مطالعه ایریدو ویروس (Iridovirus) در مولدین تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با استفاده از روش PCR

سهیل بازاری مقدم*[۱]، محمد پورکاظمی[۲]، علیرضا شناور ماسوله[۳]،
سمیه حقیقی کارسیدانی[۴]، فریدون چکمه دوز قاسمی[۵]
۱، ۲ و ۳- مؤسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۴۶۴ - ۴۱۶۳۵
۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرانزلی، بندرانزلی، ایران، صندوق پستی: ۱۴۵۱- ۴۳۱۴۵
۵- پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، بندرانزلی، ایران، صندوق پستی: ۶۶

تاریخ دریافت: ۱۹ اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۰ خرداد ۱۳۹۲

چکیده

ایریدوویروس‌ها با دارا بودن پنج جنس ایریدوویروس، کلریریدوویروس، راناویروس، لمفوسیستی ویروس و مگالوسیتی ویروس در تعداد زیادی ازگونه‌های ماهیان آب شیرین و شور ایجاد بیماری می‌نمایند. نظر به اینکه ماهیان خاویاری از گونه‌های تجاری و بسیار ارزشمند دریای خزر محسوب شده و ایریدوویروس تاکنون در گونه‌های مختلفی از ماهیان خاویاری نظیر تاسماهی سفید، تاسماهی پاروپوزه، تاسماهی روسی و تاسماهی پاروبینی سفید شناسایی شده است، لذا این بررسی برای اولین بار در ایران بر روی مولدین تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) صید شده از سواحل جنوبی دریای خزر صورت پذیرفت. با توجه به جایگزین شدن و تکثیر سریع این ویروس در سلول‌های اپی تلیال پوست و بویژه باله سینه‌ای، از مولدین مشکوک به این ویروس، ۱۵۰ نمونه باله تهیه و در فریزر $-20^{\circ}C$ نگهداری گردید. به منظور انجام این مطالعه از کیت تشخیصی IQ2000 استفاده شد. DNA نمونه‌ها با استفاده از روش و محلول‌های موجود در کیت استخراج گردیده و به منظور ارزیابی کیفیت آن‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. DNA های مناسب سپس با پرایمرهای اختصاصی، PCR گردیدند. برای اثبات وجود باند، به میزان ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪، الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردیدند. مطابق نمونه ارائه شده در کیت، تمامی نمونه‌های فاقد ایریدوویروس می‌بایست باند PCR به میزان ۶۵۵ bp تولید نمایند که در کلیه نمونه‌ها باند مذکور ایجاد گردید. براساس نتایج این تحقیق می‌توان اعلام نمود که ایریدوویروس در مولدین بررسی شده تاسماهی ایرانی مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: دریای خزر، تاسماهی ایرانی، ایریدوویروس، DNA، PCR.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). soheilbm274@gmail.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1392.7.2.1.2]

مقدمه

ایریدوویروس‌ها از جمله ویروس‌های بیست وجهی با ژنوم DNA دو رشته‌ای بزرگ هستند که دارای ضخامتی معادل ۱۲۰ الی ۳۰۰ نانومتر می‌باشند. این ویروس دارای ژنوم دایره‌ای متحدالمرکز بوده که چنین خصوصیات بیولوژیکی و مولکولی در ویروس‌های یوکاریوت مشاهده می‌گردد (Delius, *et al.*,1984; Darai, *et al.*,1983; He, *et al.*, 2001). این نوع ویروس با دارا بودن پنج جنس ایریدوویروس، کلریریدوویروس، رانا ویروس، لمفوسیستی ویروس و مگالوسیتی ویروس در تعداد زیادی ازگونه‌های ماهیان آب شیرین و شور ایجاد بیماری می‌نمایند (Chinchar, *et al.*, 2005). درسالیان اخیر این ویروس‌ها در صنعت آبزی‌پروری بسیاری از کشورهای دنیا و بویژه کشورهای آسیایی از جمله ژاپن، کره‌جنوبی، هنگ-کنگ، سنگاپور، تایوان و تایلند مخاطرات اکولوژیکی و اقتصادی زیادی را با ایجاد تلفات شدید و خسارات جبران ناپذیر سبب شده است (Chao, *et al.*, 2002; Miyata, *et al.*, 1997). ایریدوویروس تاکنون در گونه‌های مختلفی از ماهیان خاویاری دنیا نظیر تاسماهی سفید(*Acipenser transmontanus*)، تاسماهی پاروپوزه (*Polyodon spathaula*)، تاسماهی روسی (*Acipenser guldenstaedtii*) و تاسماهی پاروبینی سفید (*Scaphirhynchus albus*) شناسایی شده‌اند (Lapatra, *et al.*, 1994; Hedrick, *et al.*, 1990). همچنین در گونه‌های استخوانی نظیر ماهی هامور (*Epinephelus hybrid*)، سوف دریایی بزرگ (*Lates calcarifer*)، باس دهان بزرگ (*Micropterum salmoides*)، هامور پادشاه (*Epinephelus lanceolatus*)، سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) و سیم صخره‌ای (*Oplegnathus fasciatus*) مشاهده شده است (Do, *et al.*, 2004).

نظر به اینکه در تاسماهی ایرانی که ازمهمترین گونه‌های تجاری دریای خزر محسوب شده و هر ساله بیشترین میزان تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان خاویاری را از مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان خاویاری کشورمان به خود اختصاص می‌دهد هیچ‌گونه مطالعه‌ای مبنی بر وجود و یا عدم وجود این ویروس صورت نپذیرفته بود، لذا این مطالعه برای اولین بار در ایران به‌منظور شناسایی ایریدوویروس در مولدین تاسماهی ایرانی با استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR با استفاده از کیت تشخیصی IQ2000 انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه باله‌های سینه‌ای ۱۵۰ مولد تاسماهی ایرانی با میانگین طول کل ۳/۴۹±۱۶۷/۷ سانتیمتر و میانگین وزنی ۲/۸۷±۲۱/۹ کیلوگرم طی تکثیر بهاره سال‌های ۱۳۸۶ الی ۱۳۸۸ (سه سال) در سه استان شمالی کشور (گیلان، مازندران و گلستان) جمع‌آوری گردیدند (جدول ۱).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1392.7.2.1.2]

جدول ۱: نمونه‌های جمع‌آوری شده جهت مطالعات ایریدوویروس طی سال‌های ۱۳۸۶ الی ۱۳۸۸

استان / سال	گیلان	مازندران	گلستان	جمع کل
۱۳۸۶	۳۰	۱۵	۱۴	۵۹
۱۳۸۷	۱۸	۱۴	۱۲	۴۴
۱۳۸۸	۲۰	۱۵	۱۲	۴۷
جمع کل	۶۸	۴۴	۳۸	۱۵۰

نمونه باله از مولدینی جمع‌آوری گردید که عمدتاً دارای علائمی نظیر زخم در نواحی پلاک‌های استخوانی و باله‌ها بودند. بدین منظور بخشی از باله‌ها پس از برش در داخل تیوپ cc ۱/۵ در شرایط استریل در فریزر در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری گردید.

پس از انجام مراحل نمونه‌برداری، به منظور استخراج DNA و انجام PCR از پروتکل کیت تشخیصی IQ2000 استفاده شد. بدین منظور جهت استخراج DNA کل، حدوداً مقدار ۱۰۰ میلی گرم از بافت باله را در داخل تیوب‌های ۲ میلی لیتری استریل حاوی ۶۰۰ میکرولیتر محلول DTAB قرار داده و توسط قیچی خرد گردید. سپس نمونه‌ها در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شده و پس از همزدن تیوب ها، مقدار ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه نموده و پس از هم زدن به صورت یکنواخت به مدت ۲۰ ثانیه، سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند. محلول رویی (فاز فوقانی) به داخل تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری استریل جدید منتقل شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول CTAB و ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به آن افزوده شد و پس از همزدن نمونه‌ها، در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از این مرحله، نمونه‌ها را در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نموده و پس از خارج کردن محلول رویی مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول حلال کیت به پلت حاصله اضافه و در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و محلول‌های رویی به داخل تیوب ۰/۵ میلی لیتری استریل منتقل گردیدند. جهت رسوب DNA مقدار ۳۰۰ میکرولیتر اتانل خالص اضافه و پس از سانتریفوژ، محلول رویی دور ریخته و برای حل نمودن پلت DNA ، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطراستریل افزوده گردید.

به‌منظور ارزیابی کمی و کیفی DNA های استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ مدل ND1000 و ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. پس از تشخیص کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده، بمنظور تشخیص وجود و یا عدم وجود ایریدوویروس، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) طی دو مرحله بشرح ذیل انجام پذیرفت:

الف- First PCR reaction

مواد مورد استفاده در این مرحله شامل ۷/۵ میکرولیتر First PCR preMix، ۰/۵ میکرولیتر

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1392.7.2.1.2]

IQzyme DNA polymerase و ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده بود. این مواد طی سیکل‌های دمایی $94^{\circ}C$ به‌مدت ۲۰ ثانیه، $62^{\circ}C$ به‌مدت ۲۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به‌مدت ۳۰ ثانیه (تکرار این مراحل ۱۵ مرتبه)، سپس این مواد در $72^{\circ}C$ به‌مدت ۳۰ ثانیه و $20^{\circ}C$ طی زمان ۳۰ ثانیه به خاتمه مرحله اولیه (first) خواهند رسید.

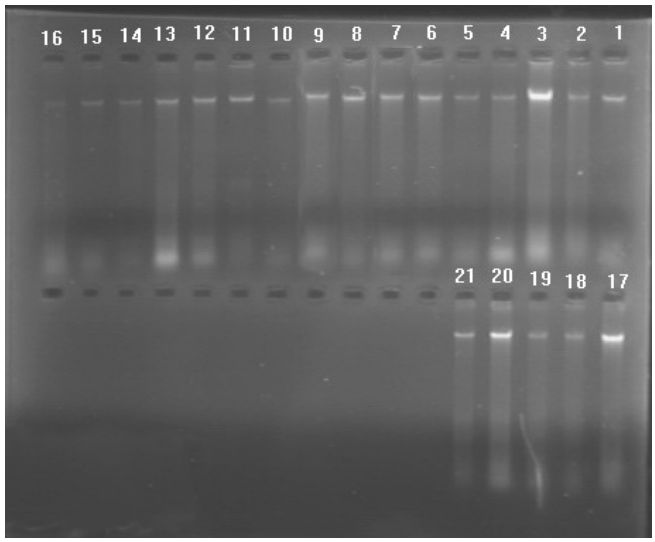
ب- Nested PCR reaction

در این مرحله از ۱۴میکرولیتر Nested PCR preMix، ۱ میکرولیترIQzyme DNA polymerase و محصول اولیه PCR استفاده گردید. این مواد در سیکل‌های دمایی $94^{\circ}C$ به‌مدت ۲۰ ثانیه، $62^{\circ}C$ به‌مدت ۲۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ به‌مدت ۳۰ ثانیه (تکرار این مراحل ۳۰ مرتبه)، سپس این مواد در $20^{\circ}C$ به‌مدت ۳۰ ثانیه به انتهای این مرحله خواهند رسید.

به‌منظور اثبات وجود باند DNA ویروسی (۲۲۹ و ۴۴۰ جفت باز) که نشاندهنده وجود این ویروس در بافت ماهیان مورد نظر می‌باشد مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR را بر روی ژل آگارز ۲٪ برده و الکتروفورز با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید.

نتایج

در این مطالعه نتایج حاصل از استخراج DNA بافت باله مولدین و ارزیابی کیفی DNA های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ بر اساس پروتکل کیت تشخیصی IQ 2000 اجرا گردید. نتایج حاصله حاکی ازکیفیت مناسب DNA جهت انجام مراحل PCR بوده است (شکل ۱).

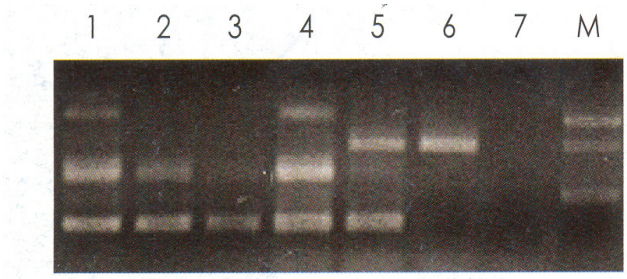


شکل ۱: ارزیابی کیفی DNA های استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪

پس از اخذ DNA با کیفیت مناسب، نسبت به انجام PCR اقدام گردیده که شامل مراحل First PCR reaction و Nested PCR reaction بوده است (جدول ۲). بر اساس اطلاعات موجود در کیت تشخیصی IQ2000 در صورتی‌که نتایج حاصل از بررسی این ویروس در محدوده باندی bp ۲۲۹ و bp

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1392.7.2.1.2]

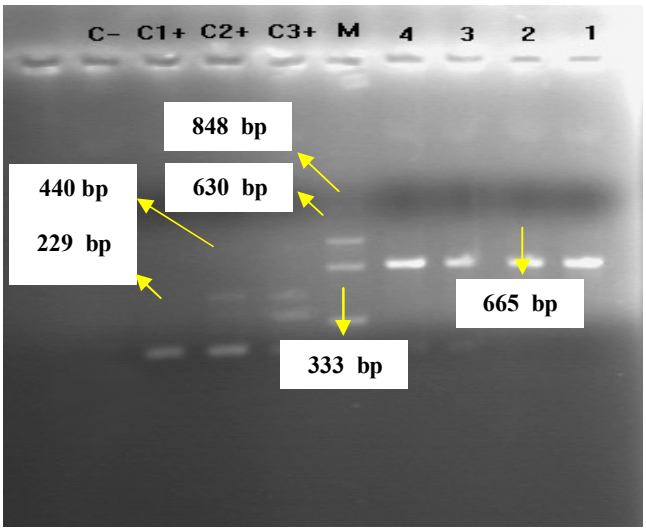
۴۴۰ بوده باشد می توان به وجود ایریدوویروس اطمینان یافت و در حالتی که نتایج در محدوده باندی ۶۶۵ bp مشاهده گردد، حاکی از عدم وجود این ویروس خواهد بود. (شکل ۲).



شکل ۲: نتایج PCR چند نمونه مثبت و منفی درکیت IQ2000

۱- کنترل $^{+}$۳ (۲۰۰۰ کپی از DNA ویروس)
۲- کنترل $^{+}$۲ (۲۰۰ کپی از DNA ویروس)
۳- کنترل $^{+}$۱ (۲۰ کپی از DNA ویروس)
۴- نمونه با آلودگی شدید به ایریدوویروس
۵- نمونه با آلودگی خفیف به ایریدوویروس
۶- نمونه فاقد ایریدوویروس (باند ۶۶۵ bp)
۷- کنترل منفی (آب مقطر استریل)
۸- مارکر M (۳۳۳ bp - ۶۳۰ bp - ۸۴۸ bp)

در بررسی انجام شده بر روی مولدین تاسماهی ایرانی، وجود باندهای تولید شده حاصل از PCR (در محدوده ۶۶۵ bp)، نشان از عدم تکثیر ژنوم ویروس مورد نظر با استفاده از پرایمرهای تخصصی کیت IQ2000 بوده است (شکل ۳).



شکل ۳: محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪

بحث

نظر به شیوع جهانی بیماری ایریدوویروس در ماهیان استخوانی و خاویاری، امکان بروز آن در ماهیان دریای خزر نیز وجود دارد. علیرغم رهاسازی‌های هر ساله بچه ماهیان خاویاری توسط مراکز تکثیر و بازسازی ذخایر، کاهش میزان صید ماهیان خاویاری در

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1392.7.2.1.2]

دریای خزر را می توان علاوه بر عوامل اکولوژیکی به عوامل بیماریزا از جمله ویروس‌ها مرتبط دانست. طی بررسی‌های انجام گرفته در خصوص بیماری ایریدوویروسی تاسماهی سفید (WSIV)، مشخص گردید که این بیماری متمایل به بافت‌های اپی تلیالی بوده، پوست و مخصوصاً باله‌های این ماهیان را درگیر می‌نماید. عفونت مخاط دهان و اپی تلیوم اندام‌های بویایی موجب توقف دریافت غذا شده، که در نهایت منجر به لاغری شدید علاوه بر علائم خارجی قابل مشاهده در این بیماری می گردد (Watson, *et al.,* 1998). این بیماری با تلفات شدید و بالای ۹۵٪ در هچری نیز همراه بوده که طی آن ضمن ایجاد عفونت-های ثانویه، می تواند موجبات افزایش تلفات را فراهم سازد. در مطالعات انجام شده توسط Watson و همکاران (۱۹۹۸)، عفونت‌های تجربی متوسط تا شدید در طول ۲ تا۳ هفته پس از تماس با ویروس در دمای ۱۷ تا ۱۹ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

علائم بالینی این بیماری شامل خونریزی بر روی سطح پوست و بویژه باله‌ها بوده و هیچ گونه علامت اختصاصی داخلی در این بیماری وجود ندارد (Watson, *et al.,* 1998). لذا تشخیص آن به کمک روش‌های مولکولی، بافت شناسی و میکروسکوپ الکترونی وسرولوژیکی وکشت سلول امکانپذیر می‌باشد. بر اساس مطالعات انجام شده توسط Kwak و همکاران (۲۰۰۵) که بمنظور بررسی آلودگی مولدین تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) به ایریدوویروس با استفاده از روش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد، استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی مبتنی بر PCR را به‌عنوان یک روش سریع جهت تشخیص ایریدوویروس در این ماهیان اعلام نمود. Raverty و همکاران (۲۰۰۳) از دو روش پاتولوژیک و میکروسکوپ الکترونی برای تشخیص ایریدوویروس در تاسماهی پاروبینی سفید (*Scaphirhynchus albus*) پرورشی و تاسماهی پاروپوزه (*Polyodon spathaula*) استفاده نمودند که وجود سلول‌های مالپیگی بزرگ در روش بافت شناسی و ویروس‌های درشت ۲۰ وجهی را توسط میکروسکوپ الکترونی گزارش نمودند. در مطالعه حاضر که برای اولین بار در ایران بمنظور بررسی وجود ایریدوویروس در ماهیان خاویاری با استفاده از روش PCR توسط کیت تشخیصی IQ2000 در مولدین تاسماهی ایرانی صورت پذیرفت، حاکی از مشاهده باند ۶۶۵bp بوده که بر اساس کیت مذکور حاکی از عدم وجود ایریدوویروس می‌باشد. Do و همکاران (۲۰۰۴) با توسط روش مولکولی و با استفاده ازکیت تشخیصیIQ2000، ایریدوویروس را بر روی ماهی گروپر (*Epinephelus hybrid*) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بدست آمده از مطالعات بر روی ایریدوویروس در ماهیان خاویاری، گویای این مسئله است که این ویروس سبب مرگ و میر تاسماهیان سفید پرورشی جوان در برخی از کشورهای قاره آمریکا شده است (Lapatra, 1994; Georgiadis, *et al.,* 2000; Georgiadis, *et al.,* 2001). لذا پیشنهاد می‌گردد که مطالعات گسترده‌ای در خصوص ماهیان خاویاری جوان نیز در کشورمان صورت پذیرد.

سپاسگزاری

بدینوسیله ازمساعدت آقایان مهندس جلیل جلیل پور، دکتر مهدی معصوم زاده، مهندس مهدی علیزاده که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، تقدیر و

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1392.7.2.1.2]

تشکر به عمل می‌آید. این مقاله بخشی از نتایج طرح ملی "بررسی وضعیت بهداشتی مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری در استان‌های شمالی کشور" با کد مصوب ۸۴۰۳۰ - ۰۰۰۰ – ۰۵- ۲۰۰۰۰ – ۱۰۰- ۰ بوده که با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور به انجام رسیده است.

منابع

1- Chao, C. B., Yang, S. C., Tsai, H. Y., Chen, C. Y., Lin, C. S., Huang, H. T. 2002. Nested PCR for the detection of grouper iridovirus in Taiwan (TGIV) in cultured hybrid grouper, giant sea perch, and largemouth bass, Journal of Aquatic Animal Health. 14, pp. 104–113.
2- Chinchar, V.G., Essabauer, S., He, J.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Seligy, V., Williams, T., 2005. Iridoviridae. Elsevier, London.
3- Darai, G., Andres, K., Koch, H. G., Delius, H., Gelderblom, H., Samalecos, C., Flugel, R. M., 1983. Analysis of the genome of fish lymphocystis disease virus isolated directly from epidermal tumors of pleuronectes. Journal of Virology. 126, pp. 466-479.
4- Delius, H., Darai, G., Flugel, R. M., 1984. DNA of insect iridescent virus 6: evidence for circular permutation and terminal redundancy. Journal of Virology. 49, pp. 609-614.
5- Do, J. W., Moon, C. H., Kim, H. J., Ko, M. S., Kim, S. B., Son, J. H., Kim, J. S., An, E. J., Kim, M. K., Lee, S. K., Han, M. S., Cha, S. J., Park, M. S., Park, M. A., Kim, Y. C., Kim, J. W., Park, J. W., 2004. Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. Journal of Virology 325, pp. 351-363.
6- Georgiadis, M. P., Hedrick, R. P., Johnson, W. O., Yun, S., Gardner, I.A., 2000. Risk factors for outbreaks of disease attributable to white sturgeon iridovirus and white sturgeon herpesvirus-2 at a commercial sturgeon farm. American Journal of Veterinary Research. 61, pp. 1232-1240.
7- Georgiadis, M. P., Hedrick, R. P., Carpenter, T. E., Gardner, I.A., 2001. Factors influencing transmission, onset, and severity of outbreaks due to white sturgeon iridovirus in a commercial hatchery. Aquaculture 194, pp. 21-35.
8- He, J. G., Deng, M., Weng, S. P., Li, Z., Zhou, S.Y., Long, Q.X., Wang, X.Z., Chan, S.M., 2001. Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. Journal of Virology. 291, pp. 126-139.
9- Hedrick, R. P., Groff, J. M., McDowell, T., Wingfield, W. H., 1990. An iridovirus infection of the integument of the white sturgeon *Acipenser transmontanus*. Dis. Aquat. Org. 8, pp. 39-44.
10- IQ2000TM Irido Detection and Prevention System for Marine Fish. Farming IntelliGene Tech. Corp. www.iq2000kit.com.
11- Kwak, K. T., Gardner, I. A., Farver, T. B., Hedrick, R. P. 2005. Rapid detection of white sturgeon iridovirus (WSIV) using a polymerase chain reaction (PCR) assay. Journal of Aquaculture 254, pp. 92-101.
12- LaPatra, S. E., Groff, J. M., Jones, G. R., Munn, B., Patterson, T.L., Holt, R.A., Hauck, A.K., Hedrick, R.P., 1994. Occurrence of white sturgeon iridovirus infections among cultured white sturgeon in the Pacific-Northwest. Aquaculture 126, pp. 201-210.
13- Miyata, M., Matsuno, K., Jung, S. J., Danayadol, Y., Miyazaki, T. 1997. Genetic similarity of iridoviruses from Japan and Thailand, Journal of Fish Disease. 20, pp. 127–134.
14- Raverty, S., Hedrick, R., Justine, H. 2003. Diagnosis of sturgeon iridovirus infection in farmed white sturgeon in British Columbia. Canada Veterinary Journal. 44, pp. 327–338.
15- Watson, L. R., Groff, J. M., Hedrick, R. P., 1998. Replication and pathogenesis of white sturgeon iridovirus (WSIV) in experimentally infected white sturgeon *Acipenser transmontanus* uveniles and sturgeon cell lines. Disease of Aquatic Organisms Journal. 32, pp. 173-184.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1392.7.2.1.2]