(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

مقایسه آسیب‌شناسی میگوهای تغذیه شده با جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* با میگوهای تغذیه شده با غذای تجاری قبل و بعد از مواجه با ویروس لکه سفید در میگوهای سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

- **سیدرضا سیدمرتضایی:** مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- **حسین هوشمند*:** پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **مینا آهنگرزاده:** پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **مهرداد محمدی‌دوست:** پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران
- **محمد افشارنسب:** گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٨

چکیده

در این تحقیق آسیب شناسی میگوهای تغذیه شده با جلبک گ\سیلار\یا کورتیکا\تا *Gracilaria corticata* در مقایسه با میگوهای تغذیه شده با غذای تجاری در مواجهه با ویروس لکه سفید در میگوی وانامی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۱۲۰۰ میگو عاری از عوامل بیماری‌زا با وزن ۱۰±۱/۰۲ گرم جمع‌آوری و به چهار گروه تقسیم گردید. گروه اول (T1) فقط با جلبک گ\سیلار\یا کورتیکا\تا با ۲ گرم بر کیلوگرم غذا تغذیه شدند، گروه دوم با جلبک گ\سیلار\یا کورتیکا\تا با ۲ گرم بر کیلوگرم غذا (T2) به‌مدت ١٤ روز تغذیه و سپس با ویروس لکه سفید مواجه شدند، گروه سوم یا گروه شاهد منفی فقط با غذای تجاری تغذیه شدند (T3) و گروه چهارم یا گروه شاهد مثبت که با غذای تجاری تغذیه و بعد از ١٤ روز با ویروس لکه سفید مواجه شدند (T4). نمونه‌ها در محلول دیویدسون تثبیت گردید و پس از انجام مراحل استاندارد بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی به‌روش هماتوکسیلین – فلوکسین ائوزین در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آسیب‌شناسی نشان داد در نمونه‌های تغذیه شده با جلبک و مواجه شده با ویروس لکه سفید و شاهد مثبت گنجیدگی‌های درون یاخته ای در یاخته‌های هپاتوپانکراس، بافت اپی‌تلیوم روده، معده و آبشش مشاهده گردید. نتایج میزان بقاء نسبی نشان داد در تیمار تغذیه شده با جلبک در مواجه با ویروس نسبت به تیمار شاهد مثبت افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

کلمات کلیدی: جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا*، آسیب‌شناسی، ویروس لکه سفید، میگو پاسفید غربی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: houshmand_h@yahoo.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

مقدمه

تولید و پرورش جهانی میگو تا سال ۲۰۱۲ بالغ بر سه میلیون و ششصد و هشتاد هزار تن بوده است که از این مقدار سه میلیون تن (۸۴٪) در کشورهای آسیایی چین، تایلند، ویتنام، هند و اندونزی تولید شده است که از این میزان تولید بالغ بر ۷۲٪ آن گونه میگو سفید غربی (*Litopenaeus Vannamei*) می‌باشد(Pulvenis، ۲۰۰۸).یکی از چالش‌های اصلی در تولید میگو پرورشی بروز بیماری‌های ویروسی به‌ویژه بیماری لکه‌سفید می‌باشد.براساس گزارشات منتشر شده سالیانه بالغ بر ۳۰٪ میگوهای پرورشی بر اثر بیماری لکه سفید از بین رفته و تولیدکنندگان متحمل خسارات بالایی می‌شوند، به‌طوری‌که با بروز این بیماری در مزارع آبادان در سال ۱۳۸۱ هزینه‌ای بالغ بر ۱۰۰ میلیون تومان برای ضدعفونی استخرها صرف گردیده است (Soltani و همکاران، ۲۰۰۹). برآورد خسارات ناشی از این بیماری‌ها طی سال‌های ۲۰۰۴ الی ۲۰۰۸ میلادی تنها در دو استان خوزستان و بوشهر بالغ بر ۵۰ میلیارد تومان بوده است (Soltani، ۲۰۰۹). از این‌رو امروزه ویروس بیماری لکه سفید یکی از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زا در مزارع میگوهای پرورشی و سایر سخت‌پوستان محسوب می‌شود که معمولاً با مرگ و میر ۱۰۰ درصدی در مدت سه تا ده روز همراه خواهد بود (Flegel، ۲۰۰۶). بدون شک این بیماری مشکل درجه یک تاثیر گذار بر حیات اقتصادی و پایداری دراز مدت صنعت پرورش میگو است. بیماری لکه سفید که به‌وسیله ویروس لکه سفید ایجاد می‌شود شاید مهم‌ترین بیماری آبزیان پرورشی از لحاظ اقتصادی در آب‌های گرم باشد (Soltani، ۲۰۰۹). بیماری لکه سفید به‌عنوان یک عامل محدودکننده‌در توسعه بعضی از کشورها محسوب می‌گردد.این بیماری در تولید میگوهای پرورشی *P. monodon*، *P. japonicus*، *P. chinensis*، *F. indicus*، *F. merguiensis* و *L. setiferus* در جهان تاثیر گذاشته است. لکه سفید یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های میگو و در ردیف بیماری‌های اخطارکردنی به سازمان جهانی بیماری‌های همه‌گیر دامی (OIE) تلقی می‌شود(Flegel، ۲۰۰۶). امروزه تلاش بسیاری از محققین در راستای تقویت میگوهای پرورشی در برابر بیماری، معطوف به تقویت و تحریک دستگاه ایمنی غیراختصاصی میگوهاست و یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر توانایی آبزی برای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا وضعیت تغذیه است. بیماری‌ها به‌طور معمول در مواقعی که آبزی تحت تأثیر عوامل تنش‌زای مختلف نظیر تغذیه‌نامناسب می‌باشد شیوع پیدا می‌کنند. ازاین‌رو برای بهبود وضعیت سلامتی و جلوگیری از شیوع بیماری‌ها در فعالیت‌های آبزی‌پروری،جیره‌های غذایی مناسب موردنیاز می‌باشند. لذا ویژگی‌های تغذیه‌ای و فیزیکی جیره‌های غذایی می‌توانند حساسیت آبزی نسبت به عوامل بیماری‌زا را تعدیل کنند (Faramarzi، ۲۰۱۱). بنابراین در پرورش آبزیان استفاده از جیره‌های غذایی که حاوی سطوح مغذی مناسب و ترکیبات باکیفیت هستند برای تأمین نیازهای تغذیه‌ای آبزی ضروری است، هم‌چنین استفاده از مکمل‌های افزودنی در جیره غذایی می‌تواند منجر به رشد مطلوب آبزی و کاهش حساسیت نسبت به عوامل بیماری‌زا گردد. افزودنی‌های غذایی علاوه بر تقویت دستگاه ایمنی با بهبود افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی، باعث افزایش میزان تولید و در نهایت سوددهی بیش‌تر فعالیت آبزی‌پروری می‌شوند (Faramarzi، ۲۰۱۱). جلبک‌ها منبعی از ترکیبات مفید و فعال زیستی هستند و تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی هم‌چون اثرات پادزی، ضدویروسی، ضدقارچی و ضدسرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی و مشتق شده‌اند که بسیاری از متابولیت‌های اولیه و ثانویه این جانداران می‌توانند به موادفعال موردعلاقه صنایع دارویی تبدیل شوند. استفاده از جلبک‌ها به‌عنوان ماده افزودنی در جیره غذایی آبزیان باعث بهبود شاخص‌های رشد، کیفیت بیوشیمیایی لاشه و پاسخ‌های فیزیولوژیک نسبت به تنش و بیماری می‌شود (De Silva، ۱۹۹۴؛ Immanuel، ۲۰۱۲؛ Jaime-Ceballos، ۲۰۰۵). اثرات مثبت تغذیه از جلبک‌ها به‌دلیل وجود فیبر، کاروتنوئیدها، جذب‌کننده‌های شیمیایی غذا، ویتامین‌ها، مواد معدنی، اثرات ترکیبی با ویتامین‌ها، جلوگیری از فرایند تجزیه‌شدن ویتامین‌ها و خاصیت پادآکندگی می‌باشد(Immanuel، ۲۰۱۲؛El-Banna، ۲۰۰۹). در این تحقیق از گونه جلبک قرمز *گراسیلاریا* با نام علمی *Gracilaria corticata* و از خانواده (Gracilariaceae) با اهداف، مقایسه میزان بازماندگی میگوهای پاسفید تغذیه‌شده با جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* و گروه شاهد، تعیین میزان ضایعات آسیب‌شناسی در بافت‌های هدف میگوهای تیمار آزمایشی تغذیه‌شده با جلبک و مواجهه با ویروس لکه سفید استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۲۰۰ قطعه میگو با وزن متوسط ۱۰گرم با انحراف معیار دو از یک استخر پرورش میگوی چوئبده آبادان، صید و پس از بررسی فاکتورهای کیفی و بهداشتی (از لحاظ سلامتی عدم وجود نکروز روی سطح بدن و بریدگی انتهاو...) به ایستگاه بندر امام خمینی (ره) منتقل گردید. سپس میگوها به‌مدت سه تا پنج روز در شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. بعد از مرحله سازگاری، نسبت به غربالگری میگوها برای عدم وجود ویروس‌های (WSSV, TSV, MBV, HPV, YHV, BP, IHHNV, IMNV) و باکتری‌های ویبریو با استفاده از PCR اقدام شد. سپس میگوها به چهار گروه مساوی تقسیم‌بندی شدند (جدول۱).

عصاره‌گیری از جلبک: جلبک موردنظر در ظروف و کیسه‌های پلاستیکی تمیز جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس با آب جاری شسته شده و بر روی نایلون تمیزی که از قبل در

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

آزمایشگاه پهن شده بود به‌مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند تا به‌طور کامل خشک شوند. در مرحله بعد از روش اسیدی به‌منظور استخراج عصاره جلبک استفاده شد. در ابتدا با استفاده از آسیاب برقی جلبک‌های خشک شده آسیاب شدند. هدف از این کار بالا بردن تأثیر اسید کلریدریک (HCl) بر روی دیواره یاخته های جلبکی بود. از این‌رو بعد از توزین نمودن ۲۰ گرم جلبک خشک شده ۲۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به آن اضافه شد. سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سپری شدن زمان مذکور با استفاده از فیلتر مکشی (suction filter) با چشمه ۵۰۰–۴۵۰ میکرون سوسپانسیون فوق پالایش شد. به‌منظور خنثی‌سازی حالت اسیدی از سود ۰/۵ مولار (NaOH) استفاده شد. در نهایت با استفاده از سانتریفیوژ دور rpm ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سوسپانسیون فوق سانتریفوژ شد که پس از جداسازی فاز رویی دو برابر حجم آن الکل اتانول اضافه شد. پس از اضافه نمودن اتانول مواد معلق موجود در سوسپانسیون در ته ظرف به‌صورت زنجیره‌ای رسوب نمودند (شکل ۱) که در ادامه با جداسازی آن‌ها و قرار دادن در درجه حرارت ۴۰–۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شدند (شکل ۱).

جدول ۱: تیماربندی میگوها مورد آزمایش

نام گروه	نوع تغذیه	تعداد میگو
تیمار ۱ (T1)	میگوهای تغذیه شده با ۲ گرم در یک کیلوگرم غذا از جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* به‌مدت ۱۴ روز	۳۰۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۲ (T2)	میگوهای تغذیه شده با ۲ گرم در یک کیلوگرم غذا از جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* به‌مدت ۱۴ روز و سپس مواجهه با ویروس لکه سفید	۳۰۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۳ (T3)	گروه کنترل منفی تغذیه فقط با غذای تجاری	۳۰۰ قطعه (در سه تکرار)
تیمار ۴ (T4)	کنترل مثبت تغذیه با غذای تجاری کورتیکاتا به‌مدت ۱۴ روز و سپس مواجهه با ویروس لکه سفید	۳۰۰ قطعه (در سه تکرار)

شکل ۱: استخراج عصاره جلبک با استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال. A: سوسپانسیون عصاره جلبک قبل از اضافه کردن الکل اتانول. B: عصاره جلبک بعد از اضافه نمودن الکل اتانول.C: عصاره پودر شده جلبک

تهیه استوک ویروس لکه سفید از بافت میگوهای آلوده: میگوهای منجمد که از خوزستان، سیستان و بلوچستان و بوشهر نمونه‌برداری شده بودند و از نظر وجود ویروس لکه سفید نیز تائید شده بودند جهت تهیه ذخیره ویروس طبق روش Afsharnasab و همکاران (۲۰۰۹) مورد استفاده قرار گرفتند.

روش آسیب‌شناسی بافتی: میگوهای تلف شده با مقدار کافی محلول ثابت‌کننده دیویدسون (به‌طور تقریبی حداقل حدود ۱۰ برابر از حجم محلول ثابت‌کننده برای هر نمونه) در ظروف جداگانه نگه‌داری شد. پس از مدت زمان ۴۸ ساعت، نمونه‌ها به الکل اتیلیک ۵۰٪ منتقل گردید. میگوهای نگه‌داری شده از الکل اتیلیک ۵۰٪ خارج شده و با استفاده از اسکالپل برش‌های لازم بر روی میگوها اعمال شد و قطعات بافتی با ابعاد کم‌تر از ۸ میلی‌متر ضخامت تهیه شد (Lightner، ۲۰۱۲). درپایان مرحله آماده‌سازی بافت‌های مورد نظر از سطح برش در کف قالب قرار گرفته و قالب با پارافین مخصوص قالب‌گیری پر شده، مشخصات هر قالب بر روی آن نوشته شد و تا زمان مقطع‌گیری در یخچال نگه‌داری می‌شد. توسط یک دستگاه میکروتوم دوار (شاندون، آمریکا، مدل ۵۰۰۰) قالب‌ها از سطح برش مورد نظر با ضخامت ۵ میکرون برش داده شد. برش‌ها ابتدا در یک ظرف حاوی الکل ۵۰٪ قرار گرفته، پس از باز شدن، برش به حمام آب منتقل شده سپس بر روی لام قرار گرفت. ابتدا برش‌های پارافینی به‌منظور جداسازی پارافین از برش‌های تهیه شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

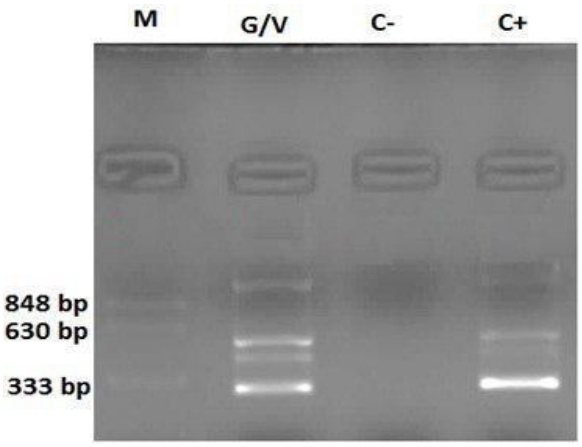
قرار داده شد. پس از آب شدن پارافین، مقاطع آبگیری شده و به‌روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و فلوکسین/ ائوزین رنگ‌آمیزی گردید.پس از طی شدن مراحل رنگ آمیزی رنگ‌های اضافه از روی لام پاک شده و توسط چسب انتلان یک لامل بر روی بافت رنگ شده چسبانده شد (Lightner، ۲۰۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آموزش تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA Two Way) استفاده شد، سپس وجود تفاوت معنی‌دار در داده‌های به‌دست آمده در سطح احتمال ($p\leq ۰/۰۵$) به کمک پس آزمون Dancan بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۹ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

PCR: نتایج حاصل از PCR نشان‌دهنده شکل حادبیماری و وجود ویروس در نمونه‌های میگوهای تغذیه‌شده با جلبک و شاهد را در شکل ۲ می‌توان مشاهده نمود که بیانگر وجودویروس در این نمونه‌ها می‌باشد.

میزان بقا: میزان بقا در تیمارهای مختلف تغذیه شده با جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* و مواجهه‌شده با ویروس براساس جدول ۲ و شکل ۳ بیش‌ترین میزان بقا در تیمارهای T1 و T3 به‌میزان ۰/۰۰ ± ۱۰۰ و ۹۸/۳۳±۰/۸۸ به‌ترتیب و کم‌ترین در تیمارهای T2 و T4 به‌میزان ۰/۵ ±۲۲/۵ و ۰/۰۰±۰/۰۰ به‌ترتیب می‌باشد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که مصرف جلبک باعث شده است که میگوهای تیمار T2 که در مواجهه با ویروس بوده در مقایسه با تیمار T4 که جلبک مصرف نکرده‌اند ولی با ویروس مواجهه‌شده به‌میزان ۲۲/۵٪ بازماندگی از خود نشان دهد و این نتیجه تایید می‌کند که جلبک باعث ارتقا ایمنی میگو و افزایش بازماندگی شده است.



شکل۲: نتایج PCR در نمونه‌های میگوهای تغذیه شده با*گراسیلاریا کورتیکاتا* (G/V)، M (نشانگر)، C- (شاهد منفی)، C+ (شاهد مثبت). میگوهای تغذیه شده با جلبک دارای ویروس بوده و باندهای تشکیل شده نشان‌دهنده شکل حاد بیماری می‌باشد.

جدول ۲: نتایج حاصل از بررسی درصد بازماندگی میگوهای پاسفید

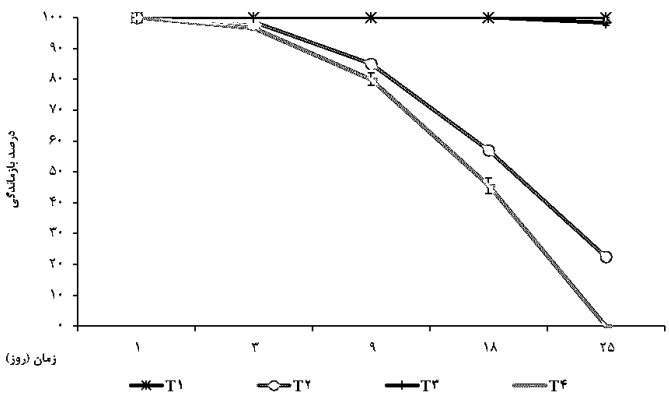
روز / تیمار	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
T1 (جلبک)	۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰۰±۰/۰۰b	۱۰۰±۰/۰۰c	۱۰۰±۰/۰۰c	۱۰۰±۰/۰۰a
T2 (جلبک/ویروس)	۱۰۰±۰/۰۰a	۹۸/۵±۰/۰۵b	۸۵±۱b	۵۷±۱b	۲۲/۵±۰/۵b
T3 (شاهد)	۱۰۰±۰/۰۰a	۱۰۰±۰/۰۰b	۱۰۰±۰/۰۰c	۱۰۰±۰/۰۰c	۹۸/۳۳±۰/۸۸a
T4 (شاهد/ویروس)	۱۰۰±۰/۰۰a	۹۶/۵±۰/۰۵a	۸۰±۲a	۴۵/۵±۲/۵a	۰/۰۰±۰/۰۰

(میانگین±خطای استاندارد) *حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی است (P<۰/۰۵).

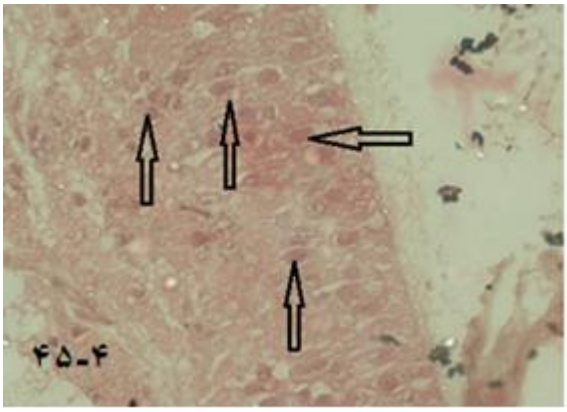
آسیب‌شناسی: براساس مطالعات آسیب‌شناسی میگوهای تغذیه شده با جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* و مواجهه شده با ویروس لکه سفید در اندام‌های مختلف آلودگی را نشان داده و تغییرات یاخته‌ای در آن‌ها مشاهده می‌گردد.همان‌گونه که‌در شکل ۳ مشاهده می‌شود،یاخته‌های اپی‌تلیال در معده دارای گنجیدگی‌های داخل یاخته‌ای و هیپرتروفی یاخته‌ای می‌باشند.

هم‌چنین بررسی آسیب‌شناسی بافت‌های آبشش، لنفاوی و اپی‌تلیوم در میگوهای تغذیه شده با جلبک گنجیدگی‌ها به‌وضوح قابل دیدن است (شکل‌های ۵ الی ۸). در شکل‌های ۹ و ۱۰ به‌ترتیب بافت عضله میگو تغذیه شده با جلبک و نیز واکوئله شدن هپاتوپانکراس در میگوی مواجهه شده با ویروس لکه سفید با تغذیه معمولی مشاهده می‌شود.

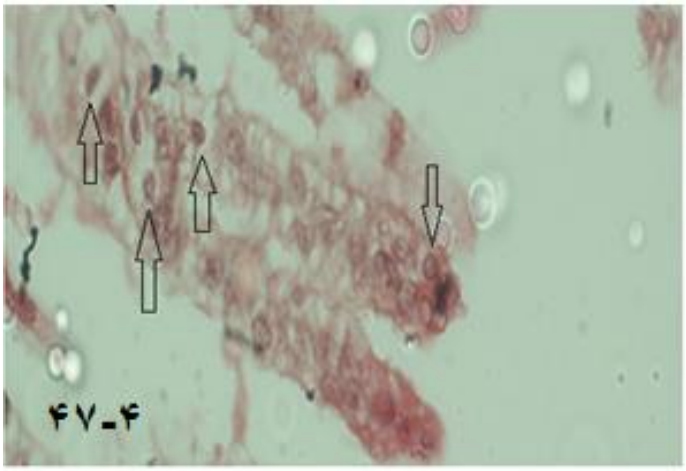
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579



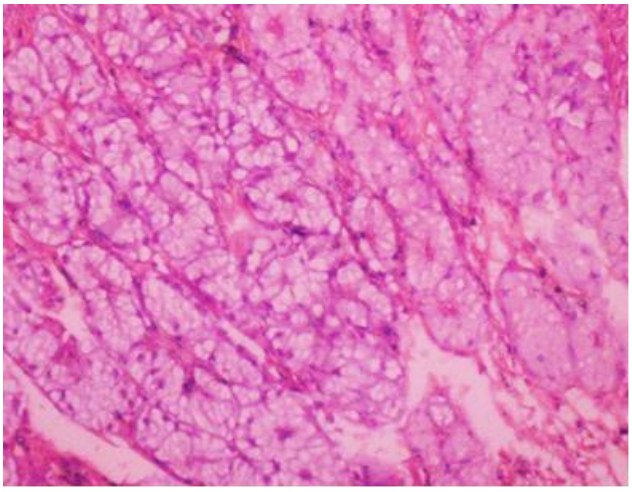
شکل ۳: مقایسه درصد بازماندگی در تیمار آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس



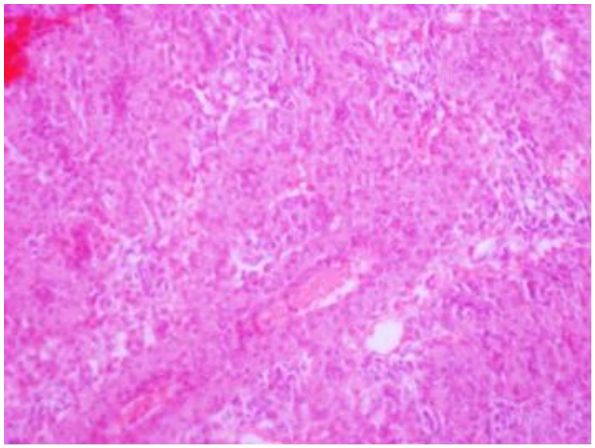
شکل ۴: مشاهده اپی‌تلیوم در معده که گنجیدگی‌های یاخته‌ای (پیکان) در میگوهای تغذیه شده با جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* را نشان می‌دهد .H&E/Pheoxin. X:400



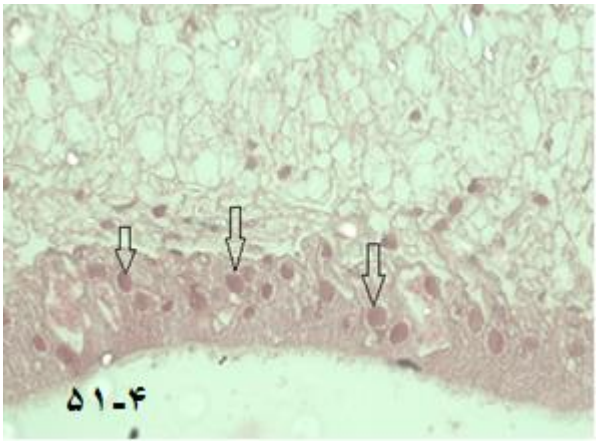
شکل ۵: گنجیدگی‌های به‌وجود آمده در آبشش میگوی تغذیه شده با جلبک (پیکان) . H&E/Pheoxin. X:400.



شکل ۶: غده لنفاوی میگوی شاهد، تراکم سلول‌های کم‌تر نسبت به تیمار جلبک قابل مشاهده است (X۲۰۰)



شکل ۷: غده لنفاوی میگوی تغذیه شده با جلبک، تراکم سلول‌ها قابل مشاهده است (X۲۰۰)



شکل۸ : گنجیدگی‌های به‌وجود آمده در بافت اپی‌تلیوم روده میگوی تغذیه شده با جلبک (پیکان) . H&E/Pheoxin. X:400.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

بحث

مهم‌ترین چالش‌های پرورش میگوی سفید غربی عبارت است از بهداشت و بیماری‌ها، قیمت غذا، قیمت جهانی میگو، کیفیت تخم و پست‌لارو، دسترسی به مولدین‌عاری از بیماری، کنترل کیفی محصولات تولیدی، قیمت‌سوخت، ممنوعیت استفاده از پادزی‌ها و موادشیمیایی، موضوع‌های زیست محیطی و زیرساختارها که هرکدام دارای تاثیرات مختلفی بر تولید میگو دارند. در این میان مهم‌ترین موضوع بهداشت و بیماری‌ها بوده و سالیانه از ناحیه بیماری‌های میگو (بیماری لکه سفید) بالغ بر ۳۰٪ از میگوی تولیدی در دنیا از بین می‌رود که رقمی معادل ۶ میلیارد دلار به این صنعت خسارت وارد می‌شود. در میان بیماری‌های ویروسی میگو بیماری لکه سفید خسارت زیادی به مزارع پرورشی وارد نموده و پرورش‌دهندگان از بابت این بیماری خسارت سنگینی متحمل شده‌اند. از سال ۱۹۹۲ که این بیماری بروز نمود موجب تلفات بسیار زیادی در مزارع پرورش میگو در سراسر جهان گردید. طی دو دهه، این بیماری به کلیه مناطق دنیا گسترش یافت و بالغ بر میلیاردها دلار خسارت به پرورش‌دهندگان میگو وارد نمود. هم‌اکنون جهت پیشگیری از این بیماری با اعمال شیوه‌های ایمنی زیستی از قبیل ضدعفونی کردن مزارع و آب، جلوگیری از ورود حاملین و ناقلین ویروس به مزارع پرورشی و ذخیره‌سازی استخرهای پرورشی با میگوها و پست لاروهای عاری از بیماری موجب کاهش خطرات ناشی از این بیماری شده‌اند. اعمال این شیوه‌ها در مزارع پرورشی موجب افزایش تولید نیز گردیده است. از مهم‌ترین روش‌ها می‌توان به استفاده از میگوی عاری از بیماری (SPF)، استفاده از محرک‌های دستگاه‌ایمنی (Immunostimulate)،اعمال روش‌های‌ایمنی زیستی (Biosecurity) و واکسیناسیون اشاره داشت. استفاده از واکسن پایدار و موثر در میگو به‌دلیل نداشتن دستگاه ایمنی خاطره‌ای تاکنون به‌طور کامل موفقیت‌آمیز نبوده است و یکی از بهترین روش‌ها برای پیشگیری از بیماری لکه سفید استفاده از تحریک کننده‌های دستگاه ایمنی میگو می‌باشد. در بین محرک‌های دستگاه ایمنی میگو می‌توان به استفاده از عصاره گیاهان دریایی و مخمرها اشاره داشت. در این تحقیق اثرات استفاده از عصاره گیاه دریایی *گراسیلاریا کورتیکاتا* (*G. corticata*) در پیشگیری از بیماری لکه سفید مورد بررسی قرار گرفته است. براساس نتایج حاصله میگوهای تغذیه شده با عصاره جلبک در مواجهه با ویروس لکه سفید در مقایسه با میگوهای تغذیه شده با غذای تجاری بدون عصاره در مواجهه با ویروس به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) از بقا بیش‌تری برخوردار بودند. هم‌چنین گنجیدگی‌های داخل یاخته‌ای در بافت‌های هپاتوپانکراس، آبشش، معده و روده در میگوهایی که از جلبک تغذیه کرده بودند نسبت به میگوهایی که از جلبک تغذیه نکرده بودند به‌مراتب کم‌تر بود. این موضوع بیانگر آن است که عصاره جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* دارای قدرت محافظتی در برابر ویروس لکه سفید است. نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیق انجام گرفته توسط Lin و همکاران (۲۰۱۱) که از جلبک *گراسیلاریا تنیستیپیتا* (*G. tenuistipitate*) برای محافظت در برابر ویروس لکه سفید در میگوی پا سفید استفاده نمودند شباهت داشته و موجب بقا بیش‌تر و افزایش عوامل ایمنی و کاهش گنجیدگی داخل یاخته‌ای در بافت هپاتوپانکراس در میگو می‌گردد. Seyedmortezaei و همکاران (۲۰۱۲) گنجیدگی‌های داخل یاخته‌ای‌رادر بافت‌های‌آبشش، کوتیکول و هپاتوپانکراس میگوی وانامی آلوده به بیماری لکه سفید در مزارع پرورشی چوئبده آبادان گزارش کردند. بصیر و همکاران (۱۳۸۹) نیز واکوئله شدن بافت هپاتوپانکراس را در میگوی وانامی آلوده به بیماری لکه سفید مشاهده کردند. Ahmad و همکاران (۲۰۱۷) نیز نکروز یاخته‌های هپاتوپانکراس، نکروز لاملاهای ثانویه و التهاب و هیپرتروفی ناشی از گنجیدگی‌های داخل یاخته‌ای در میگوی وانامی آلوده به ویروس لکه سفید را گزارش کرده است. هم‌چنین Balasubramanian و همکاران (۲۰۰۷)، از بیست جلبک دریایی بر علیه ویروس لکه سفید استفاده و مشاهده نمودند که پنج جلبک شامل *Aegle marmelos, Cynodon dactylon, Lantana camara,Momordica charantia* و *Phyllanthus amarus* دارای خاصیت ضدویروسی می‌باشند. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که گیاهان دریایی دارای خاصیت زیادی در مقابله با ویروس‌ها بوده و این خاصیت به‌دلیل داشتن ترکیباتی ازجمله پلی‌ساکاریدها، تانن‌ها، فلاونیدها، فنل‌ها، بروموفنل‌ها و کارتنوئیدها می‌باشد (Rajasekar، ۲۰۱۲؛ Rodríguez-Bernaldo de Quirós، ۲۰۱۰). براساس یک گزارش استفاده خوراکی فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Sargassum polycystum* در غذای میگو های ۸-۵ گرمی و ۱۵-۱۲ گرمی می‌تواند سبب کاهش اثر WSSV بر میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) گردد (Chotigeat، ۲۰۰۴). در مطالعه‌ای که Wongprasert و همکاران (۲۰۱۴) انجام‌دادند مشاهده نمودند که سولفوگالاکتان استخراج شده از جلبک *گراسیلاریا فیشری* سبب کاهش تلفات در میگوی مونودون و کاهش تکثیر ژن سازنده پروتئین VP28 در ویروس لکه سفید می‌شود. این نتایج بیان می‌کند که سازوکارهای مختلفی ممکن است در خاصیت ضدویروسی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* نقش داشته باشند. اول این‌که مهم‌ترین راه‌های ورود ویروس لکه‌سفید به میگو یاخته‌های اپتلیال روده جلویی، آبشش و کوتیکول (Chang، ۱۹۹۶) و روده میانی (Di Leonardo، ۲۰۰۵) می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که ترکیبات پلی‌ساکارید موجود در جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* با ویروس لکه سفید رقابت نموده و در این رقابت ویروس نمی‌تواند وارد یاخته‌های میگو گردد. دومین روش ممکن این است که گیرنده‌های سطح یاخته‌های میگو ممکن است به‌وسیله

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

ترکیبات موجود در جلبک *گراسیلاریا* پوشیده شده و اجازه ندهد که ویروس‌ها به سطح یاخته‌های میگو بچسبند. Verbruggen و همکاران (۲۰۱۶)، گزارش نموده‌اند که ویروس لکه سفید از طریق درون‌بری (اندوسیتوز) و به‌واسطه واکنش‌های پروتئینی کلاترین وارد یاخته‌های میگو می‌شود. براساس این مدل ویروس به گیرنده‌های سطح یاخته‌ها متصل و سپس براساس شبکه درون‌بری با واسطه کلاترین (Clathrin dependent endocytosis) وارد یاخته‌ها می‌شود. این نوع از درون‌بری با واسطه وزیکول‌های کوچک با قطر تقریبی ۱ نانومتر که توسط پروتئین سیتوپلاسمی کلاترین پوشیده شده‌اند، صورت می‌گیرد. مولکول‌هایی به این طریق می‌توانند وارد یاخته شوند که برای آن‌ها در سطح یاخته گیرنده وجود داشته باشد. در سطح یاخته گیرنده‌هایی وجود دارد که از لحاظ شکل فضایی مکمل ماده ورودی به یاخته می‌باشند. در واقع برای هر ماده‌ای که از طریق درون‌بری (اندوسیتوز) با واسطه گیرنده وارد سلول می‌شوند، یک نوع گیرنده بر روی سطح یاخته وجود دارد. این مواد اولین گام برای ورود به یاخته را از طریق اتصال به همین گیرنده‌ها طی می‌کنند. بعد از اتصال گیرنده به لیگاند، در زیر گیرنده یک ساختار پروتئینی به نام کلاترین شکل می‌گیرد (Verbruggen، ۲۰۱۶). یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های موثر در ورود ویرس لکه سفید پروتئین VP28 می‌باشد. براساس گزارش Wang و همکاران (۲۰۱۳)، تاکنون ۱۱ الگوی شناسایی گیرنده pattern recognized receptor (PRRs) در میگو شناسائی شده است. یکی از این PRR مهم به‌نام سی‌لکتین (C-type lectins) است که با پروتئین VP28 باند می‌شود. سی‌لکتین دارای یک یا دو محل باند شدن در سطح یاخته‌ها بوده که به کربوهیدرات‌ها نیز بسیار حساس می‌باشد. در مواقعی که جلبک *گراسیلاریا* به میگو داده می‌شود کربوهیدرات‌ها به محل سی‌لکتین باند و مانع از چسبیدن VP28 ویروس لکه سفید شده و به این طریق مانع بیماریزایی ویروس می‌شوند. مطالعات صورت گرفته قبلی نیز تایید می‌کند که جلبک‌های حاوی کربوهیدرات و فوکوئیدان شامل جلبک‌های قهوه‌ای *Sargassum polycystum*، جلبک *Sargassum wightii*، عصاره جلبک قرمز *Gracilaria tenuistipitata* و جلبک *Gracilaria fisheri* می‌توانند موجب کاهش تلفات ویروس لکه سفید شده و به‌نظر می‌رسد ساز و کار عمل جلبک استفاده شده در این تحقیق شبیه سایر جلبک‌های خانواده گراسیلاریا می‌باشد (Immanuel، ۲۰۱۲؛ Sririrustananun، ۲۰۱۱؛ Wongprasert، ۲۰۱۴). در بحث کلی می‌توان اعلام نمود که میگوهای تغذیه شده با جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* دارای مقاومت بیش‌تری به ویروس لکه سفید دارد و میزان گنجیدگی‌های داخل یاخته‌ای کم‌تری در بافت‌ها دیده می‌شود و علاوه بر آن دارای بقا بیش‌تری نسبت به گروه کنترل مثبت بوده و میزان بقا در میگوهای مواجهه با ویروس تخفیف حدت یافته از سایر گروه‌ها بیش‌تر می‌باشد.

منابع

۱. **Afsharnasab, M.; Mortezaei, R.; Yegane, V. and Kazemi, B., 2009.** Gross sign, histopathology and polymerase chain reaction observations of white spot syndrome virus in shrimp specific pathogen free *Litopeneaus vannamei* in Iran. Asian Journal of animal and veterinary advances. Vol. 4, pp: 297-305.

۲. **Ahmad, T.; Sanyal, K.B.; Mukherjee, D.; Abraham, T. and Dash, G., 2017.** Detection of white spot virus (WSV) *in Litopenaeus vannamei* from shrimp aquaculture farms in East Midnapore district, West Bengal (India).

۳. **Balasubramanian, G.; Sarathi, M.; Kumar, S.R. and Hameed, A.S.S., 2007.** Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. Aquaculture. Vol. 263, pp: 15-19.

۴. **Basir, R.; Abdi, R.; Kochenin, P.; Morovati, H.; Peyghan, R.; Movahednia, A. and Basir, Z., 2010.** Histomorphology and histopathological changes in hepatopancrease of Litopenaeus vannamei caused by white spot disease. Journal of marine biology. Vol. 2, No. 6, pp: 13-18.

۵. **Chang, P.S.; Lo, C.F.; Wang, Y.C. and Kou, G.H., 1996.** Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 27, pp: 131-139.

۶. **Chotigeat, W.; Tongsupa, S.; Supamataya, K. and Phongdara, A., 2004.** Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture. Vol. 233, pp: 23-30.

۷. **Di Leonardo, V.A.; Bonnichon, V.; Roch, P.; Parrinello, N. and Bonami, J.R., 2005.** Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera Marsupenaeus and Palaemon. J Fish Dis. Vol. 28, pp: 565-569.

۸. **De Silva, S.S. and Anderson, T.A., 1994.** Fish nutrition in aquaculture, Springer Science & Business Media.

۹. **El-Banna, S. and Atallah, S., 2009.** Study the role of feed additives in prevention of fish diseases incidence in *Oreochromis niloticus* and common carp fish and its economic importance. Journal of The Arabian Aquaculture Society. Vol. 4, No. 2, pp: 121-140.

۱۰. **Faramarzi, M.; Kiaalvandi, S. and Iranshahi, F., 2011.** The effect of probiotics on growth performance and body composition of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal and Veterinary Advances. Vol. 10, pp: 2408-2413.

۱۱. **Flegel, T.W., 2006.** Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture. Vol. 258, pp: 1-33.

۱۲. **Immanuel, G.; Sivagnanavelmurugan, M.; Marudhupandi, T.; Radhakrishnan, S. and Palavesam, A., 2012.** The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish Shellfish Immunology. Vol. 32, pp: 551-564.

۱۳. **Jaime-Ceballos, B.; Villarreal, H.; Garcia, T.; Pérez–Jar, L. and Alfonso, E., 2005.** Effect of Spirulina platensis meal as feed additive on growth, survival and development in Litopenaeus schmitti shrimp larvae. Rev. Invest. Mar. Vol. 26, pp: 235-241.

۱۴. **Lightner, D.V.; Redman, R.M.; Pantoja, C.R.; Tang, K.F.; Noble, B.L.; Schofield, P.; Mohney, L.L.; Nunan,**

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

L.M. and Navarro, S.A., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 110, pp: 174-183.

۱۵. **Lin, Y.; Yeh, S.T.; Li, C.C.; Chen, L.L.; Cheng, A.C.; J.C. Chen .2011.** An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp Litopenaeus vannamei challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 31, No. 6, pp: 1239-1246.

۱۶. **Pulvenis, J., 2008.** The state of world fisheries and aquaculture (SOFIA). Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department.

۱۷. **Rajasekar, T.; Deivasigamani, B.; Kumaran, S.; Sakthivel, M.; Balamurugan, S.; Jothi, E.G. and Priyadharshini, P., 2012.** Antibacterial Activity of Cultivated Marine Seaweeds against Fish pathogenic bacteria *Vibrio harveyi*. Asian Pac J. Trop. Biomed. Vol. 8, pp: 46-53.

۱۸. **Rodríguez-Bernaldo De Quirós, A.; Lage-Yusty, M.A. and López-Hernández, J., 2010.** Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. Food Chemistry. Vol. 121, pp: 634-638.

۱۹. **Seyedmortezaei, S.R.; Ahangarzadeh, M.; Houshmand, H. and Jorf, E., 2012.** Increased susceptibility of white spot syndrome Virus- Infected *Litopenaeus vannamei* to vibrios infection in farms of Choebdeh Abadan. Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi). Vol. 104, No. 7, pp: 53-59.

۲۰. **Sirirustananun, N.; Chen, J.C.; Lin, Y.C.; Yeh, S.T.; Liou, C.H.; Chen, L.L.; Sim, S.S. and Chiew, S.L., 2011.** Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against Vibrio alginolyticus and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. Vol. 31, pp: 848-855.

۲۱. **Soltani, M., Mousavi, H. & Mirzargar, S., 2009**. Status of aquaculture health management in the Islamic Republic of Iran. Proceedings of the 1th International Congress on Aquatic Animal., 27-28.

۲۲. **Verbruggen, B.; Bickley, L.K.; Van Aerle, R.; Bateman, K.S.; Stentiford, G.D.; Santos, E.M. and Tyler, C.R., 2016.** Molecular Mechanisms of White Spot Syndrome Virus Infection and Perspectives on Treatments. Viruses. Vol. 18, No. 8, pp: 1-23.

۲۳. **Wongprasert, K.; Rudtanatip, T. and Praiboon, J., 2014.** Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. Fish Shellfish Immunol. Vol. 36, pp: 52-60.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129579

Histopathology of shrimp fed with algae *Gracillaria corticata* compared to shrimp fed with commercial in the face of white spot syndrome virus

- **Seyed Reza Seyed mortezaei:** Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
- **Hossein Houshmand*:** South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran
- **Mina Ahangarzadeh:** South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran
- **Mehrdad Mohammadidoust:** South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran
- **Mohammad Afsharnasab:** Department of Aquatic Animals Health and Diseases, Veterinary Faculty, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: November 2019 Accepted: February 2020

Key words: *G. corticata*, Histhoptology, White Spot Syndrome Virus, *L. vannamei*

Abstract

White spot disease (WSD) is one of the shrimp lethal viral diseases that causes heavy losses on all shrimp of Penaeid family. In this study comparison of histopathological effects of Red algae *Gracillaria corticata* dietary in shrimp challenged to white spot syndrome virus was investigated. For this aim 1200 SPF white leg shrimp (*L. vannamei*) sub adult with average weight of 10±1.02 g was collected and divided to four groups. The first group (T1) fed G. corticata powder was mixed with shrimp feed (2 g/Kg), second group (T2) fed G. corticata (2 g/ Kg) and after 14 days injected with WSSV and all groups maintained for 25 days, third group (T3) fed with commercial pellet and fourth group fed with commercial pellet and then injected with WSSV and all group maintained for 25 days. For histopathology survey, the samples of gills, hepatopancreas, lymphoid tissue, stomach and gut were fixed in davidson solution. Tissues were embedded in paraffin wax, sectioned at 5µm and stained with hematoxylin-floxin eosin. The histopathology results indicated that samples fed with algae and positive control in the face of white spot syndrome virus were inclusion body cells observed in gills, stomach, gut and hepatopancreas. Survival rate in T2 group was higher and significantly different ($P<0.05$) from T4.

* Corresponding Author's email: houshmand_h@yahoo.com