بررسی حضور سه ویروس WSSV، IHHNV و TSV در میگوهای پرورشی و سخت پوستان وحشی در چوئبده – آبادان

مینا آهنگرزاده[1*]، حسین هوشمند[1]، سید رضا سید مرتضایی[2]،

1- پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

2- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

(m.ahangarzadeh@areeo.ac.ir) *

از آنجایی که در سالهای 1387 و 1389 مزارع پرورشی استان مجدداً دچار تلفات ناشی از WSSV گردیدند احتمال آن می-رفت که ویروس به ذخایر بومی منطقه منتقل شده و هر ساله با شروع دوره پرورش باعث تلفات در میگوهای پرورشی شود. لذا اطمینان از وجود یا عدم وجود این ویروس‌ها در آبزیان منطقه و میگوهای پرورشی و شناسایی عواملی که می توانند این ویروس‌ها (WSSV,TSV,IHHNV) را در خود حفظ کرده بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بدین منظور در طول دوره پرورش در سال‌های 1389و 1390از 11 مزرعه فعال بر اساس تراکم مزارع و 46 استخر نمونه برداری ، بصورت دو هفته یکبار و از پست لاروهای (100 پست لارو) 3 مرکز تکثیر فعال در منطقه قبل از ذخیره سازی نمونه برداری شد . مجموعاً از تعداد 140 میگوی وانامی در مزارع پرورشی نمونه‌برداری گردید همچنین از رودخانه بهمنشیر به صورت ماهیانه از دو ماه قبل از شروع دوره پرورش تا پایان دوره آزمایش(3 ماه پس از پایان دوره پرورش) از ابتدای سایت پرورش میگو تا انتهای سایت (روبروی کانال آبرسانC5) توسط تور ترال نمونه گیری صورت گرفت .در مجموع 12 بار از رودخانه بهمنشیر نمونه‌برداری شد که بیش از 120 قطعه میگوی وحشی و خرچنگ جهت آزمایشات مربوطه جمع آوری گردید. و نمونه ها با استفاده از روش مولکولی (کیت Iq2000) و آسیب شناسی برای شناسایی ویروس‌های WSSV، IHHNV و TSV مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در میگوهای وحشی رودخانه بهمنشیر چندین بار ویروس لکه سفید از فرم شدید تا خیلی خفیف شناسایی گردیداما در خرچنگ‌ها هیچ موردی از حضور ویروس مشاهده نگردید. در پست لاروها قبل از ذخیره سازی نیز فقط یک مورد از فرم خیلی خفیف ویروس لکه سفید مشاهده شد. در میگوهای پرورشی نیزموارد زیادی از حضور ویروس لکه سفید شناسایی شد که از فرم خیلی خفیف تا فرم شدید را شامل می‌شد که آزمایشات آسیب شناسی نیز حضور بیماری لکه سفید را تأیید کرد عامل بیماری‌زای TSV در میگوهای پرورشی فقط 2 مورد آن‌هم به فرم خیلی خفیف ردیابی شد عامل بیماریزایIHHNV در هیچ یک از میگوهای وحشی، خرچنگ‌های صید شده از رودخانه بهمنشیر، پست لاروها قبل از ذخیره سازی و میگوهای پرورشی شناسایی نشد حضور ویروس لکه سفید را در میگوهای پرورشی و وحشی و ویروس TSV را فقط در دو مورد از میگوهای پرورشی نشان داد ولی هیچ موردی از حضور ویروس IHHNV مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی : WSSV، IHHNV، TSV، وانامی، رودخانه بهمنشیر، چوئبده-آبادان

مقدمه

تولید جهانی آبزیان در سال 2010 با افزایش رو به رشد به 148/5 میلیون تن رسید و در ایران میزان تولید محصولات شیلاتی از 62550 تن (1/9 میلیارد دلار) در سال 2001 به 220034 تن (6/4 میلیارد دلار) در سال 2010 رسید و از لحاظ رتبه بندی در رتبه 21 جهانی قرار دارد (FAO year book، 2012). تولید میگوبرای قرن‌ها در بسیاری از کشورها پایدار مانده است. از این‌رو پرورش میگو به یک بخش مهم از صادرات به منظور کسب درآمد و ارزآوری تبدیل شده و این موفقیت، بسیاری از کشورها را تشویق به ورود به عرصه پرورش صنعتی میگو برای صادرات نمود (Bardhan، 2006).

بیماری‌ها در سیستم پرورش میگو یکی از محدودیت‌های اصلی برای افزایش تولید هستند و باعث کاهش چشم‌گیر در تولید و اشتغال، کاهش دستمزد، محدودیت در صادرات و کاهش اطمینان مشتری می‌شود.بیماری‌های میگو به دو دسته عفونی و غیر عفونی تقسیم می شوند ویروس‌ها به عنوان پاتوژن‌های مهم در میگو شناخته شده اند. میگو در مراحل مختلف زندگی به ویروس‌های خاصی

حساس می شود که باعث مرگ و میر، رشد کم و بد شکلی بدن می شود. بیشتر از 20 ویروس به عنوان پاتوژن برای میگو شناخته شده است(Bondad Reantaso et al., 2005).

با توجه به بروز بیماری لکه سفید در استانهای خوزستان و بوشهر در طی سالهای 81 و 84 و رکود، ضرر اقتصادی و خسارت ناشی از این بیماری به پرورش دهندگان، از سال 1385 گونه جدیدLitopenaeus vannamei به مزارع پرورش منطقه چوئبده آبادان معرفی گردید.از آنجایی که مزارع در سال 1387 و چندین مزرعه در سال 1389 دچار تلفات ناشی از WSSV گردید احتمال آن می‌رفت که ویروس به ذخایر بومی منطقه منتقل شده و یا بعضی از آبزیان موجود به صورت ناقل در آمده باشند و هر ساله با شروع دوره پرورش باعث تلفات در میگوهای پرورشی شود. درنتیجه به جهت اطمینان از وجود یا عدم وجود این ویروس ها در آبزیان منطقه و احتمال بیماری زایی آن ها در میگوهای پرورشی، شناسایی عواملی که می توانند این ویروس ها (WSSV,TSV,IHHNV) را در خود حفظ کرده و با انتقال آن ها به مزارع پرورشی، سیستم پرورش را مورد تهدید قرار دهند بسیار حائز اهمیت می نماید.

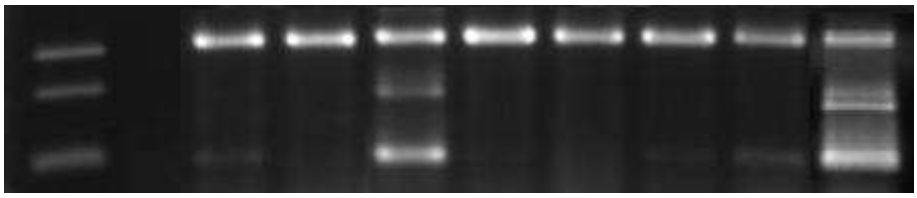
مواد و روش کار

جهت نمونه‌برداری از رودخانه بهمنشیر به صورت ماهیانه از دو ماه قبل از شروع دوره پرورش تا پایان دوره آزمایش(3 ماه پس از پایان دوره پرورش) از ابتدای سایت پرورش میگو تا انتهای سایت توسط تور ترال نمونه گیری صورت گرفت. پای شنا و آبشش میگو های وحشی و کل بدن خرچنگهای صید شده جدا گشته وجهت بررسی مولکولی در تثبیت کننده مناسب (الکل مطلق) قرار داده شد. همچنین کاراپاس، آبشش و بند 6 بدن جهت آزمایشات آسیب شناسی در تثبیت کننده دیویدسون قرار داده شد. از 10 مزرعه پرورش میگوی فعال بر اساس تراکم مزارع فعال در هر کانال نمونه برداری شد. نمونه برداری از ستخرهای این مزارع بصورت دو هفته یکبار انجام گردید و مطابق نمونه های وحشی ازبافتهای مورد نظر نمونه برداشته شد.

نمونه برداری از پست لاروهای مرحله 12 (100 پست لارو) 3 مرکز تکثیر فعال در منطقه قبل از ذخیره سازی جهت شناسایی و ردیابی ویروسهای مورد نظر نیز صورت گرفت. برای تشخیص ویروس‌های WSSV وIHHNV با استفاده از کیت IQ2000 استخراج DNA با استفاده از روش DTAB-CTAB و جهت تشخیص ویروس TSVT، از نمونه های مختلف RNA استخراج گردید. به منظور یکسان سازی اثر مقدار کمّی DNA به کارگرفته شده در همه آزمایش ها، با کمک یک دستگاه اسپکتروفتومتر (Genova MK2)غلظت هر یک از نمونه‌های به دست آمده اندازه گیری شده و به تجربه مشخص گردید که بهترین مقدار برای غلظت DNA مورد استفاده 150 ng/µl می باشد. لذا برای هر نمونه در مرحله واکنش PCR غلظت متناسب تهیه و به کار گرفته شد. کلیه مراحل PCR در تیوب های 0/2 میلی لیتری و در دو مرحله PCR اولیه و Nested PCR مطابق چرخه های دمایی ذکر شده در دستورالعمل کیت و با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر متعلق به شرکت Corbet (AUS)انجام گردید.

نتایج

در میگوهای وحشی رودخانه بهمنشیر چندین بار ویروس لکه سفید از فرم شدید تا خیلی خفیف شناسایی گردید(تصویر 1) اما در خرچنگ‌ها و پست لاروها قبل از ذخیره سازی هیچ موردی از حضور ویروس مشاهده نگردید ولی در میگوهای پرورشی موارد زیادی از حضور ویروس لکه سفید شناسایی شد که از فرم خیلی خفیف تا فرم شدید را شامل می‌شد. که این نتایج با تحقیقی که شریف پور و همکاران انجام دادند مطابقت دارد. که شاید به دلیل ورود ویروس همراه با غذا و یا ناقلین موجود در منطقه پرورشی و حتی میگوهای وحشی وارد شده به مزارع باشد. بر اساس گزارش Lightner در سال 1996 دوره کمون این بیماری در گونه‌های مختلف، بسته به مقاومت ایمنی میگوها متغیر است. Mohan در سال 2008 عنوان کرد یکی از فاکتورهای خطر در بروز بیماری لکه سفید استرس می باشد و عوامل استرس‌زا می‌توانند باعث کاهش توان دفاعی میگو شوند(Yu et al 2003). ویروس بیماری TSV در میگوهای وحشی و خرچنگ‌های صید شده از رودخانه بهمنشیر و پست لاروها قبل از ذخیره سازی شناسایی نگردید ولی در میگوهای پرورشی 2 مورد به فرم خیلی خفیف ردیابی شد.(تصویر2). عامل بیماری‌زای IHHNV نیز در میگوهای وحشی، خرچنگ‌های صید شده از رودخانه بهمنشیر، پست لاروها قبل از ذخیره سازی و میگوهای پرورشی شناسایی نشد (تصویر 3). یافته های این تحقیق با مطالعات دیگر محقیقن همچون otta و همکاران (2003) و Umesha و همکاران (2003) در میگوهای مونودون به ظاهر سالم توسط روش PCR در هند مطابقت دارد ولی در مطالعه ای که مرتضایی و همکاران در سال 1390 انجام دادند حضور همزمان ویروس های TSV، HPV و WSSV بارها مشاهده گردید.



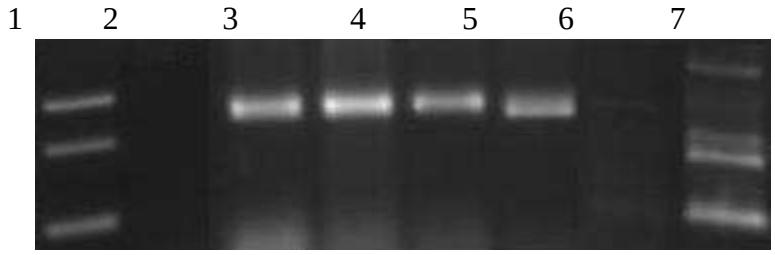
تصویر1- نمونه های WSSV کار شده با کیتIQ2000

ردیف1: نشانگر(M)، ردیف2: کنترل منفی(N)، ردیف10: کنترل مثبت(P)

ردیف 3، 6، 8 و9: دارای آلودگی خیلی ضعیف(V.L) به ویروس WSSV

ردیف 5: دارای آلودگی شدید(S) به ویروس WSSV

ردیف 4 و 7: نمونه منفی

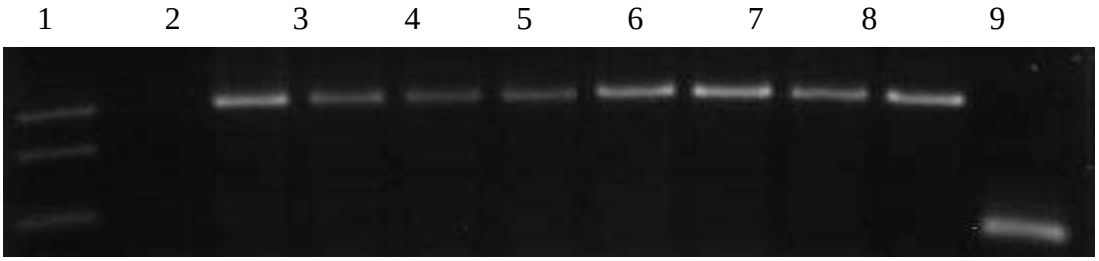


تصویر2- نمونه های TSV کار شده با کیتIQ2000

ردیف1: نشانگر(M)، ردیف2: کنترل منفی(N)، ردیف8: کنترل مثبت(P)

ردیف 3،4،5 و6: نمونه فاقد آلودگی به ویروس TSV

ردیف 7: دارای آلودگی خیلی ضعیف(V.L) به ویروس TSV



تصویر17- نمونه های IHHNV کار شده با کیتIQ2000

ردیف1: نشانگر(M)، ردیف2: کنترل منفی(N)، ردیف11: کنترل مثبت(P)

ردیف 3،4،5،6،7،8،9و10: نمونه فاقد آلودگی به ویروس IHHNV

منابع

1- سید مرتضایی،س.ر.، آهنگرزاده، م.، هوشمند، ح.، کر، ن.م.، جرفی،ا....(1388). گزارش نهایی پایش عوامل عفونی در استخرهای پرورش میگوی وانامی در چوئبده آبادان.. موسسه تحقیقات شیلات ایران .

2- **Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M., 2005.** Disease and health management in Asian Aquaculture. Vet. Parasitol. 132, 249-272.

3- **Bardhan, P. (2006).** Globalization and rural poverty. World Development, 34, 1393–404

4- **FAO Fisheries Department. State of world Aquaculture. (2012).** FAO Fisheries Technical Paper. Rome. 209 pp.

5- **Lightner, D.V., 1996.** A hand book of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA,USA, 304 p.
6- **Mohan, C.V., Phillips, M.J., Bhat, B.V., Umesh, N.R., Padiyar, P.A., 2008.** Farm-level plans and husbandry measures for aquatic animal disease emergencies. Rev. Sci. Tech.Off. Int. Epiz. 27 (1), 161–173
7- **Otta ,S.K.and I.Karunasagar. 2003.** Detection of MBV and WSSV in apparently healthy p.monodon from India by PCR.Aquaculture, vol.220, pp:56-69.
8- **Umesha , K.R.;A.Uma;S.K.Otta and I.karunasagar. 2003.** Detection By PCR of hepatopancreatic parvo virus (HPV) and other virus in hatchery – reared P. monodon post larve. Dis .Aquat org , vol. 57, pp: 141-146.
9- **Yu, Z., Li, C., Guan, Y., 2003.** Effect of salinity on the immune responses and outbreak of white spot syndrome in the shrimp Marsupenaeus japonicus. Ophelia 57, 99–106.

Abstract

Hight mortality occurred in Khuzestan province farms in 2007 and 2008 again.Probably viral agent was transferred to native shrimps or other aquatic animals, therefore it is very important that presence of viruses in local aquatic animals and its vectors detected. Detection of WSSV, TSVand IHHNV in aquatic animal from Khuzestan costal region imphasis to wild shrimp and craps is the main objectives of this study.So samples were taken from 10 active farms twice a week and 100 postlarves from 3 active breeding center befor stocking.Samples for viral detection were studied by molecular and histopathology asseys. Results was shown presence of the White spot virus in cultured and wild shrimp and TSV infection in only two cultured shrimps but there was negative result for IHHN virus.

Key word: WSSV, IHHNV, TSV, *Litopenaeus Vannamei*, Bahmanshir river, Choebdeh-Abadan