طول متغیر هستند. اسپورانژیوفورها اغلب دارا ی یک تنگ شدگی در پایه خود هستند. ریزوییید اصلی معمولاً دارای یک تورم زیراسپورانژیومی است. سیستم ریزوییدی بسیار منشعب و شاخه دار بوده و در تالوس‌های بزرگ به حدود ۱mm می‌رسد (تصاویر ۶،۷). این ویژگی‌ها با ویژگی‌های ریخت شناختی ارائه شده (۵،۱۲) همخوانی دارد. در تصاویر ۷ و ۶ تالوس با اسپوراژیوم‌های اندوژنوس با تنگ شدگی گردن (شماره ۱a) و تورم زیر اسپورانژیومی (شماره ۲a) مشاهده می‌شود. در این تصاویر اسپوراژیوم‌های اندوژنوس با تنگ شدگی گردن و تورم زیر اسپورانژیومی دیده می‌شوند. پیرومایسس ریزینفلاتا نخستین بار توسط Breton و همکاران در سال ۱۹۹۱ در تونس از مدفوع الاغ صحرایی استخراج شد (۵). تاکنون این گونه از پستانداران مختلف مناطق گوناگون استخراج شده است که از جمله می‌توان به استخراج آن از شکمبه گاو، گوسفند، و بز در مالزی (۱۳) شکمبه گاومیش وحشی در کانادا (۲) اشاره کرد.

Caecomyces communis: سیستم ریزوییدی این گونه ممکن است یک پیازی، دو یا چند پیازی (در حالت تالوس چند اسپورانژیومی) باشد. معمولاً شکل یک پیازی در کشت‌های جوان و شکل چند پیازی (و چند اسپورانژیومی) در کشت‌های کهنه دیده می‌شوند. ریزوییدهای آن دارای قطری بین ۲۰μm تا ۱۰۰ می‌باشد. این ویژگی‌ها با ویژگی‌های ریخت شناسی ارایه شده (۶،۹،۲۸) همخوانی دارد. تصویر ۸ یک اسپورانژیوم اندوژنوس بالغ بیضوی را نشان می‌دهد که روی ریزوئید پیازی شکل رشد کرده است. HO و Barr در سال۱۹۹۵ نشان دادند یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد جنس سکومایسس نسبت به سایر قارچ‌های بی‌هوازی دستگاه گوارش این است که سیستم ریزوئیدی آن غیر رشته‌ای و غیر منشعب بوده و دارای حالتی پیازی شکل است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. تصویر ۱۰ سیستم ریزوئیدی چند پیازی این گونه‌ها را نشان می‌دهد. سکومایسس کومونیس نخستین بار توسط Orpin در سال ۱۹۷۶ در انگلستان از شکمبه گوسفند استخراج شد (۲۱). تاکنون این گونه از پستانداران مختلف مناطق گوناگون استخراج شده است که از جمله می‌توان به استخراج آن از شکمبه گوسفند در فرانسه (۶،۸،۹) اشاره کرد. آزمایش‌های مولکولی و استخراج آنزیم در این گونه‌ها برای بررسی بیشتر در پژوهش‌های آینده توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری: از شکمبه گوسفند بلوچی قارچ‌های جنس *Neocallimastix Piromyces* و Caecomyces جداسازی و شناسایی شد. با شناسایی این گونه‌های قارچ در شکمبه گوسفند بلوچی، آزمایش‌های مولکولی و استخراج آنزیم برای بررسی بیشتر خصوصیات این گونه‌ها در پژوهش‌های آینده توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

لازم است از مدیریت گروه علوم دامی دانشگاه زابل، آزمایشگاه گروه علوم دامی و گیاهپزشکی سرکار خانم مهندس نخعی مقدم و همچنین مدیران کشتارگاه زابل جهت همکاری تشکر و قدردانی شود.

References

1. Akin, D.E., Gordon, G.L.R., Rigsby, L. (1989) Comparative fiber degradation by mixed rumen fungi from Astralian and USA cattle. Anim Feed Sci Technol. 23: 305-321.
2. Barr, D.J.S. (1995) Contributions on the morphology and taxonomy of some rumen fungi from Canada. LIV. Mycotaxon. 54: 203-214.
3. Barr, D.J.S., Kudo, H., Jackober, K.D., Cheng, K.J. (1989) Morphology and development of rumen fungi: *Neocallimastix* sp., *Piromyces communis* and Orpinomyces bovis, gen. nov, sp. nov. Can J Bot. 67: 2815-2824.
4. Bauchop, T. (1979) Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. Appl Environment Microbiology. 38: 148-158.
5. Breton, A., Dusser, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J., Millet, L. Prensier, G. (1991) *Piromy-*

ces rhizinflata a species of strictly anaerobic fungus from feces of the Saharan ass: a morphological, metabolic and ultrastructural study. FEMS Microbiol Ecology. 66: 1-8.

6. Breton, A., G-Martinie, B., Gerbi, C., Gomez, S.B., Durand, R., Kherratia, B. (1995) Location by fluorescence microscopy of glycosidases and a xylanase in the anaerobic gut fungi *Caecomyces communis*, *Neocallimastix* frontalis, and *Piromyces rhizinflata*. Curr J Clin Microbiol. 31: 224-227.
7. Chamani, M., Rezaeian, M., Ershad, J., Jameie, P. (2004) Identification and study of morphological, biochemical, and metabolic characteristics of anaerobic fungus *Caecomyces communis* in rumen of sheep and goat. J Agic Sci. 10: 117-134.
8. Gaillard, B., Citron, A. (1989) Ultrastructural study of two rumen fungi: Piromonas communis and Sphaeromonas communis. Curr J Clin Microbiol .18: 83-86.
9. Gerbi, C., Bata, J., Breton, A., Prensier, G. (1996) Glycoside and polysaccharide hydrolase activity of the rumen anaerobic fungus *Caecomyces communis* (Sphaeromonas communis SENSU ORPIN) at early and final stages of the developmental cycle. Curr J Clin Microbiol. 32: 256-259.
10. Hebraud, M., Fevre, M. (1988) Characterization of Glycoside and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix* frontalis, sphaeromonas communis and Piromonas communis. J Gen Microbiol. 134: 1123-1129.
11. Ho, Y.W., Barr D.J.S., Abdullah N., Jalaludin, S., Kudo, H. (1993) A new species of *Piromyces* from the rumen of deer in Malaysia. Mycotaxon. 47: 285-293.
12. Ho, Y.W., Khoo, I.Y.S., Tan, S.G., Abdullah, N., Jalaludin, S., Kudo, H. (1994) Isozyme analysis of anaerobic rumen fungi and their relationship to aerobic chytrids. J Clin Microbiol. 140: 1495-1504.
13. Ho, Y.W., Bar, D.J.S. (1995) Classification of anaerobic fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia. Mycologia. 87: 655-677.
14. Hungate, R.E. (1966) The rumen bacteria. In: The Rumen and Its Microbes. Hungate, R.E. (ed.). Academic Press Inc. New York, London. p. 8-90.
15. Joblin, K.N. (1981) Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Appl Environ Microbiol. 42: 1119-1122.
16. Li, J., Heath, I.B. (1993) Chytridiomycetous gut fungi, oft overlooked contributors to herbivore digestion. Can J Microbiol. 39: 1003-1013.
17. Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J., Hespell, R.B. (1985) Growth of anaerobic rumen fungi on defined and Semi defined media lacking rumen fluid. J Gen Microbiol. 131: 2225-2229.
18. Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J. (1987) Isolation of anaerobic fungi from saliva and faeces of sheep. J Gen Microbiol. 133: 1829-1834.
19. Morrison, M., Mackie, R.I., Kistner, A. (1990) Evidence that cellulolysis by an anaerobic ruminal fungus is catabolite regulated by glucose, cellobiose, and soluble microscopy of glycosidases and a xylanase starch. Appl Environ Microbiology. 56: 3227-3229.
20. Orpin, C.G. (1975) Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix* frontalis. J Gen Microbiol. 91: 249-262.
21. Orpin, C.G. (1976) Studies on the rumen flagellate Sphaeromonas communis. J Gen Microbiol. 94: 270-280.
22. Orpin, C.G. (1977) The rumen flagellate Piromonas communis: its life-history and invasion of plant material in the rumen. J Gen Microbiol. 99: 107-117.
23. Paul, S.S., Kamra, D.N., Sastry, V.R.B., Agarwal, N. (2004) Effect of administration of an anaerobic gut fungus isolated from wild blue bull to buffaloes on in vivo ruminal fermentation and digestion of nutrients. Anim Feed Sci Technol. 115: 143-157.
24. Phillips, M.W., Gordon, G.L.R. (1989) Growth characteristics on cellobiose of three different anaerobic fungi isolation from the ovine rumen. Appl Environ Microbiol. 55: 1695-1702.

25. Sakurada, M., Morgavi, D.P., Tomita, Y., Onodera, R. (1995) Chitinolytic activity of the anaerobic rumen fungus *Piromyces communis* OTS1. Curr Microbiol. 31: 206-209.
26. Theodorou, M.K., Longland, A.C., Dhanoa, M.S., Lowe S.E., Trinci, A.P. (1989) Growth of *Neocallimastix* sp. strain R1 on Italian ryegrass hay: removal of neutral sugars from plant cell walls. Appl Environ Microbiol. 55: 1363-7.
27. Teunissen, M.J., Smits, A.A.M., Opden Camp, H.J.M., Huis in't Veld, J.H.J., Vogels, G.D. (1991) Fermentation of cellulose and production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by anaerobic fungi from ruminant and non-ruminant herbivores. Arch Microbiol. 156: 290-296.
28. Wubah, D.A., Fuller, M.S. (1991) Studies on *Caecomyces communis*: morphology and development. Mycologia. 83: 303-310.
29. Wubah, D.A., Fuller, M.S., Akin, D.E. (1991) *Neocallimastix*: a comparative morphological study. Can J Bot. 69: 835-843.

Identification and isolation of rumen fungi of baluchi sheep in Sistan

Yaghobi, E.[1], Dehghani, M.R.[2*], Chamani, M.[3], Yousef Elahi, M.[2]

[1]*Graduated from the Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran*
[2] *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol Respectively, Zabol, Iran*
[3]*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
(Received 10 July 2016, Accepted 21 September 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Based on the information no research has been done on the identification and isolation of anaerobic fungi in the Baloochi sheep's rumen in the dry climate up to now. **OBJECTIVES:** The purpose of this research was the separation and study of the appearance morphology of anaerobic fungi in the Baloochi sheep's rumen in Sistan region. **METHODS:** The semi-defined medium environment was used in this research for cultivation, separation and purification of anaerobic fungi. Sampling from the solid and liquid contents of 50 Baloochi sheep was done randomly in Zabol slaughterhouse and these samples were used as the source of fungus to inoculation to culture. The roll bottle method was used for purification of rumen fungi. The antibiotic solutions (ampicillin, penicillin, streptomycin, oxytetracycline and chloramphenicol) were used for inhibiting growth of bacteria. Samples of pure fungi were transferred to culture and were observed after growth in glass slide with light microscope. The separated fungi were all monocentric and had rhizoid. **RESULTS:** With regard to morphologic characteristics the genera of *Neocallimastix* and *Piromyces* and species of *Piromyces communis*, *Piromyces minutus*, *Piromyces rhizinflata*, *Caecomyces communis* was isolated in rumen of Baloochi sheep. **CONCLUSIONS:** With identification of these fungi species in rumen of Baloochi sheep, it is recommended to perform molecular test and enzyme extraction for further survey of characteristics in future research.

Keyword: morphology, rumen, anaerobic fungi, baloochi sheep

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The isolated genus and species from Baluchi rumen sheep.

Figure 1. Fungus genus of *Neocallimastix*.

Figure 2. Fungus genus of *Piromyces*.

Figure 3. Fungi genus of *Piromyces communis*.

Figure 4. Fungi genus of *Piromyces communis*.

Figure 5. Fungus genus of *Piromyces minutus*.

Figure 6. Fungi genus of *Piromyces rhizinflata*.

Figure 7. Fungi genus of *Piromyces rhizinflata*.

Figure 8. Fungus genus of *Caecomyces communis*.

***Corresponding author's email: Mohrezadehghani@yahoo.co, Tel: 051-32244443, Fax: 051-32244443**