

شناسایی بیماری لکه سفید

Disease · Polymerase Chain Reaction (PCR) (WSSD) با روش (WSSD) در میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) در ایران

محمد افشار نسب^(۱)؛ فرا مرز لالویی^(۲) و سهراب رضوانی^(۳)

mafsharnasab@yahoo.com

۱ - ۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۱۱۶ - ۱۴۱۰۵

۹۶۱ - بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای مازندران، ساری صندوق پستی:

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۳

تاریخ ورود: تیر ۱۳۸۲

چکیده

در تابستان سال ۱۳۸۱ مرگ و میر شدیدی در میگوهای پرورشی گونه سفید هندی (*Penaeus indicus*) در منطقه چوئیله آبادان بوقوع پیوست. در میگوهای بیمار علائم شامل وجود لکه‌های سفید به اندازه ۰/۵ تا ۲ میلیمتر بر روی کاراپاکس، چذا شدن سریع کوتیکول از لایه اپiderم، خالی بودن معده و روده، بزرگ، زرد و شکننده شدن هپاتوبانکراس و فرم شدن اندامهای حرکتی مشاهده گردید. با توجه به مرگ و میر شدید میگوها و علائم کلینیکی مشاهده شده، نمونه‌ها مشکوک به بیماری لکه سفید یا *White spot syndrome disease* با استفاده از کیت تشخیص قطعی بیماری علاوه بر مشاهده علامت کلینیکی، روش تشخیص PCR با استفاده از کیت *Single.Tube Nested-DNA Amplification Kit for White spot syndrome disease* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نمونه از استخراج‌های پرورشی که مرگ و میر در آنها مشاهده شده بود از منطقه چوئیله آبادان و یکصد و بیست نمونه از استانهای بوشهر، هرمزگان و منطقه گمیشان که میگوها سالم و مرگ و میر گزارش نشده بود. جمع‌آوری و در الکل ۹۰ درصد ثبت شدند. نمونه‌ها به روش ارائه شده در کیت و روش فتل و کلروفورم استخراج شد. برای مشاهده کیفیت و کمیت DNA در ژل آگارز (ادرصد) الکتروفورز شدند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ویروس WSSD موجود در کیت PCR طبق دستورالعمل استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Corbet research) انجام پذیرفت. شرکت سازنده با استفاده از دستگاه الکتروفورز (۱۷۰ و ۲۰۰ و ۲۳۰ و ۲۶۰ و ۲۹۰ و ۳۲۰ و ۳۵۰ و ۳۸۰ و ۴۰۰ و ۴۲۰ و ۴۵۰ و ۴۸۰ و ۵۱۰ و ۵۴۰ و ۵۷۰ و ۶۰۰ و ۶۳۰ و ۶۶۰ و ۶۹۰ و ۷۲۰ و ۷۵۰ و ۷۸۰ و ۸۱۰ و ۸۴۰ و ۸۷۰ و ۹۰۰ و ۹۳۰ و ۹۶۰ و ۹۹۰ و ۱۰۲۰ و ۱۰۵۰ و ۱۰۸۰ و ۱۱۱۰ و ۱۱۴۰ و ۱۱۷۰ و ۱۲۰۰ و ۱۲۳۰ و ۱۲۶۰ و ۱۲۹۰ و ۱۳۲۰ و ۱۳۵۰ و ۱۳۸۰ و ۱۴۱۰ و ۱۴۴۰ و ۱۴۷۰ و ۱۵۰۰ و ۱۵۳۰ و ۱۵۶۰ و ۱۵۹۰ و ۱۶۲۰ و ۱۶۵۰ و ۱۶۸۰ و ۱۷۱۰ و ۱۷۴۰ و ۱۷۷۰ و ۱۸۰۰ و ۱۸۳۰ و ۱۸۶۰ و ۱۸۹۰ و ۱۹۲۰ و ۱۹۵۰ و ۱۹۸۰ و ۲۰۱۰ و ۲۰۴۰ و ۲۰۷۰ و ۲۱۰۰ و ۲۱۳۰ و ۲۱۶۰ و ۲۱۹۰ و ۲۲۲۰ و ۲۲۵۰ و ۲۲۸۰ و ۲۳۱۰ و ۲۳۴۰ و ۲۳۷۰ و ۲۴۰۰ و ۲۴۳۰ و ۲۴۶۰ و ۲۴۹۰ و ۲۵۲۰ و ۲۵۵۰ و ۲۵۸۰ و ۲۶۱۰ و ۲۶۴۰ و ۲۶۷۰ و ۲۷۰۰ و ۲۷۳۰ و ۲۷۶۰ و ۲۷۹۰ و ۲۸۲۰ و ۲۸۵۰ و ۲۸۸۰ و ۲۹۱۰ و ۲۹۴۰ و ۲۹۷۰ و ۳۰۰۰ و ۳۰۳۰ و ۳۰۶۰ و ۳۰۹۰ و ۳۱۲۰ و ۳۱۵۰ و ۳۱۸۰ و ۳۲۱۰ و ۳۲۴۰ و ۳۲۷۰ و ۳۳۰۰ و ۳۳۳۰ و ۳۳۶۰ و ۳۳۹۰ و ۳۴۲۰ و ۳۴۵۰ و ۳۴۸۰ و ۳۵۱۰ و ۳۵۴۰ و ۳۵۷۰ و ۳۶۰۰ و ۳۶۳۰ و ۳۶۶۰ و ۳۶۹۰ و ۳۷۲۰ و ۳۷۵۰ و ۳۷۸۰ و ۳۸۱۰ و ۳۸۴۰ و ۳۸۷۰ و ۳۹۰۰ و ۳۹۳۰ و ۳۹۶۰ و ۳۹۹۰ و ۴۰۲۰ و ۴۰۵۰ و ۴۰۸۰ و ۴۱۱۰ و ۴۱۴۰ و ۴۱۷۰ و ۴۲۰۰ و ۴۲۳۰ و ۴۲۶۰ و ۴۲۹۰ و ۴۳۲۰ و ۴۳۵۰ و ۴۳۸۰ و ۴۴۱۰ و ۴۴۴۰ و ۴۴۷۰ و ۴۵۰۰ و ۴۵۳۰ و ۴۵۶۰ و ۴۵۹۰ و ۴۶۲۰ و ۴۶۵۰ و ۴۶۸۰ و ۴۷۱۰ و ۴۷۴۰ و ۴۷۷۰ و ۴۸۰۰ و ۴۸۳۰ و ۴۸۶۰ و ۴۸۹۰ و ۴۹۲۰ و ۴۹۵۰ و ۴۹۸۰ و ۵۰۱۰ و ۵۰۴۰ و ۵۰۷۰ و ۵۱۰۰ و ۵۱۳۰ و ۵۱۶۰ و ۵۱۹۰ و ۵۲۲۰ و ۵۲۵۰ و ۵۲۸۰ و ۵۳۱۰ و ۵۳۴۰ و ۵۳۷۰ و ۵۴۰۰ و ۵۴۳۰ و ۵۴۶۰ و ۵۴۹۰ و ۵۵۲۰ و ۵۵۵۰ و ۵۵۸۰ و ۵۶۱۰ و ۵۶۴۰ و ۵۶۷۰ و ۵۷۰۰ و ۵۷۳۰ و ۵۷۶۰ و ۵۷۹۰ و ۵۸۲۰ و ۵۸۵۰ و ۵۸۸۰ و ۵۹۱۰ و ۵۹۴۰ و ۵۹۷۰ و ۶۰۰۰ و ۶۰۳۰ و ۶۰۶۰ و ۶۰۹۰ و ۶۱۲۰ و ۶۱۵۰ و ۶۱۸۰ و ۶۲۱۰ و ۶۲۴۰ و ۶۲۷۰ و ۶۳۰۰ و ۶۳۳۰ و ۶۳۶۰ و ۶۳۹۰ و ۶۴۲۰ و ۶۴۵۰ و ۶۴۸۰ و ۶۵۱۰ و ۶۵۴۰ و ۶۵۷۰ و ۶۶۰۰ و ۶۶۳۰ و ۶۶۶۰ و ۶۶۹۰ و ۶۷۲۰ و ۶۷۵۰ و ۶۷۸۰ و ۶۸۱۰ و ۶۸۴۰ و ۶۸۷۰ و ۶۹۰۰ و ۶۹۳۰ و ۶۹۶۰ و ۶۹۹۰ و ۷۰۲۰ و ۷۰۵۰ و ۷۰۸۰ و ۷۱۱۰ و ۷۱۴۰ و ۷۱۷۰ و ۷۲۰۰ و ۷۲۳۰ و ۷۲۶۰ و ۷۲۹۰ و ۷۳۲۰ و ۷۳۵۰ و ۷۳۸۰ و ۷۴۱۰ و ۷۴۴۰ و ۷۴۷۰ و ۷۵۰۰ و ۷۵۳۰ و ۷۵۶۰ و ۷۵۹۰ و ۷۶۲۰ و ۷۶۵۰ و ۷۶۸۰ و ۷۷۱۰ و ۷۷۴۰ و ۷۷۷۰ و ۷۸۰۰ و ۷۸۳۰ و ۷۸۶۰ و ۷۸۹۰ و ۷۹۲۰ و ۷۹۵۰ و ۷۹۸۰ و ۸۰۱۰ و ۸۰۴۰ و ۸۰۷۰ و ۸۱۰۰ و ۸۱۳۰ و ۸۱۶۰ و ۸۱۹۰ و ۸۲۲۰ و ۸۲۵۰ و ۸۲۸۰ و ۸۳۱۰ و ۸۳۴۰ و ۸۳۷۰ و ۸۴۰۰ و ۸۴۳۰ و ۸۴۶۰ و ۸۴۹۰ و ۸۵۲۰ و ۸۵۵۰ و ۸۵۸۰ و ۸۶۱۰ و ۸۶۴۰ و ۸۶۷۰ و ۸۷۰۰ و ۸۷۳۰ و ۸۷۶۰ و ۸۷۹۰ و ۸۸۲۰ و ۸۸۵۰ و ۸۸۸۰ و ۸۹۱۰ و ۸۹۴۰ و ۸۹۷۰ و ۹۰۰۰ و ۹۰۳۰ و ۹۰۶۰ و ۹۰۹۰ و ۹۱۲۰ و ۹۱۵۰ و ۹۱۸۰ و ۹۲۱۰ و ۹۲۴۰ و ۹۲۷۰ و ۹۳۰۰ و ۹۳۳۰ و ۹۳۶۰ و ۹۳۹۰ و ۹۴۲۰ و ۹۴۵۰ و ۹۴۸۰ و ۹۵۱۰ و ۹۵۴۰ و ۹۵۷۰ و ۹۶۰۰ و ۹۶۳۰ و ۹۶۶۰ و ۹۶۹۰ و ۹۷۲۰ و ۹۷۵۰ و ۹۷۸۰ و ۹۸۱۰ و ۹۸۴۰ و ۹۸۷۰ و ۹۹۰۰ و ۹۹۳۰ و ۹۹۶۰ و ۹۹۹۰ و ۱۰۰۲۰ و ۱۰۰۵۰ و ۱۰۰۸۰ و ۱۰۱۱۰ و ۱۰۱۴۰ و ۱۰۱۷۰ و ۱۰۲۰۰ و ۱۰۲۳۰ و ۱۰۲۶۰ و ۱۰۲۹۰ و ۱۰۳۲۰ و ۱۰۳۵۰ و ۱۰۳۸۰ و ۱۰۴۱۰ و ۱۰۴۴۰ و ۱۰۴۷۰ و ۱۰۵۰۰ و ۱۰۵۳۰ و ۱۰۵۶۰ و ۱۰۵۹۰ و ۱۰۶۲۰ و ۱۰۶۵۰ و ۱۰۶۸۰ و ۱۰۷۱۰ و ۱۰۷۴۰ و ۱۰۷۷۰ و ۱۰۸۰۰ و ۱۰۸۳۰ و ۱۰۸۶۰ و ۱۰۸۹۰ و ۱۰۹۲۰ و ۱۰۹۵۰ و ۱۰۹۸۰ و ۱۱۰۱۰ و ۱۱۰۴۰ و ۱۱۰۷۰ و ۱۱۱۰۰ و ۱۱۱۳۰ و ۱۱۱۶۰ و ۱۱۱۹۰ و ۱۱۲۲۰ و ۱۱۲۵۰ و ۱۱۲۸۰ و ۱۱۳۱۰ و ۱۱۳۴۰ و ۱۱۳۷۰ و ۱۱۴۰۰ و ۱۱۴۳۰ و ۱۱۴۶۰ و ۱۱۴۹۰ و ۱۱۵۲۰ و ۱۱۵۵۰ و ۱۱۵۸۰ و ۱۱۶۱۰ و ۱۱۶۴۰ و ۱۱۶۷۰ و ۱۱۷۰۰ و ۱۱۷۳۰ و ۱۱۷۶۰ و ۱۱۷۹۰ و ۱۱۸۲۰ و ۱۱۸۵۰ و ۱۱۸۸۰ و ۱۱۹۱۰ و ۱۱۹۴۰ و ۱۱۹۷۰ و ۱۲۰۰۰ و ۱۲۰۳۰ و ۱۲۰۶۰ و ۱۲۰۹۰ و ۱۲۱۲۰ و ۱۲۱۵۰ و ۱۲۱۸۰ و ۱۲۲۱۰ و ۱۲۲۴۰ و ۱۲۲۷۰ و ۱۲۳۰۰ و ۱۲۳۳۰ و ۱۲۳۶۰ و ۱۲۳۹۰ و ۱۲۴۲۰ و ۱۲۴۵۰ و ۱۲۴۸۰ و ۱۲۵۱۰ و ۱۲۵۴۰ و ۱۲۵۷۰ و ۱۲۶۰۰ و ۱۲۶۳۰ و ۱۲۶۶۰ و ۱۲۶۹۰ و ۱۲۷۲۰ و ۱۲۷۵۰ و ۱۲۷۸۰ و ۱۲۸۱۰ و ۱۲۸۴۰ و ۱۲۸۷۰ و ۱۲۹۰۰ و ۱۲۹۳۰ و ۱۲۹۶۰ و ۱۲۹۹۰ و ۱۳۰۲۰ و ۱۳۰۵۰ و ۱۳۰۸۰ و ۱۳۱۱۰ و ۱۳۱۴۰ و ۱۳۱۷۰ و ۱۳۲۰۰ و ۱۳۲۳۰ و ۱۳۲۶۰ و ۱۳۲۹۰ و ۱۳۳۲۰ و ۱۳۳۵۰ و ۱۳۳۸۰ و ۱۳۴۱۰ و ۱۳۴۴۰ و ۱۳۴۷۰ و ۱۳۵۰۰ و ۱۳۵۳۰ و ۱۳۵۶۰ و ۱۳۵۹۰ و ۱۳۶۲۰ و ۱۳۶۵۰ و ۱۳۶۸۰ و ۱۳۷۱۰ و ۱۳۷۴۰ و ۱۳۷۷۰ و ۱۳۸۰۰ و ۱۳۸۳۰ و ۱۳۸۶۰ و ۱۳۸۹۰ و ۱۳۹۲۰ و ۱۳۹۵۰ و ۱۳۹۸۰ و ۱۴۰۱۰ و ۱۴۰۴۰ و ۱۴۰۷۰ و ۱۴۱۰۰ و ۱۴۱۳۰ و ۱۴۱۶۰ و ۱۴۱۹۰ و ۱۴۲۲۰ و ۱۴۲۵۰ و ۱۴۲۸۰ و ۱۴۳۱۰ و ۱۴۳۴۰ و ۱۴۳۷۰ و ۱۴۴۰۰ و ۱۴۴۳۰ و ۱۴۴۶۰ و ۱۴۴۹۰ و ۱۴۵۲۰ و ۱۴۵۵۰ و ۱۴۵۸۰ و ۱۴۶۱۰ و ۱۴۶۴۰ و ۱۴۶۷۰ و ۱۴۷۰۰ و ۱۴۷۳۰ و ۱۴۷۶۰ و ۱۴۷۹۰ و ۱۴۸۲۰ و ۱۴۸۵۰ و ۱۴۸۸۰ و ۱۴۹۱۰ و ۱۴۹۴۰ و ۱۴۹۷۰ و ۱۵۰۰۰ و ۱۵۰۳۰ و ۱۵۰۶۰ و ۱۵۰۹۰ و ۱۵۱۲۰ و ۱۵۱۵۰ و ۱۵۱۸۰ و ۱۵۲۱۰ و ۱۵۲۴۰ و ۱۵۲۷۰ و ۱۵۳۰۰ و ۱۵۳۳۰ و ۱۵۳۶۰ و ۱۵۳۹۰ و ۱۵۴۲۰ و ۱۵۴۵۰ و ۱۵۴۸۰ و ۱۵۵۱۰ و ۱۵۵۴۰ و ۱۵۵۷۰ و ۱۵۶۰۰ و ۱۵۶۳۰ و ۱۵۶۶۰ و ۱۵۶۹۰ و ۱۵۷۲۰ و ۱۵۷۵۰ و ۱۵۷۸۰ و ۱۵۸۱۰ و ۱۵۸۴۰ و ۱۵۸۷۰ و ۱۵۹۰۰ و ۱۵۹۳۰ و ۱۵۹۶۰ و ۱۵۹۹۰ و ۱۶۰۲۰ و ۱۶۰۵۰ و ۱۶۰۸۰ و ۱۶۱۱۰ و ۱۶۱۴۰ و ۱۶۱۷۰ و ۱۶۲۰۰ و ۱۶۲۳۰ و ۱۶۲۶۰ و ۱۶۲۹۰ و ۱۶۳۲۰ و ۱۶۳۵۰ و ۱۶۳۸۰ و ۱۶۴۱۰ و ۱۶۴۴۰ و ۱۶۴۷۰ و ۱۶۵۰۰ و ۱۶۵۳۰ و ۱۶۵۶۰ و ۱۶۵۹۰ و ۱۶۶۲۰ و ۱۶۶۵۰ و ۱۶۶۸۰ و ۱۶۷۱۰ و ۱۶۷۴۰ و ۱۶۷۷۰ و ۱۶۸۰۰ و ۱۶۸۳۰ و ۱۶۸۶۰ و ۱۶۸۹۰ و ۱۶۹۲۰ و ۱۶۹۵۰ و ۱۶۹۸۰ و ۱۷۰۰۰ و ۱۷۰۳۰ و ۱۷۰۶۰ و ۱۷۰۹۰ و ۱۷۱۲۰ و ۱۷۱۵۰ و ۱۷۱۸۰ و ۱۷۲۱۰ و ۱۷۲۴۰ و ۱۷۲۷۰ و ۱۷۳۰۰ و ۱۷۳۳۰ و ۱۷۳۶۰ و ۱۷۳۹۰ و ۱۷۴۲۰ و ۱۷۴۵۰ و ۱۷۴۸۰ و ۱۷۵۱۰ و ۱۷۵۴۰ و ۱۷۵۷۰ و ۱۷۶۰۰ و ۱۷۶۳۰ و ۱۷۶۶۰ و ۱۷۶۹۰ و ۱۷۷۲۰ و ۱۷۷۵۰ و ۱۷۷۸۰ و ۱۷۸۱۰ و ۱۷۸۴۰ و ۱۷۸۷۰ و ۱۷۹۰۰ و ۱۷۹۳۰ و ۱۷۹۶۰ و ۱۷۹۹۰ و ۱۸۰۲۰ و ۱۸۰۵۰ و ۱۸۰۸۰ و ۱۸۱۱۰ و ۱۸۱۴۰ و ۱۸۱۷۰ و ۱۸۲۰۰ و ۱۸۲۳۰ و ۱۸۲۶۰ و ۱۸۲۹۰ و ۱۸۳۲۰ و ۱۸۳۵۰ و ۱۸۳۸۰ و ۱۸۴۱۰ و ۱۸۴۴۰ و ۱۸۴۷۰ و ۱۸۵۰۰ و ۱۸۵۳۰ و ۱۸۵۶۰ و ۱۸۵۹۰ و ۱۸۶۲۰ و ۱۸۶۵۰ و ۱۸۶۸۰ و ۱۸۷۱۰ و ۱۸۷۴۰ و ۱۸۷۷۰ و ۱۸۸۰۰ و ۱۸۸۳۰ و ۱۸۸۶۰ و ۱۸۸۹۰ و ۱۸۹۲۰ و ۱۸۹۵۰ و ۱۸۹۸۰ و ۱۹۰۱۰ و ۱۹۰۴۰ و ۱۹۰۷۰ و ۱۹۱۰۰ و ۱۹۱۳۰ و ۱۹۱۶۰ و ۱۹۱۹۰ و ۱۹۲۲۰ و ۱۹۲۵۰ و ۱۹۲۸۰ و ۱۹۳۱۰ و ۱۹۳۴۰ و ۱۹۳۷۰ و ۱۹۴۰۰ و ۱۹۴۳۰ و ۱۹۴۶۰ و ۱۹۴۹۰ و ۱۹۵۲۰ و ۱۹۵۵۰ و ۱۹۵۸۰ و ۱۹۶۱۰ و ۱۹۶۴۰ و ۱۹۶۷۰ و ۱۹۷۰۰ و ۱۹۷۳۰ و ۱۹۷۶۰ و ۱۹۷۹۰ و ۱۹۸۲۰ و ۱۹۸۵۰ و ۱۹۸۸۰ و ۱۹۹۱۰ و ۱۹۹۴۰ و ۱۹۹۷۰ و ۱۹۹۹۰ و ۲۰۰۲۰ و ۲۰۰۵۰ و ۲۰۰۸۰ و ۲۰۱۱۰ و ۲۰۱۴۰ و ۲۰۱۷۰ و ۲۰۲۰۰ و ۲۰۲۳۰ و ۲۰۲۶۰ و ۲۰۲۹۰ و ۲۰۳۲۰ و ۲۰۳۵۰ و ۲۰۳۸۰ و ۲۰۴۱۰ و ۲۰۴۴۰ و ۲۰۴۷۰ و ۲۰۵۰۰ و ۲۰۵۳۰ و ۲۰۵۶۰ و ۲۰۵۹۰ و ۲۰۶۲۰ و ۲۰۶۵۰ و ۲۰۶۸۰ و ۲۰۷۱۰ و ۲۰۷۴۰ و ۲۰۷۷۰ و ۲۰۸۰۰ و ۲۰۸۳۰ و ۲۰۸۶۰ و ۲۰۸۹۰ و ۲۰۹۲۰ و ۲۰۹۵۰ و ۲۰۹۸۰ و ۲۱۰۱۰ و ۲۱۰۴۰ و ۲۱۰۷۰ و ۲۱۱۰۰ و ۲۱۱۳۰ و ۲۱۱۶۰ و ۲۱۱۹۰ و ۲۱۲۲۰ و ۲۱۲۵۰ و ۲۱۲۸۰ و ۲۱۳۱۰ و ۲۱۳۴۰ و ۲۱۳۷۰ و ۲۱۴۰۰ و ۲۱۴۳۰ و ۲۱۴۶۰ و ۲۱۴۹۰ و ۲۱۵۲۰ و ۲۱۵۵۰ و ۲۱۵۸۰ و ۲۱۶۱۰ و ۲۱۶۴۰ و ۲۱۶۷۰ و ۲۱۷۰۰ و ۲۱۷۳۰ و ۲۱۷۶۰ و ۲۱۷۹۰ و ۲۱۸۲۰ و ۲۱۸۵۰ و ۲۱۸۸۰ و ۲۱۹۱۰ و ۲۱۹۴۰ و ۲۱۹۷۰ و ۲۲۰۰۰ و ۲۲۰۳۰ و ۲۲۰۶۰ و ۲۲۰۹۰ و ۲۲۱۲۰ و ۲۲۱۵۰ و ۲۲۱۸۰ و ۲۲۲۱۰ و ۲۲۲۴۰ و ۲۲۲۷۰ و ۲۲۳۰۰ و ۲۲۳۳۰ و ۲۲۳۶۰ و ۲۲۳۹۰ و ۲۲۴۲۰ و ۲۲۴۵۰ و ۲۲۴۸۰ و ۲۲۵۱۰ و ۲۲۵۴۰ و ۲۲۵۷۰ و ۲۲۶۰۰ و ۲۲۶۳۰ و ۲۲۶۶۰ و ۲۲۶۹۰ و ۲۲۷۲۰ و ۲۲۷۵۰ و ۲۲۷۸۰ و ۲۲۸۱۰ و ۲۲۸۴۰ و ۲۲۸۷۰ و ۲۲۹۰۰ و ۲۲۹۳۰ و ۲۲۹۶۰ و ۲۲۹۹۰ و ۲۳۰۲۰ و ۲۳۰۵۰ و ۲۳۰۸۰ و ۲۳۱۱۰ و ۲۳۱۴۰ و ۲۳۱۷۰ و ۲۳۲۰۰ و ۲۳۲۳۰ و ۲۳۲۶۰ و ۲۳۲۹۰ و ۲۳۳۲۰ و ۲۳۳۵۰ و ۲۳۳۸۰ و ۲۳۴۱۰ و ۲۳۴۴۰ و ۲۳۴۷۰ و ۲۳۵۰۰ و ۲۳۵۳۰ و ۲۳۵۶۰ و ۲۳۵۹۰ و ۲۳۶۲۰ و ۲۳۶۵۰ و ۲۳۶۸۰ و ۲۳۷۱۰ و ۲۳۷۴۰ و ۲۳۷۷۰ و ۲۳۸۰۰ و ۲۳۸۳۰ و ۲۳۸۶۰ و ۲۳۸۹۰ و ۲۳۹۲۰ و ۲۳۹۵۰ و ۲۳۹۸۰ و ۲۴۰۱۰ و ۲۴۰۴۰ و ۲۴۰۷۰ و ۲۴۱۰۰ و ۲۴۱۳۰ و ۲۴۱۶۰ و ۲۴۱۹۰ و ۲۴۲۲۰ و ۲۴۲۵۰ و ۲۴۲۸۰ و ۲۴۳۱۰ و ۲۴۳۴۰ و ۲۴۳۷۰ و ۲۴۴۰۰ و ۲۴۴۳۰ و ۲۴۴۶۰ و ۲۴۴۹۰ و ۲۴۵۲۰ و ۲۴۵۵۰ و ۲۴۵۸۰ و ۲۴۶۱۰ و ۲۴۶۴۰ و ۲۴۶۷۰ و ۲۴۷۰۰ و ۲۴۷۳۰ و ۲۴۷۶۰ و ۲۴۷۹۰ و ۲۴۸۲۰ و ۲۴۸۵۰ و ۲۴۸۸۰ و ۲۴۹۱۰ و ۲۴۹۴۰ و ۲۴۹۷۰ و ۲۵۰۰۰ و ۲۵۰۳۰ و ۲۵۰۶۰ و ۲۵۰۹۰ و ۲۵۱۲۰ و ۲۵۱۵۰ و ۲۵۱۸۰ و ۲۵۲۱۰ و ۲۵۲۴۰ و ۲۵۲۷۰ و ۲۵۳۰۰ و ۲۵۳۳۰ و ۲۵۳۶۰ و ۲۵۳۹۰ و ۲۵۴۲۰ و ۲۵۴۵۰ و ۲۵۴۸۰ و ۲۵۵۱۰ و ۲۵۵۴۰ و ۲۵۵۷۰ و ۲۵۶۰۰ و ۲۵۶۳۰ و ۲۵۶۶۰ و ۲۵۶۹۰ و ۲۵۷۲۰ و ۲۵۷۵۰ و ۲۵۷۸۰ و ۲۵۸۱۰ و ۲۵۸۴۰ و ۲۵۸۷۰ و ۲۵۹۰۰ و ۲۵۹۳۰ و ۲۵۹۶۰ و ۲۵۹۹۰ و ۲۶۰۲۰ و ۲۶۰۵۰ و ۲۶۰۸۰ و ۲۶۱۱۰ و ۲۶۱۴۰ و ۲۶۱۷۰ و ۲۶۲۰۰ و ۲۶۲۳۰ و ۲۶۲۶۰ و ۲۶۲۹۰ و ۲۶۳۲۰ و ۲۶۳۵۰ و ۲۶۳۸۰ و ۲۶۴۱۰ و ۲۶۴۴۰ و ۲۶۴۷۰ و ۲۶۵۰۰ و ۲۶۵۳۰ و ۲۶۵۶۰ و ۲۶۵۹۰ و ۲۶۶۲۰ و ۲۶۶۵۰ و ۲۶۶۸۰ و ۲۶۷۱۰ و ۲۶۷۴۰ و ۲۶۷۷۰ و ۲۶۸۰۰ و ۲۶۸۳۰ و ۲۶۸۶۰ و ۲۶۸۹۰ و ۲۶۹۲۰ و ۲۶۹۵۰ و ۲۶۹۸۰ و ۲۷۰۰۰ و ۲۷۰۳۰ و ۲۷۰۶۰ و ۲۷۰۹۰ و ۲۷۱۲۰ و ۲۷۱۵۰ و ۲۷۱۸۰ و ۲۷۲۱۰ و ۲۷۲۴۰ و ۲۷۲۷۰ و ۲۷۳۰۰ و ۲۷۳۳۰ و ۲۷۳۶۰ و ۲۷۳۹۰ و ۲۷۴۲۰ و ۲۷۴۵۰ و ۲۷۴۸۰ و ۲۷۵۱۰ و ۲۷۵۴۰ و ۲۷۵۷۰ و ۲۷۶۰۰ و ۲۷۶۳۰ و ۲۷۶۶۰ و ۲۷۶۹۰ و ۲۷۷۲۰ و ۲۷۷۵۰ و ۲۷۷۸۰ و ۲۷۸۱۰ و ۲۷۸۴۰ و ۲۷۸۷۰ و ۲۷۹۰۰ و ۲۷۹۳۰ و ۲۷۹۶۰ و ۲۷۹۹۰ و ۲۸۰۲۰ و ۲۸۰۵۰ و ۲۸۰۸۰ و ۲۸۱۱۰ و ۲۸۱۴۰ و ۲۸۱۷۰ و ۲۸۲۰۰ و ۲۸۲۳۰ و ۲۸۲۶۰ و ۲۸۲۹۰ و ۲۸۳۲۰ و ۲۸۳۵۰ و ۲۸۳۸۰ و ۲۸۴۱۰ و ۲۸۴۴۰ و ۲۸۴۷۰ و ۲۸۵۰۰ و ۲۸۵۳۰ و ۲۸۵۶۰ و ۲۸۵۹۰ و ۲۸۶۲۰ و ۲۸۶۵۰ و ۲۸۶۸۰ و ۲۸۷۱۰ و ۲۸۷۴۰ و ۲۸۷۷۰ و ۲۸۸۰۰ و ۲۸۸۳۰ و ۲۸۸۶۰ و ۲۸۸۹۰ و ۲۸۹۲۰ و ۲۸۹۵۰ و ۲۸۹۸۰ و ۲۹۰۱۰ و ۲۹۰۴۰ و ۲۹۰۷۰ و ۲۹۱۰۰ و ۲۹۱۳۰ و ۲۹۱۶۰ و ۲۹۱۹۰ و ۲۹۲۲۰ و ۲۹۲۵۰ و ۲۹۲۸۰ و ۲۹۳۱۰ و ۲۹۳۴۰ و ۲۹۳۷۰ و ۲۹۴۰۰ و ۲۹۴۳

مقدمه

از سال ۱۹۹۲، یک سندرم ویروسی که معمولاً آنرا بنام بیماری لکه سفید یا White Spot Disease (WSD) یا سندرم لکه سفید (WSS) می‌نامند، به دلیل تلفات واردہ به مزارع پرورشی، کلیه مسائل مربوط به میگو را تحت الشاع خود قرار داده و باعث خسارت سنگینی در مزارع گردید (Dr. Takahashi et al., 1994 ; Wang et al., 1995 ; Flegel et al., 1996).

این بیماری با ایجاد لکه‌های سفید در روی کاراپاس میگوهای پرورشی و مرگ و میر شدید که معمولاً طی ۲ تا ۷ روز به ۱۰۰ درصد می‌رسد مشخص می‌گردد (Chou et al., 1995). علاوه بر ظاهری این بیماری به راحتی در میگوهای جوان و بالغ قابل رویت می‌باشد. میگوهای آلوده خیلی سریع بی‌حال و کم اشتتها شده و علاوه بر این را نشان می‌دهند. این بیماری در کلیه کشورهای آسیا از جمله چین، تایلند، مالزی، سنتگاپور، ویتنام، تایوان، هند و کشورهای آمریکای لاتین مثل اکوادور، گواتمالا، نیکاراگوا، مکزیک و آمریکا گزارش گردیده است (Wang et al., 2000). این بیماری در ایران در سال ۱۳۸۱ در منطقه چوئیبده آبادان بیش از ۵۰ میلیون دلار خسارت به پرورش دهنده‌گان وارد نمود (تخم افشن و تمجیدی، ۱۳۸۲).

از سال ۱۹۹۵ استفاده از روش PCR در شناخت بیماریهای میگو بدليل حساسیت و دققی که در شناسایی عامل بیماری دارد بسیار منتداول شد (Takahashi, 1996) و همکاران (Lightner, 1996) با استفاده از این روش بیماری RV-PJ که یکی از سویه‌های ویروس لکه سفید بوده و در ژاپن باعث تلفات میگوی *P. japonicus* می‌شود را شناسایی نمودند. بیماری WSSV نیز که سویه دیگری از بیماری لکه سفید بوده و در تایوان ایجاد بیماری می‌کند با این روش مورد شناسایی قرار گرفت (Lee, 1997). امروزه با استفاده از روش PCR غالب بیماریهای ویروسی میگو مثل *Penaeus monodon*, *baculovirus* (MBV), *Taura syndrom virus* (TV), *Hepatpancreatic parolike virus* (HPV), *Infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus* (IHHNV), *WSSV* و سایر بیماریها مثل BP قابل شناسایی می‌باشد.

ویروس ایجاد کننده بیماری لکه سفید را ابتدا براساس مرفولوژی در خانواده Baculoviridae قرار داده (Kou et al., 1998) ولی براساس مطالعات انجام گرفته توسط Van Hulten و همکاران در سال ۲۰۰۰ و تعیین ردیف بازه‌ای ویروس ایجاد کننده بیماری آن را در خانواده جدیدی بنام Whispoviridae نامگذاری نمودند. در سال ۱۹۹۸ توسط Kou و همکاران یک نشانگر اختصاصی برای شناسایی این ویروس طراحی و با روش dot blot hybridization مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اینکه درمانی برای کنترل این بیماری شناسایی نشده است استفاده از روش‌هایی که با سرعت و دقت بتواند ویروس بیماری را شناسایی کند بسیار ضروری می‌باشد. در این مقاله نتیجه بررسی‌های شناخت بیماری با روش PCR که هم از دقت بالایی برخوردار بوده و هم با سرعت می‌تواند عامل بیماری را

شناسایی کرد برای اولین بار در ایران در میگویی سفید هندی مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی امکان استفاده از روش PCR برای اثبات بیماری لکه سفید در میگوهای پرورشی منطقه چوئیبه آبادان و تایید مرگ و میر ناشی از آن بوده است.

مواد و روش کار

در تیر ماه سال ۱۳۸۱ گزارشی مبنی بر تلفات میگوهای منطقه چوئیبه آبادان واصل گردید. در زمان بازدید ۳۷ مزرعه از مجموع ۵۰ مزرعه موجود در منطقه کار ذخیره‌سازی لارو را انجام داده و بالغ بر ۶۵,۰۰۰,۰۰۰ پست لارو در استخرها ذخیره گردیده بود. میگوها در زمانهای مختلف ذخیره‌سازی گردیده بودند که میانگین عمر آنها ۲۵ تا ۳۵ روز بود و میزان تلفات در استخرهای مختلف متفاوت گزارش گردیده است. تعداد ۹۰ نمونه میگو از استخرهای مورد نظر صید و در الکل اتیلیک مطلق ثبتیت و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. به منظور بررسی وضعیت بیماری در استانهای بوشهر، هرمزگان و منطقه گمیشان نیز ۱۲۰ نمونه میگو مشابه استان خوزستان صید و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه در شرایط استریل، نمونههایی از قسمتهای آبشش، چشم و پانکراس میگو برداشته شده و در داخل هاون کوچک چینی بخوبی هموژنیزه گردید. سپس مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه هموژنیزه شده درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌گرم ریخته شد. قابل ذکر است در مواقعی که میگوها در مرحله پست لاروی قرار داشتند تعداد ۲۰ تا ۳۰ پست لارو با هم مخلوط و از مخلوط حاصل نمونه تهیه گردید.

پس از قراردادن نمونه در میکروتیوب، مقدار ۱م م محلول استخراج DNA ۱۰ میلی Tris-HCl، ۱۰ میلی NaCl، pH = ۸ ۱۵ میلی مolar و EDTA ۲ میلی مolar همراه با ۱ درصد SDS اضافه و مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه Shaker تکان داده و سپس بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ، توسط میکروپیپت لایه رویی جداسازی و بداخل یک میکروتیوب دیگر منتقل گردید. (رسوب باقیمانده دور ریخته شد).

مقدار ۱م ۵۰۰ اتانول ۱۰۰ درصد به محلول اضافه و بخوبی با هم مخلوط شده و دوباره بمدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله لایه الکل رویی را دور ریخته شد و مقدار ۱م ۱۰۰۰ اتانول ۷۰ درصد به رسوب ته لوله اضافه و پس از چند بار تکان دادن، بمدت ۲ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ لایه رویی الکل دور ریخته و به رسوب با دور ۱۰۰۰ در آب مقطمر استریل اضافه و لوله بمدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه باقیمانده، مقدار ۱م ۱۰۰ آب حل گردد (Lightner, 1996). جهت کنترل کیفیت DNA سانتی‌گراد قرار داده شد تا DNA در آب حل گردد. جهت Lightner کنترل کیفیت DNA مقدار ۱م ۱۰ از DNA با استفاده از ژل آگارز ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بر ماید الکتروفورز و با ترانسیس لومیناتور uv باند مورد نظر مشاهده گردید. جهت انجام PCR مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفته است.

برای انجام PCR از کیت مخصوص بیماری لکه سفید بنام (Single-Tube Nested DNA Amplification kit for Detection white spot syndrome virus) از کمپانی Genensis Biotechnology Sdn.Bhd استفاده شده است.

محصول واکنش در یک میکروتیوب ۰/۲ میلی گرم بشرح ذیل آماده سازی گردید. قابل ذکر است که تمامی مقادیر مورد استفاده براساس دستورالعمل کیت مورد استفاده بوده است

PCR Reaction Mix	23.2 μ L
PCR Nucleotide Mix (dNTP)	0.5 μ L
Taq DNA Polymerase	0.3 μ L
Target DNA	1-2 μ L

همزمان با نمونه های مورد بررسی از دو نمونه بعنوان شاهد مثبت و منفی استفاده گردید.
(نمونه های شاهد مثبت همراه کیت می باشد)

برنامه PCR

Pre-denaturation	٩٤ درجه سانتی گراد در سه دقیقه
٥ cycle	٩٤ درجه سانتی گراد در سی ثانیه
١٥ cycle	٦٠ درجه سانتی گراد در سی ثانیه
٦ cycle	٧٢ درجه سانتی گراد در سی ثانیه
٢٥ cycle	٩٤ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه
final extension	٩٤ درجه سانتی گراد در بیست و پنج ثانیه

پس از انجام PCR نمونه ها همراه با DNA marker 100 bp ۱۰۰ بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفوروز شده و باندهای ایجاد شده با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم برماید و ترانس لومیناتور UV مشاهده گردیدند.

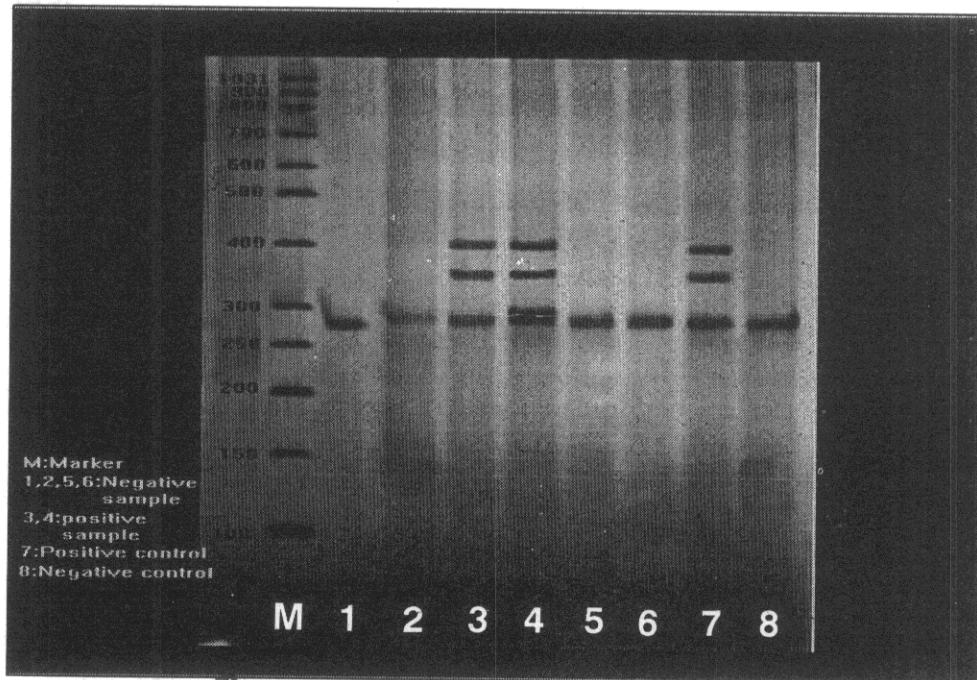
نتایج

نتایج بدست آمده از PCR نمونه‌های استانهای مختلف در جدول ۱ ارائه گردیده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود نمونه‌های استان خوزستان (منطقه چوئیبده آبادان) بعد از الکتروفورز دارای باندهای مختلف می‌باشند. در کلیه نمونه‌ها یک باند حدود ۲۳۲ bp ۲۳۲ مشاهده می‌شود که متعلق به میگو بوده و میگوهای استان خوزستان نیز باند مزبور را نشان می‌دهند (شکل ۱). نمونه‌های استان خوزستان علاوه بر باند فوق باندهایی در حدود ۳۵۶ bp و ۴۰۳ bp نیز ایجاد می‌کنند که در کنار Marker استفاده شده کاملاً قابل تشخیص بوده، در حالیکه این باندها در شرایط PCR مشابه در نمونه‌های سایر مناطق مشاهده نشدند. نتایج بدست آمده از PCR نمونه‌های آبادان نشان می‌دهد که DNA ویروس WSSD در نمونه‌های منطقه چوئیبده آبادان وجود داشته و در سیستم PCR بکار گرفته شده، از دیاد یافته است. براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، معلوم می‌شود که با مشاهده باندهای ایجاد شده در ژل الکتروفورز در صورتیکه یک باند حدود ۲۳۲ جفت باز ایجاد شود نمونه‌ها از نظر hite spot منفی هستند. در صورتیکه یک باند ۲۳۰ جفت باز و باند حدود ۳۵۶ جفت باز ایجاد شود نمونه‌ها از نظر White spot مثبت می‌باشند و در صورتیکه نمونه‌ها علاوه بر باندهای ۲۳۰ و ۳۵۶ جفت باز دارای باند ۴۰۳ جفت باز نیز باشند نمونه‌ها دارای ویروس White spot از نوع کشنده و قوی می‌باشند (شکل ۱).

از تعداد ۲۰۰ نمونه میگویی که از استانهای جنوبی (بوشهر، خوزستان و هرمزگان) و گمیشان از استان گلستان به آزمایشگاه منتقل شده و مورد آزمایش PCR قرار گرفتند. خوشبختانه نمونه‌های تمام استانها از نظر این بیماری دارای نتیجه منفی بودند و تنها نمونه‌های جمع‌آوری شده از چوئیبده آبادان دارای نتیجه مثبت بوده و ۱۰۰ درصد آلودگی را نشان دادند.

جدول ۱: وضعیت نمونه‌های آزمایش شده با PCR در مناطق مختلف

نام منطقه	نوع نمونه	تعداد نمونه	نتایج	وضعیت PCR	WSSD
خوزستان	میگوی سفید‌هندی	۹۰ عدد	۲۳۲ bp و ۳۵۶ bp	مثبت	۴۰۳
بوشهر	میگوی سفید‌هندی	۴۰ عدد	۲۳۲ bp	منفی	۲۳۲
هرمزگان	میگوی سفید‌هندی	۴۰ عدد	۲۳۲ bp	منفی	۲۳۲
گمیشان	میگوی سفید‌هندی	۴۰ عدد	۲۳۲ bp	منفی	۲۳۲



شکل ۱: مشاهده محصول PCR نمونه‌های استانهای بوشهر (۱و۲)، هرمزگان (۵) و جوئیله آبادان (۳و۴) و گمیشان (۶). M مارکر یا نشانه می‌باشد. همانگونه که مشاهده می‌شود نمونه‌های چوئیله تشکیل باند قوی داده و نشان می‌دهد که از نظر white spot مثبت می‌باشد. نمونه‌های شماره (۷) و (۸) به منظور کنترل در کیت موجود می‌باشد.

بحث

براساس گزارش سازمان خواربار جهانی (FAO) در سال ۲۰۰۱ تولید میگویی پرورشی در دنیا معادل ۱,۶۰۰,۰۰۰ تن گزارش شده است که از این میزان حدود ۳۰۰,۰۰۰ تن بر اثر بیماری لکه سفید از بین رفته و خسارتی سنگینی را به پرورش دهنگان میگو وارد نموده است (Rosenberry, 2001).

بیماری لکه سفید برای نخستین بار از کشور چین در سال ۱۹۹۲ گزارش گردید. این بیماری که آن را بیماری China disease گویند علائمی از قبیل ایجاد پلاکهای سفید در روی کلایپس و بدن میگو، بزرگ شدن هپاتوپانکراس، قرمز شدن بدن میگو، خالی بودن معده و کم اشتهاهی را به دنبال دارد. همچنین داشتن گنجیدگیهای درون سلولی ویژه‌ای بنام Cowdery type-A از علائم دیگر بیماری است که در مشاهده با میکروسکوپ نوری قابل رویت بوده و با تخریب سلول در مراحل انتهایی

بیماری ویروس ایجاد کننده بیماری با میکروسکوپ الکترونی بخوبی قابل رویت است (Wang et al., 1995; Chou et al., 2000).

روشهای مختلفی برای تشخیص بیماری لکه سفید مورد استفاده قرار گرفته است. روش شناسایی این بیماری با استفاده از علائم ظاهری اگر چه روشی سریع می‌باشد ولی تشخیص از روی علائم ظاهری بدلیل مشابهت این بیماری به بیماریهای دیگر می‌گویی از جمله بیماری Vibriosis و IHHNV و همچنین افزایش pH آب تشخیص بیماری مشکل است. زیرا کلیه بیماریهای اشاره شده دارای علائم ظاهری شبیه به هم می‌باشند و ایجاد پلاک سفید رنگ در روی بدن می‌گویند. تشخیص این بیماری با استفاده از روش آسیب‌شناسی بافتی که توسط Bell و Lightner در سال ۱۹۸۸ و Lightner در سال ۱۹۶۶ ایجاد گردیده است گرچه دقیق می‌باشد ولی با توجه به اینکه در این روش نیز بسیاری از علائم ایجاد شده با بعضی از بیماریهای دیگر می‌گویند مثل بیماری IHHNV شبیه است، تشخیص قطعی مشکل می‌باشد. همچنین این روش با توجه به اینکه وقت زیادی نیاز دارد معمولاً نمی‌تواند بعنوان یک روش سریع در مزارع می‌گیرد. مهمترین علائم ایجاد شده بیماری لکه سفید در روش آسیب‌شناسی بافتی ایجاد گنجیدگیهای Cowdry type-A می‌باشد (Wang et al., 1999; Bonamei & Thakahashi et al., 1994) که شبیه علائم ایجاد شده در بیماری IHHNV است (Lightner, 1991).

روش تشخیص با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روشی بسیار دقیق بوده که با استفاده از این روش می‌توان عامل ایجاد کننده بیماری را شناسایی کرده و به تشخیص قطعی دست یافت (Hayat, Lightner, 1966 ; 1986). این روش برغم دقت و اهمیتی که در تشخیص بیماریهای ویروسی از جمله بیماری لکه سفید دارد ولی هزینه زیادی نیاز دارد و تجهیزات پیچیده‌ای در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین وقت زیادی برای تشخیص با این روش مورد نیاز است. بنابراین تنها به منظور تشخیص عامل بیماری و بررسی بیماریزایی در آزمایشگاه کاربرد دارد و نمی‌تواند در مزارع پرورشی می‌گوید مورد استفاده قرار گیرد.

امروزه استفاده از روشهای مولکولی برای تشخیص بیماری می‌گویی بطور وسیع کاربرد دارد. این روشها علاوه بر اینکه می‌تواند عامل بیماری را در بافت‌های می‌گو مورد شناسایی قرار دهد، در تشخیص این عوامل در مواد غذایی مصرفی و همچنین در محیط پرورش نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. از خصوصیات ویژه روشهای مولکولی سرعت و دقت است که به منظور پیشگیری از بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد. علائم کلینیکی و آسیب‌شناسی بافتی این بیماری و همچنین شناسایی این بیماری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی توسط تخم‌افشان و تمجدی (۱۳۸۲) مورد بررسی قرار گرفته و گزارش گردیده است.

در میان روشهای مولکولی، روش PCR با توجه به سرعت و دقتی که دارد از سایر روشهای مولکولی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در این روش کمتر از ۱۰ مولکول DNA از عامل بیماری برای

تشخیص کافی است در صورتیکه در دیگر روشاهای مولکولی به بیشتر از ۱۰۰ مولکول نیاز است (Kou et al., 1998) با توجه به شدت مرگ و میر ناشی از بیماری لکه سفید و با توجه به اینکه این بیماری غالباً در میگوها بصورت نهفته می‌باشد این موضوع جائز اهمیت بوده و با استفاده از این روش می‌توان عامل بیماری را در پایین ترین سطح نیز شناسایی نموده و از بروز بیماری جلوگیری کرد.

در سال ۱۹۹۶ Takahashi و همکاران با استفاده از روش PCR توانستند ویروس ایجادکننده بیماری را شناسایی نمایند و اعلام داشتند که ویروس RP-JV نام دیگر ویروس لکه سفید در کشور ژاپن است و همچنین ویروس SEMBV که ایجادکننده بیماری در کشور تایلند می‌باشد ایجاد باندی به اندازه ۶۴۳ bp می‌نمایند.

Lightner در سال ۱۹۹۶ با توجه به تعدد سویه‌های ایجادکننده بیماری لکه سفید در کشورهای مختلف توانست پرایمر اختصاصی برای سویه‌های این بیماری از کشور ژاپن، تایلند، هند و تایوان طراحی نموده و توصیه نمود با توجه به ایجاد خسارت سنگین ناشی از این بیماری و همچنین با توجه به اینکه در بعضی مواقع ممکن است ایجاد نتیجه منفی کاذب نمایند بهتر است از پرایمر اختصاصی برای گونه‌های مختلف استفاده شود.

Kou و همکاران در سال ۱۹۹۸ با توجه به اهمیت بیماری و ایجاد نتیجه منفی کاذب پیشنهاد نمودند بهتر است برای شناسایی بیماری لکه سفید بدای استفاده از PCR یک مرحله‌ایی از روش PCR دو مرحله‌ایی یا PCR - Nested استفاده گردد. زیرا Nested-PCR حدود ۱۰۰۰ مرتبه حساسیت بیشتری از PCR یک مرحله‌ایی داشته و تعداد کمی ایجاد شده از DNA ۱۰ تا ۵۰ مرتبه بیشتر می‌باشد و به همین دلیل امکان ایجاد نمونه‌های منفی کاذب به حداقل می‌رسد. Lee در سال ۱۹۹۷ با توجه به اهمیت Nested - PCR توانستند کیت مخصوص بیماری لکه سفید را با این روش تولید نموده که هم اکنون به صورت تجاری عرضه می‌گردد. همچنین Alday در سال ۱۹۹۹ بمنظور اینکه نمونه‌های جمع‌آوری شده برای انجام آزمایش PCR یکنواخت بوده و بیانگر کل جمعیت میگوهای یک استخر باشد جدول آماری خاصی را پیشنهاد نموده‌اند که مطابق این جدول و به منظور تعیین دقیت نمونه‌برداری تعداد نمونه‌ها در استخرهای مختلف بر حسب درصد نمونه‌برداری متفاوت می‌باشد. توصیه می‌گردد در ایران نیز بمنظور کاهش نتایج کاذب از این جدول استفاده گردد.

Van Hulten و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند ردیف بازه‌های ویروس ایجادکننده بیماری لکه سفید در میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) از کشور تایلند را شناسایی نموده و اعلام داشتند که ویروس ایجادکننده بیماری بصورت دو رشته‌ای بوده و دارای ۲۹۲,۹۶۷ نوکلئوتید می‌باشد و براسان مطالعات فیلوزنی اعلام داشتند ویروس ایجادکننده بیماری که قبله جزء خانواده Baculoviridea بوده در خانواده جدیدی بنام *Wisipoviridea* قرار گیرد و همچنین پیشنهاد نمودند که این اقدام برای کلیه سویه‌های این ویروس از مناطق مختلف انجام گرفته تا وضعیت ویروس مشخص شود.

- در مقایسه با مطالعات انجام گرفته و مطالعه کنونی این ویروس با روش PCR ایجاد باندهای ۳۵۶ bp و ۴۰۳ bp نموده و با توجه به گزارش Lee در سال ۱۹۹۷ این ویروس ایجاد باندهای شبیه ویروس لکه سفید گزارش شده در مالزی و تایلند نموده و از نظر وجود بیماری لکه سفید در نمونه‌های آزمایش شده از منطقه آبادان مثبت می‌باشد. با توجه به اهمیت این بیماری در میگوهای پرورشی و با توجه به گستردگی این صنعت در کشور و سرمایه‌گذاری‌های انجام گرفته و امکان ورود این بیماری از طریق واردات داروها و سایر موادی که در صنعت تکثیر و پرورش استفاده می‌گردد موارد زیر پیشنهاد می‌شود:
- هر چه سریعتر استفاده از روش PCR در کشور آموزش داده شده و امکانات لازم بمنظور استفاده از آن فراهم شود.
 - کلیه تکثیر کنندگان و پرورش دهنده‌گان میگو ملزم شوند مولдин و لاروهای خود را قبل از وارد کردن به هچری و مزارع پرورشی به بیماری لکه سفید آزمایش نموده و سپس اقدام به معروفی در هچری و مزارع نمایند.
 - هر چه سریعتر کیت مخصوص این بیماری در کشور طراحی و ساخته شود تا هم از نظر صرفه‌جوئی اقتصادی و هم از نظر استفاده از سویه ایجاد کننده بیماری در کشور اطمینان حاصل شود.
 - نسبت به انجام پروژه‌های مرتبط با این بیماری مثل روش‌های کنترل و شناسایی دقیق و ویروس بیماری با روش‌های مولکولی و تعیین فیلوژنی ویروس اقدام گردد.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم مرکز تحقیقات شیلاتی استان خوزستان دکتر مرمنصی و ریاست محترم پژوهشکده اکولوژی دریایی مازندران دکتر رستمی، همچنین دکتر تمجیدی، آفای کر، و دکتر دشتیان نسب که نهایت همکاری را در جمع‌آوری نمونه‌ها و انجام آزمایشات بعمل آورده‌اند تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

- تخم‌افشان، م. ، تمجیدی، ب. ، ۱۳۸۲. علائم ظاهری و آسیب‌شناسی بافتی بیماری لکه سفید در میگویی پرورشی سفید هندی (*Penaeus indicus*) در استان خوزستان. مجله علمی شیلات ایران. سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۲، صفحات ۱۱۵ تا ۲۸.
- Alday. V. , 1999. Current shrimp pathology issues. ADVOCATE , Volume 2, Issue 4/5.
- Bell, T.A. and Lightner, D.V. , 1988. A handbook of normal Penaeid shrimp histology. Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.

- Bonami, J.R. and Lightner D.V. , 1991.** Unclassified viruses of crustacean. In: J.R. Adams and J.R.Bonami (eds.). *Atlas of Invertebrate Viruses*. Boca Raton: CRC Press inc., pp.597-622.
- Chou, H.Y. ; Huang, C.Y. ; Wang, C.H. ; Chang, H.C. and Lo, C.F. , 1995.** Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured Penaeid shrimp in Taiwan. *Dis.Aquat.Org.* Vol. 23, pp.165-173.
- Flegel, T.W. ; Boonyaratplain, S. and Withyachumnakul, B. , 1996.** Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: LeRoy Creaawell R (ed) Book of abstracts. *World Aquaculture 96* held in Bangkok, Thailand, and Jen26-Feb 2, 1996. World Aquaculture Society. Harbor Branch Oceanographic Institute, Ft Pierce, FL, pp.126-127.
- Hayat, M.A. , 1986.** *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy*. California: Academic , Inc.
- Kou, G.H. ; Peng, S.E. ; Chin, Y.L. and LO, C.F. , 1998.** Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In Flegel TW (ed) *Advance in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
- Lee, K.L. , 1997.** Development of automated nested PCR in the detection of white spot disease associated baculovirus (WSBV) using rapid cycle DNA amplification. Thesis of DVM, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Putra Malaysia, Serdang Selangor, Malaysia.
- Lightner, D.V. , 1996.** A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.
- Rosenberry , B. , 2001.** *World Shrimp Farming 2001*. California: An annual report published by Shrimp News International.
- Takahashi, Y. ; Itami, T. ; Kondo, M. ; Maeda, M. ; Fujii, R. ; Tomonaga, S. ; Supamatty, K. and Boonyaratpalin, S. , 1994.** Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). *Fish Pathol.* Vol. 29, No. 2, pp.121-125.

- Takahashi, Y. ; Itami, T. ; Kondo, M. ; Maeda, M. ; Supamattya, K. ; Boonyaratpalin, S. ; Suzuki, N. ; Kasornchandra, J. ; Khongpradit, R. ; Kawai, K. ; Kusuda, R. ; Hirono, I. and Aoki, T. , 1996.** Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bata and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J. Fish. Dis.* 19:pp.399-403
- Van Hulten, M.C.W. ; Tsai, M.F. ; Schipper, C.A. ; Lo, C.F.C. ; Kou, G.H. and Valk, J.M. , 2000.** Analaysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase and repeat regions. *Journal of Virol.* Vol. 81, pp.307-316.
- Wang, C.H. ; Lo, C.H. ; Leu, J.H. ; Chou, C.M. ; Yeh, P.Y. ; Chou, H.Y. ; Tung, M.C. ; Chang, C.F. ; Su, M.S. and Kou, G.H. , 1995.** Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) OF *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* Vol. 23, pp.239-242.
- Wang, Y.G. ; Tan, O.L. ; Lee, K.L. ; Hassan, M.D. and Shariff, M. , 1999.** Health management of shrimp during growout. *INFOFISH International* 4/99: 30-36.
- Wang, Y.G. ; Lee, K.L. ; Najiah, M. ; Shriff, M. ; and Hassan. M.D. , 2000.** A new baculovirus white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. *Dis. Aquat. Org.* Vol. 41, pp.9-18.

Identification of White Spot Syndrome Disease (WSSD) in *Penaeus indicus* by Polymerase Chain Reaction (PCR) method in Iran

Afsharnasab M.⁽¹⁾; Laloei F.⁽²⁾ and Rezvani S.⁽³⁾

mafsharnasab@yahoo.com

1,3- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box:14155-6116
Tehran, Iran

2- Caspian Sea Ecology Research Academy, P.O.Box: 961 Sari, Iran

Received: July 2003 Accepted: July 2004

Keywords: Shrimp, *Penaeus indicus*, White Spot Syndrome Disease, PCR.

Abstract

A high mortality of cultured shrimp *Penaeus indicus* was spotted in summer 2002 in Khuzestan province, southwestern Iran. White spots with a size of 0.5–2mm was one of the typical external signs of the infected shrimps. Our examination revealed that the cuticle of the shrimps could be easily separated from their epidermis, their hepatopancreas was swollen, their abdomen and intestine were empty and their body colour was reddish. Based on the symptoms, we suspected that White Spot Syndrome Disease (WSSD) might have caused the mortality. To ascertain our suspicion, we collected 90 infected specimens from the Khuzestan province and another 120 uninfected specimens from Bushehr and Hormozgan provinces in the south and Golestan province in the northeast Iran.

After fixing the samples in pure alcohol, we homogenized the samples and extracted their DNA content using phenol-chloroform methods. Using a WSSD kit, we conducted the PCR method which showed the specimens from Khuzestan province (Abadan area) were definitely infected with WSSD while results for samples from other provinces were negative.