وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده میگوی کشور

عنوان:

تهیه و نگهداری ذخیره‌های مختلف پیش مولد از استان‌های مختلف کشور

مجری:
محمد خلیل پذیر

شماره ثبت
۵۰۹۳۷

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان پروژه : تهیه و نگهداری ذخیره‌های مختلف پیش مولد از استان‌های مختلف کشور
شماره مصوب پروژه : K ۹۱۰۱ -۹۱۰۰۱-۹۱۰۱-۱۲-۸۰-۱۴
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : محمد خلیل پذیر
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) :
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : محمد خلیل پذیر
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمد افشار نسب، محمد پورکاظمی، عباسعلی مطلبی ، بابک قائدنیا، عباسعلی زنده بودی، قاسم غریبی، وحید یگانه، احمد مال الهی، عیسی شریف پور، اکبر پای گذار، مصطفی صبوحی، علیرضا اسدی،عباس متین فر،جواد حسینی، سید احمد قاسمی، اسماعیل آشوری، اردشیر یاراحمدی، صمد راستی، محمد جواد شعبانی، حامد قناعتیان، جلیل معاضدی، مریم میربخش، جواد معرف بهمن آبادی، محمود رمضانی اهرمی، خسرو آئین جمشید، رضا قربانی واقعی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : -
محل اجرا : استان بوشهر
تاریخ شروع : ۹۱/۱۲/۱
مدت اجرا : ۱ سال و ۶ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : تهیه و نگهداری ذخیره‌های مختلف پیش مولد از استان‌های مختلف کشور

کد مصوب :K ۹۱۰۱ -۹۱۰۰۱-۹۱۰۱-۱۲-۸۰-۱۴

شماره ثبت (فروست) : ۵۰۹۳۷ تاریخ : ۹۵/۱۰/۸

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمدخلیل پذیر دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۹۵/۲/۲۷ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت کارشناس در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۲- مواد و روش کار ۵
۲-۱- بررسی تاریخچه واردات مولدین سفیدغربی به کشور ۵
۲-۲- شناسایی مراکز تکثیر پرورش میگوی سفید غربی در کشور ۵
۲-۳- تاریخچه ورود مولدین وارده شده به کشور ۵
۲-۴- تعیین مراکز پرورش میگو ۶
۲-۵- انتخاب مراکز پرورشی ۷
۲-۶- تعیین شاخص‌های ژنتیکی ۸
۲-۷- شناسایی عوامل بیمایزای میگوهای پرورشی مزارع انتخاب شده ۱۲
۲-۸- آنالیز نتایج در دستگاه ژل الکتروفورز ۱۴
۲-۹- شناسایی عوامل بیمایزای باکتریایی ۱۶
۲-۱۰- شناسایی عوامل بیمایزای انگلی ۱۷
۲-۱۱- انتخاب مزارع پرورش میگو سفید غربی ۱۷
۲-۱۲- آماده سازی ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه ۱۷
۲-۱۳- سنجش میانگین وزن و طول ۲۲
۲-۱۴- تعیین میزان بازماندگی پیش مولدین ذخیره سازی شده در سالن قرنطینه ۲۳
۲-۱۵- سنجش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب ۲۳
۲-۱۶- تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده ۲۴
۳- نتایج ۲۵
۳-۱- شاخص‌های ژنتیکی ۲۵
۳-۲- انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ ۲۷
۳-۳- شناسایی عوامل بیماریزا ۲۹
۳-۴- تعداد میگوهای جمع آوری شده از مزارع پرورش میگو ۲۹
۳-۵- میانگین وزن و طول پیش مولدین منتقل شده به سالن قرنطینه ۲۹
۳-۶- میانگین وزن و طول پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه ۳۰
۳-۷- بازماندگی پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه ۳۳

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

۴- بحث ۳۴
۵- نتیجه گیری ۳۸
منابع ۳۹
چکیده انگلیسی ۴۱

چکیده

میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) امروزه به عنوان مهم‌ترین گونه‌های پرورشی میگوهای خانواده پنائیده در جهان محسوب می‌شود که به سرعت جایگزین بسیاری از گونه‌های بومی پرورشی در کشورهای آبزی‌پرور شده است. همزمان با افزایش تقاضا جهت پرورش این گونه این احتمال می‌تواند وجود داشته باشد که با جابجائی میگوهای سفید غربی به مناطق مختلف پرورشی برخی از عوامل بیماریزا نهفته به مناطق جدید پرورشی منتقل گردند. از این رو در این مطالعه سعی شد تا با بستر سازی مناسب شرایط برای تولید میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص فراهم گردد. لذا از میان ذخائر مختلف میگوی پرورشی سفید غربی در کشور براساس بررسی تاریخچه و منشاء ورود و شاخص‌های ژنتیکی از قبیل میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی قابل انتظار، میزان فراوانی آللی، ضریب هم خونی، تمایز ژنی، فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی تنها سه جمعیت مولوکائی، ترکیبی و های‌هلث شناسایی شدند. از سوی دیگر مطالعات بیماری شناسی حاکی از عدم شناسایی عوامل بیماریزای ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی از میگوهای جمعیت‌های مختلف قبل از ذخیره سازی آن‌ها در سالن قرنطینه بود. همچنین نتایج حاصل از زیست سنجی حاکی از آن بود که میانگین وزن و طول میگوهای جمعیت ترکیبی و های‌هلث بطور معنی داری بیشتر از میگوهای جمعیت مولوکائی می‌باشد. لذا با رعایت کلیه شرایط ایمنی زیستی میگوهای جمعیت‌های مختلف بصورت جداگانه در سالن قرنطینه نگهداری شدند. در طول مدت زمان نگهداری میگوها در سالن قرنطینه با انجام آزمایشات مولکولی، میکروبیولوژی و بیوشیمیایی وجود عوامل بیماریزای زنده و غیر زنده مورد ارزیابی قرار گرفت. لذا به دلیل عدم مشاهده هر گونه عامل بیماریزا در طول دوران قرنطینه میگوها جهت انجام پروژه مولد سازی به استخرهای مولدسازی منتقل گردید.

کلمات کلیدی: میگوی سفید غربی، عاری از بیماری خاص، ایمنی زیستی، جمعیت

۱- مقدمه

از زمان شروع صنعت تکثیر و پرورش میگو از سال ۱۹۷۰، تا کنون بیش از پنجاه کشور به توسعه این صنعت مبادرت ورزیده‌اند وحجم بالائی از تولیدات آبزیان این کشورها، به میگوی پرورشی اختصاص یافته است (Van Hulten *et al*., 2000). امروزه مشاهده می‌شود که میگوهای خانواده پنائیده از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی می‌باشند که میزان تولید آن‌ها در سال ۲۰۱۱ میلادی در جهان به رقمی بالغ بر ۴ میلیون تن رسیده است که در این بین میگوی سفید غربی[1] ۹۰ درصد از سهم کل تولید جهانی میگو را بخود اختصاص داده بود (FAO, 2013).

زیستگاه اصلی میگوی سفید غربی سواحل اقیانوس آرام از جنوب مکزیک تا شمال کلمبیا می‌باشد (Perez Farfante & Kensley 1997). بومی سازی آن نیز اولین بار در زیستگاه طبیعی آن صورت گرفت (Gitterle *et al*., 2005a). بدین منظور با ارائه یکسری راهکارها همراه با کاهش مخاطرات بهداشتی، شرایط پرورشی این گونه نیز افزایش یافت (Lotz *et al*., 1995; Moss *et al*., 2005). در این رابطه لاین هایی انتخاب شدند که علاوه بر رشد مناسب، عاری از عوامل بیماریزا ویروسی بودند (Moss *et al*., 2006). از این رو این گونه در سال ۱۹۸۸ به آسیا معرفی شد و جایگزین گونه ببری سیاه که گونه بومی جنوب شرق آسیا بود شد (Rosenberry, 1996). شایان ذکر است که ورود میگوی سفید غربی اولین بار به کشور توسط مؤسسه تحقیقات شیلات ایران در سال ۲۰۰۴ (۱۳۸۳ شمسی) بمنظور ایجاد تنوع گونه‌ای و مقابله با مشکلات ناشی از شیوع بیماری لکه سفید صورت گرفت و امروزه این گونه جایگزین گونه پرورشی سفید هندی شده است.

لذا به دنبال رشد و توسعه سریع صنعت تکثیر و پرورش میگو در جهان عوامل بیماریزای تهدید کننده این صنعت نیز سریعاً توسعه یافتند، بطوریکه بسیاری از عومل بیماریزا از مناطقی که بطور اولیه ظهور پیدا کرده بودند به مناطق جدید انتقال یافتند. این انتقال معمولاً از طریق ذخائر میگوهای زنده و یا فریز شده از کشوری به کشور دیگر و یا از قاره‌ای به قاره دیگر صورت پذیرفت. بطوریکه میگوهای منجمد شده نقش اصلی در انتقال ویروس‌های بیماریزا از قبیل ویروس لکه سفید[2] از آسیا به آمریکا را برعهده داشتند در حالیکه بیماری ویروسی سندروم تورآ[3] توسط مولدین زنده آلوده از آمریکای مرکزی به آسیا منتقل گردید (Nunan *et al*. 1998). از این رو عوامل بیماریزای مختلفی از جمله باکتریایی، ویروسی، قارچی همواره این صنعت مورد تهدید قرار می‌دهند و امروزه عنوان شده که حدود ۲۰ بیماری ویروسی، ۴ بیماری باکتریائی، ۳ بیماری قارچی و تعدادی انگل به عنوان عوامل بیماریزا قادرند در میگوهای خانواده پنائیده موجب ایجاد بیماری شوند (Tapay *et al*., 1999; Lightner, 2003) که از میان عوامل ویروسی، ویروس‌های متعلق به خانواده نیماویریده[4]، پاروویریده[1]،

1-*Litopenaeus vannamei*
2 -White Spot Syndrome Virus (WSSV)
3 -Taura Syndrome Virus Disease (TSV)
4 -*Nimaviridae*

پیکورناویریده[۲] و سایر ندوویریده‌ها[۳] از مهم‌ترین عوامل بیماریزای ویروسی محسوب می‌شوند (Munro & Owens, 2007) که موجب ایجاد بیماری‌های ویروسی همانند بیماری ویروسی لکه سفید، بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم[۴]، بیماری ویروسی کله زرد[۵]، بیماری ویروسی سندروم تورآ، بیماری باکیولوویروس مونودن[۶]، بیماری نکروز عفونی عضلات[۷] و بیماری ویروسی هپاتوپانکراس[۸] در میگوهای خانواده پنائیده می‌شوند (افشار نسب، ۱۳۸۶).

لذا با توجه به وجود سیستم ایمنی ساده در بی مهرگان نسبت به مهره داران و عدم حضور سلول‌های حافظه‌ای در سخت پوستان، تا کنون راهکارهای متعددی از جمله تولید میگوهای عاری از عوامل بیماریزا[۹] و میگوهای مقاوم به عوامل بیماریزا[۱۰] جهت مقابله با خسارات ناشی از عوامل بیماریزا در میگوهای خانواده پنائیده صورت پذیرفته است (Pruder *et al*., 1995; Lotz, 1997). که با انجام این راهکارها از یک سو علاوه بر افزایش تولید میگو در واحد سطح شیوع عوامل بیماریزا نیز بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرد (Fegan & Clifford, 2001). از این رو مشاهده شد که به دنبال ورود مولدین عاری از عوامل بیماریزا از هاوائی به کشور کره در مجموع میزان رشد و تولید میگو به میزان ۳۰ تا ۵۰ درصد افزایش پیدا کرد، از سوی دیگر شیوع بیماری‌های ویروسی در میگوهای سفید غربی عاری از عوامل بیماریزا نسبت میگوهای چینی[۱۱] بطور معنی داری کاهش یافت (Jang & Jun, 2005). ورود میگوهای سفید غربی عاری از عوامل بیماریزا به تایلند اولین بار در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت، نتایج حاکی از آن بود که این میگوها هم از بازماندگی بالا و هم از رشد سریع‌تری نسبت به میگوهای معمولی برخوردار بودند (Wyban, 2007). لذا از مهم‌ترین ویژگی‌های میگوهای عاری از عوامل بیماریزا قابلیت پرورش در تراکم‌های بالا، شوری‌های پائین (Singh & Lakra, 2012) و کاهش خطر ورود عوامل بیماریزای بیگانه توسط گونه‌های غیر بومی می‌باشد (Flegel, 2006). لیکن با توجه به اینکه میگوهای عاری از عوامل بیماریزا در مکان‌هایی با ایمنی زیستی بسیار بالا و عاری از عوامل بیماریزای اختصاصی از قبیل بیماری ویروسی لکه سفید، بیماری ویروسی کله زرد، بیماری ویروسی سندروم تورآ، بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم، بیماری باکیولوویروس مونودن، بیماری نکروز عفونی عضلات، بیماری ویروسی هپاتوپانکراس، بیماری انگلی

---

1 -*Parvoviridae*
2 -*Picornaviridae*
3 -*Nidovirales*
4-Infectious Hypodermal and ematopoietic Necrosis Virus (IHHNV)
5-Yellow Head Virus (YHV)
6-MonodonBaculovirus (MBV)
7-Infection Myonecrosis Virus (IMNV)
8 -Hepatopancratic Virus (HPV)
9 -Specific pathogen-free (SPF)
10 -Specific pathogen-resistance (SPR)
11 -*Fenneropenaeus chinensis*

میکروسپوریده، گری گارین‌ها و هاپلوسپوریده‌ها تولید می‌شوند، امروزه استفاده از پست لاروهای منتج شده از این میگوها توصیه می‌شود (Pruder *et al*., 1995; Lotz, 1997; Fegan & Clifford, 2001).

لیکن با توجه به اینکه میگوی سفید غربی به عنوان یک گونه غیر بومی در کشور محسوب می‌شود و همواره این احتمال وجود دارد که واردات بدون برنامه مولدین این گونه به کشور ممکن است با شیوع بیماری‌های نوظهور همراه شود. از این رو با ارائه یک راهکار مناسب می‌توان با فراهم آوردن ملزومات تولید میگوهای عاری از عوامل بیماریزا از جمله رعایت اقدامات ایمنی زیستی با به گزینی و انتخاب پیش مولدین پرورشی جمعیت‌های مختلف موجود در کشور میگوهای عاری از عوامل بیماریزاتولید نمود. لذا با توجه به دستورالعمل ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام (OIE) مهم‌ترین بیماری‌های لیست شده در میگوهای سفید غربی عاری از عوامل بیماریزا عبارت‌اند از بیماری ویروسی لکه سفید، بیماری ویروسی کله زرد، بیماری ویروسی سندروم تورآ، بیماری نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم، بیماری نکروز عفونی عضلات، بیماری ویروسی باکلوویروس پنائی[1] و بیماری نکروز عفونی بافت خونساز می‌باشد. لذا علاوه بر بیماری‌های فوق بیماری‌های شایع در منطقه نیز توسط روش مولکولی PCR مورد بررسی قرار گرفت. لیکن در این مطالعه در ابتدا باآماده سازی مرکز تولید میگوی عاری از عوامل بیماریزا همراه تدوین دستورالعمل‌های ایمنی زیستی اقدام به شناسایی و جمع آوری ذخیره‌های پیش مولدین نسل صفر از جمعیت‌های مختلف میگوی سفیدغربی در مزارع پرورشی کشور براساس تاریخچه ورود و آزمایشات مولکولی ریزماهواره ای[2] نموده شد.

1 -Baculovirus Penaei
2 -Microsatellite

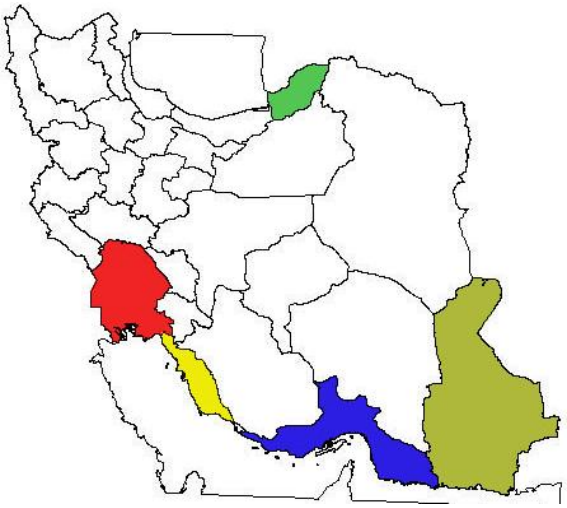
۲- مواد و روش کار

۲-۱- بررسی تاریخچه واردات مولدین سفیدغربی به کشور

بمنظور دستیابی به اطلاعات مربوط به تاریخچه مولدین میگوی سفید غربی در ابتدا با مراجعه به ادارات کل شیلات استان‌های بوشهر، خوزستان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان و گلستان اطلاعات کاملی از تعداد مولدین وارداتی میگوهای سفید غربی به کشور و منشاء آن‌ها حاصل شد. براساس اطلاعات موجود مشاهده شد که میگوهای سفید غربی در جهان از چهار مرکز انستیو اوشنیک[1]، مرکز آبزی پروری های هلث[2]، سواحل دریایی کاناباى[3] و مزارع پرورشی مولوکائی[4] منشاء گرفته‌اند.

۲-۲- شناسایی مراکز تکثیر پرورش میگوی سفید غربی در کشور

بر اساس اطلاعات موجود از تعداد مراکز تکثیر فعال و سایت‌های پرورش میگوی فعال در استان‌های فوق اطلاع حاصل شد(شکل ۱).



شکل ۱: استان‌های فعال در زمینه پرورش میگو در سطح کشور

1 -The Oceanic Institute (OI)
2 -High Health Aquaculture Inc.
3 -Kona Bay Marine Resources (now IAI Co.)
4 -Molokai Sea Farms

۳-۲- تاریخچه ورود مولدین وارده شده به کشور

با توجه به اطلاعات بدست آمده مشاهده شد که مولدین میگوی سفید غربی از سال ۸۶ تا سال ۸۹ توسط بخش خصوصی وارد کشور شده است. این مولدین از مناطق مختلفی از جمله دانشگاه هلونولو واقع در منطقه هاوائی، سواحل کانابای، سواحل مولوکای و میگوهای های‌هلث مرکز انستیتو Oceanic وارد کشور شده بودند، که آخرین محموله وادرادتی میگو مربوط به میگوهای های هلث مرکز سفید برفی واقع در جزیره قشم بود که توسط آقای جمالی در سال ۸۹ وارد کشور شده بود.

گفتنی است که در طی سال ۹۰ و ۹۱ مراکز تکثیر میگوی کشور، مولدین خود را از مولدین جمع آوری شده از مراکز پرورش بویژه در استان‌های بوشهر و هرمزگان تأمین نموده بودند لذا با آگاهی از این موضوع و ترسیم تاریخچه مولدین مراکز تکثیر اقدام به انتخاب مراکز پرورش میگو جهت تهیه و جمع آوری پیش مولد نموده شد (جدول ۱).

جدول ۱: تاریخچه و منشاء ورود مولدین میگوی سفید غربی به کشور

استان	مرکزتکثیر	سال	منشاء		
بوشهر	رنگین کمان	۱۳۹۰	مولوکائی (نسل دوم)	مولوکائی (نسل سوم)	مولوکائی (نسل چهارم)
		۱۳۹۱	مولوکائی		
	زاد آوری مند، ارغوان میگو	۱۳۸۹	های هلث (نسل اول)		
		۱۳۹۰	های هلث (نسل دوم)		
		۱۳۹۱	های هلث (نسل سوم)		
	یاسین میگو	۱۳۹۰	مولوکائی (نسل سوم)	های هلث (نسل دوم)	
		۱۳۹۱	ترکیبی مولوکائی و های هلث		
هرمزگان (قشم)	سفید برفی	۱۳۸۹	های هلث (نسل اول)		
		۱۳۹۰	های هلث (نسل دوم)		
		۱۳۹۱	های هلث (نسل سوم)		

۴-۲- تعیین مراکز پرورش میگو

بر اساس اطلاعات بدست آمده از مراکز تکثیر میگو پس از رهگیری پست لاروهای فروخته شده به مراکز پرورش، انتخاب مراکز پرورش براساس نوع منشاء پست لاروها نمونه‌گیری از بافت عضلانی میگوهای پرورشی انجام شد (جدول ۲).

۲-۵- انتخاب مراکز پرورشی

با توجه به منشاء مولدین مراکز تکثیر فوق و همچنین بمنظور دستیابی به جمعیت‌های مختلف لیست کاملی از مراکز پرورش دهنده میگوها با منشاء های مختلف بمنظور جمع آوری پیش مولد تهیه گردید. لذا با توجه به نوع مدیریت و همچنین میزان رشد و بازماندگی میگوهای پرورش داده شده از میان مراکز فوق تنها سه مرکز بمنظور جمع آوری پیش مولد انتخاب شد (جدول ۲). و نوع مدیریت بکار رفته به منظور به‌گزینی جمعیت‌های مختلف میگوی نسل صفر عاری از بیماری خاص صورت پذیرفت (جدول ۳).

جدول ۲: انتخاب مراکز پرورش میگوی سفید غربی با توجه به منشاء مولدین

ردیف	سایت پرورشی	مزرعه	منشاء مولدین
۱	حله	تعاونی ۲۷۲	High Health
۲	بندر ریگ	تعاونی ۶۷۸	Molokai
۳	دلوار ۱۴	یاسین میگو	Mix

جدول ۳: میانگین وزن و شاخص‌های مرتبط با پرورش پیش مولدین نمونه گیری شده از مزارع مختلف پرورشی

مزرعه	موقعیت	شوری	مساحت استخر (هکتار)	درصد بازماندگی	ضریب تبدیل غذایی	میزان برداشت از هر هکتار (تن)	تراکم ذخیره سازی در هکتار	مدت پرورش (روز)	میانگین وزن (گرم)
یاسین میگو	دلوار ۱۴	۴۲	۲	۸۵	۱/۲	۱۴	۶۰۰	۱۵۰	۲۴
گروه ۶۷۸	بندر ریگ	۵۲	۱/۴	۹۸	۱/۶	۵/۲	۳۳۰	۱۵۰	۱۵
تعاونی ۲۷۲	حله	۴۷	۱/۳	۹۴	۱/۴	۴	۲۵۰	۱۴۰	۲۰

۲-۶- تعیین شاخص‌های ژنتیکی

۲-۶-۱- نمونه گیری از پیش مولدین نسل صفر (F_0)

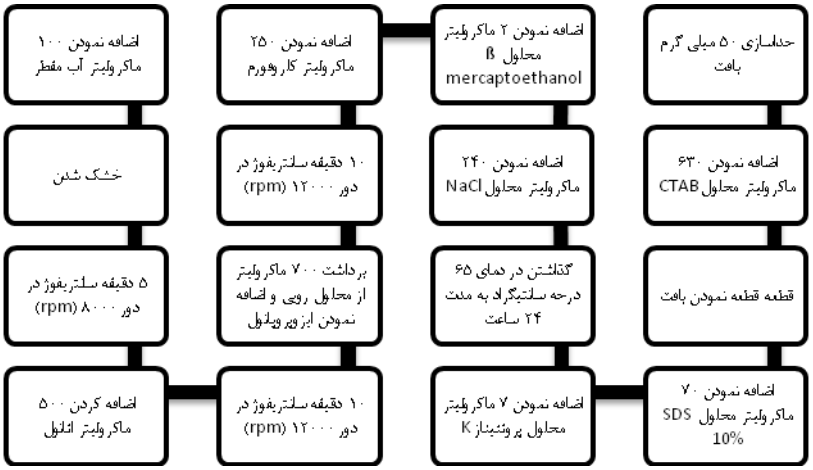
با توجه به اطلاعات حاصل از منشاء و تاریخچه ورود مولدین میگوی سفید غربی به کشور، در این مطالعه از اواخر خرداد تا اوایل شهریور ماه ۱۳۹۱ با انتخاب ۸ مرکز پرورش واقع در استان بوشهر از بافت عضلانی ۲۴۰ قطعه پیش مولد میگوی سفید غربی موجود در مراکز پرورش نمونه گیری صورت پذیرفت. بمنظور حفظ نمونه‌های بافتی، نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در الکل ۹۶ درجه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Tamayo, 2006) (شکل ۲).

شکل ۲: نمونه گیری از بافت عضله میگوهای پرورشی مراکز پرورش و نگهداری در الکل ۹۶ درجه

۲-۶-۲- استخراج ماده ژنتیکی DNA

در این مطالعه بمنظور استخراج ماده ژنتیکی DNA از روش CTAB استفاده شد. روش کار بدین صورت بود که بعد از جدا سازی ۵۰ میلی گرم از بافت عضله میگو و قرار دادن آن در میکروتیوب های ۱/۵ میلی‌لیتر بمنظور هضم بافت از ۶۳۰ میکرولیتر محلول CTAB، ۷۰ میکرولیتر محلول SDS 10% و ۷ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K استفاده شد. در ادامه پس از گذشت یک شبانه روز به هر کدام از نمونه‌ها ۲۴۰ میکرولیتر محلول NaCl همراه با ۲ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول و ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد که بعد از ته نشین نمودن DNA نمونه‌ها و شستشوی آن‌ها توسط اتانول به هر کدام از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی دوبار تقطیر اضافه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد (Valles-Jimenez *et al.*, 2004) شکل ۳، نمودار ۱).

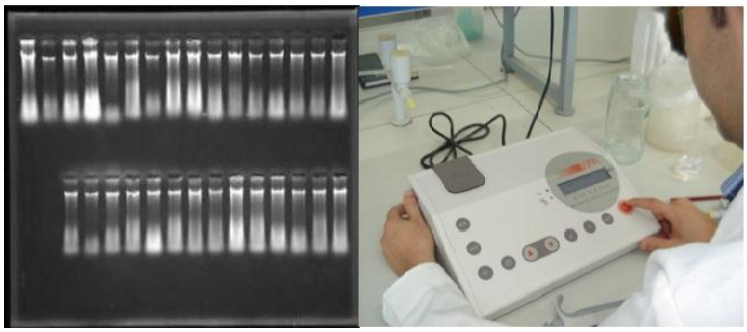
شکل ۳: خرد کردن و هموژنیزه نمودن بافت عضلانی میگوها



نمودار ۱: مراحل استخراج ماده ژنتیکی DNA از طریق روش CTAB

۳-۶-۲- تعیین کیفیت و کمیت ماده ژنتیکی استخراج شده

بمنظور تعیین کیفیت DNA های استخراج شده بعد از انتقال ماده ژنتیکی DNA به ژل آگاروز ۱ درصد با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی کلور براساس وجود یا عدم وجود باند و شارپ بودن آن کیفیت DNA ها تعیین گردید. همچنین بمنظور تعیین کمیت DNA از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل *WFA 1101* در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و معادله $\frac{۲۶۰}{۲۸۰}$ میزان کمیت ماده ژنتیکی تعیین شد (Soto-Hernandez & Grijalva-Chon, 2005) (شکل ۴).



شکل ۴: تعیین کمیت و کیفیت DNA نمونه‌های استخراج شده

۴-۶-۲- تکثیر توالی‌های تکرار شونده DNA (میکروستلایت[1])

تکثیر توالی‌های تکراری DNA های نمونه‌های استخراج شده از طریق تکنیک PCR[2] با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی پلی مورفیک میگوی سفید غربی ساخته شده توسط شرکت متابیون آلمان به سفارش شرکت سهامی خاص روبین طب صورت پذیرفت (Cruz *et al*., 2004; Freitas *et al*., 2007) (جدول ۴).

جدول ۴: توالی آغازگرهای استفاده شده در تکثیر توالی‌های تکراری (Microsatellite) میگوهای سفید غربی (*L. vannamei*)

آغازگر	توالی اسیدهای نوکلئوتید (′۵ ← ′۳)	سایز (bp)
Lvan01 (Freitas *et al*.,2007)	F: GCCATAAACGCAAGACTGAG R: GCAGGTATACGGTCATGTGTA	136-146
Lvan07 (Freitas *et al*.,2007)	F: AAAGAGGAAGATGAGGAAG R: CCTCGGTTACGTATTTATTG	189-223
Pvan0013 (Cruz *et al*., 2002)	F: TGCTCTGGTAACGACAAACG R: AGACCTGTGGCGAAGTGC	276-284
Pvan1758 (Cruz *et al*., 2002)	F: TATGCTCGTTCCCTTTGCTT R: TTGAAGGAAAAGTGTTGGGG	163-189
Pvan1815 (Cruz *et al*., 2002)	F: GATCATTCGCCCCTCTTTTT R: ATCTACGGTTCGAGAGCAGA	126-141
TUMXLv5.27 (Meehan *et al*., 2003)	F: CAGACCCTAAATCTCCGTGC R: TGGAAAGGTCAGAGGTCACG	166-182
TUMXLv5.38 (Meehan *et al*., 2003)	F: CCTTTATGACTTCCCCCGAC R: CCGTACAGAAACGGAACGTC	200-222
TUMXLv8.32 (Meehan *et al*., 2003)	F: TTACCGCCTAAGAGCGAATG R: TGTCCTTTCGTACCAGTCAAG	216-228
TUMXLv8.2 (Meehan *et al*., 2003)	F: TTACCGCCTAAGAGCGAATG R: TGTCCTTTCGTACCAGTCAAG	230-248

بمنظور تکثیر توالی‌های تکرار شونده DNA روش کار بدین صورت بود که محصول PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر مشتمل بر ۲ میکرولیتر (PCR Buffer)، ۱ میکرولیتر ($Mg\ Cl_2$)، ۰/۷ میکرولیتر (dNTP)، ۱ میکرولیتر (پرایمر پیشرو)، ۱ میکرولیتر (پرایمر معکوس)، ۰/۳ میکرولیتر (Taq DNA)، ۱۳ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر و ۱ میکرولیتر DNA نمونه تهیه شد (Freitas & Galetti Junior, 2002).

۵-۶-۲- تکثیر جایگاه‌ها در دستگاه ترموسایکلر

در این مطالعه از دستگاه ترموسایکلر مدل Corrbet جهت تکثیر توالی‌های تکرار شونده DNA استفاده شد. تکثیر جایگاه‌ها توسط دستگاه ترموسایکلر از سه مرحله تشکیل شده بود، بدین صورت بود که مرحله اول شامل واسرشت شدن اولیه[3] در درجه حرارت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه برای یک چرخه، مرحله دوم شامل

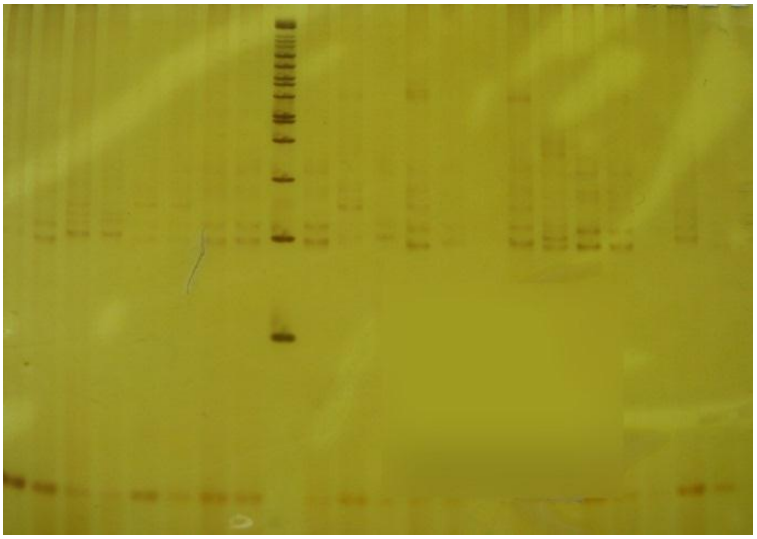
1-Microsatellite
2-polymerase chain reaction
3-Pre denature

واسرشت شدن[1] در ۹۴ درجه سانتیگراد، اتصال به قطعه هدف[2] در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد و بسط شدن[3] در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه برای ۳۰ چرخه تنظیم گردید. در انتها بسط نهایی[4] در درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در یک چرخه صورت پذیرفت.

در ادامه بعد از تزریق ۵ میکرولیتر محصول PCR به درون چاهک‌های ایجاد شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد همراه با نشانگر استاندارد[5] bp ۳۰۰۰–۱۰۰، پس از ران نمودن دستگاه الکتروفورز عمودی مدل کلور به مدت ۲ ساعت ۳۰ دقیقه، و رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با نیترات نقره ۱ درصد، طول هر باند با توجه به طول نشانگر استاندار محاسبه شد (Borrell *et al*., 2004) (شکل ۵ و شکل ۶)

شکل ۵: تزریق محصول PCR بر روی ژل آکریل آمید دستگاه الکتروفورز عمودی کلور

1-Denature
2-Anneealing
3-Extraction
4-Final Extraction
5 -Marker



شکل ۶: باندهای تشکیل شده بر روی ژل آکریل آمید

تجزیه و تحلیل شاخص‌های ژنتیکی جمعیت‌ها در جایگاه‌های میکروستلایت

با استفاده از نرم افزار Gene Alex (ver. 6) و POPGENE (ver 3.1) برای هر جایگاه مقادیر فراوانی آلل های مؤثر و واقعی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، ماتریکس شباهت و فاصله ژنتیکی (Nei, 1978)، تعادل هاردی–واینبرگ، تفاوت ژنتیکی (F_{st})، جریان ژنی، ضریب هم خونی (F_{is}) تعیین شد (Peakall & Smouse, 2006). همچنین درخت موضع شناسی تکاملی بین نمونه‌ها براساس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم افزار TFPGA ترسیم گردید.

۷-۲- شناسایی عوامل بیمایزای میگوهای پرورشی مزارع انتخاب شده

۱-۷-۲- شناسایی عوامل بیمایزای ویروسی

در این مطالعه بمنظور شناسایی عوامل بیماریزای ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی از روش‌های آزمایشگاهی استفاده شد. بدین منظور با همکاری آزمایشگاه مرکز تشخیص بیماری‌های میگوی وابسته به اداره کل دامپزشکی استان بوشهر برای شناسایی عوامل بیماریزای ویروسی بیماری لکه سفید، کله زرد، سندروم تورآ، نکروز عفونی بافت خونساز و هیپودرم، نکروز عفونی عضلات، باکیولوویروس مونودن، بیماری ویروسی هپاتوپانکراس و بیماری باکتریایی نکروز عفونی هپاتوپانکراس از کیت تجاری تشخیص مولکولی IQ-2000 ساخت کشور تایوان استفاده شد. روش کار بسته به نمونه بافتی اخذ شده از میگوها متفاوت بود (افشار نسب، ۱۳۸۶).

پلئوپود، پروپودآ، دم و آبشش میگوهای بالغ

پس از نمونه گیری ۲۰ میلی‌گرم از نمونه بافتی را در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری، حاوی ۰/۶ میلی‌لیتر محلول DTAB قرار داده سپس با استفاده از آسیابک نمونه‌ها خرد و له گردیدند.

فرآیند استخراج DNA براساس روش DTAB–CTAB

بعد از آماده سازی نمونه‌های فوق، محلول مورد نظر در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد سپس در دمای اتاق سرد گردید.

در این مرحله با استفاده از ورتکس محتویات به شدت مخلوط شدند. پس از افزودن ۰/۷ میلی‌لیتر کلروفروم به هر کدام از میکروتیوب‌ها مجدداً به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس و در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند.

در ادامه با برداشت ۲۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی و انتقال آن به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری به هر کدام از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول CTAB و ۹۰۰ میکرولیتر از آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد که بعد از مخلوط شدن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت بعد از خنک شدن در دمای اتاق سانتریفوژ آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه صورت پذیرفت.

بعد از حذف فاز رویی با اضافه نمودن محلول حلال، پلت کف مجدداً بصورت سوسپانسیون در آورده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و در نهایت در دمای اتاق سرد شد.

در این مرحله محتویات میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند سپس محلول شفاف به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد منتقل شد.

بعد از مخلوط نمودن آن‌ها مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیدند سپس پلت باقی مانده را با ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شسته و بعد از خشک کردن آن‌ها در آب مقطر دوبار تقطیر حل گردیدند.

دستوالعمل تکثیر

بمنظور تکثیر از میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری استفاده شد.

آماده سازی معرف

تهیه مخلوط معرف First PCR که بصورت زیر صورت گرفت.

First PCR PreMix = 7.5 ul
IQzyme DNA polymerase (2U/ul) = 0.5 ul

تهیه مخلوط معرف Neste PCR که بصورت زیر انجام شد.

Nested PCR PreMix = 14 ul
IQzyme DNA polymerase (2U/ul) = 1 ul

شرایط واکنش

شمای واکنش First PCR

94℃ 2min; then, 94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30sec, repeat 15 cycles, then add 72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

شمای واکنش Nested PCR

94℃ 20 sec; 62℃ 20sec; 72℃ 30 sec, repeat 30 cycles, then add 72℃ 30 sec; 20℃ 30 sec at the end of the final cycle.

فرآیند واکنش

نکته قابل ذکر اینکه در این مطالعه برای هر مخلوط تهیه شده سه نمونه استاندارد کنترل مثبت (10^3، 10^2 و 10^1) و یک نمونه استاندارد کنترل منفی (tRNA مخمر یا آب مقطر دوبار تقطیر) در نظر گرفته شد.

با استفاده از پیپت، ۸ میکرولیتر از محلول First PCR به داخل هر یک از میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته شد.

اضافه نمودن ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده به هر کدام از لوله‌ها

پوشاندن لوله‌ها توسط ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی

انجام واکنش First PCR

بعد از اتمام واکنش First PCR ۱۵ میکرولیتر از محلول Nested PCR به هر کدام از لوله‌ها اضافه شد.

انجام واکنش Nested PCR

بعد از اتمام واکنش Nested PCR، ۵ میکرولیتر از 6X loading dye به هر کدام از لوله‌ها اضافه شد و به خوبی مخلوط گردیدند.

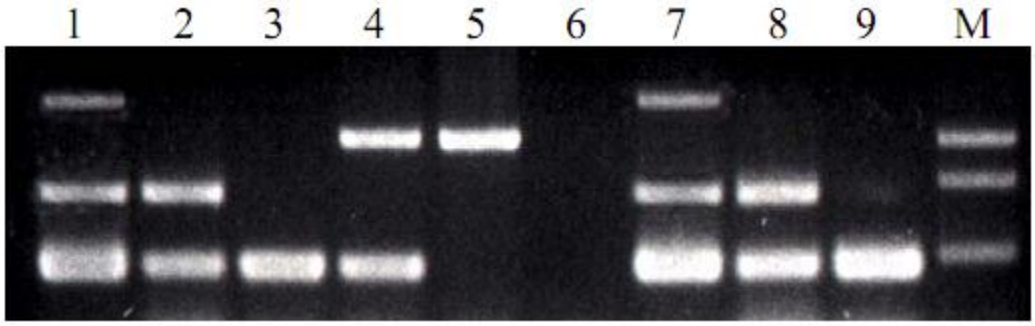
بعد از مخلوط نمودن آن‌ها نمونه‌ها جهت قرائت در دستگاه الکتروفورز آماده شدند.

۸-۲- آنالیز نتایج در دستگاه ژل الکتروفورز

برای مشاهده محصول PCR از دستگاه الکتروفورز افقی همراه با ژل آگاروز ۱/۵ درصد در ولتاژ ۱۱۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. از آنجا که قطعات DNA دارای بار منفی می‌باشند لذا پس از روشن شدن دستگاه قطعات DNA به طرف قطب مثبت کشیده شدند. در ادامه رنگ آمیزی ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه بطول انجامید که در نهایت پس از شستشوی کامل رنگ‌ها توسط آب مقطر ژل‌ها توسط نور ماوراء بنفش با استفاده از دستگاه ژل داک مدل BIO Rad مورد بررسی قرار گرفتند.

۱-۸-۲- روش تشخیص

تشخیص باندهای ظاهر شده براساس دستورالعمل همراه کیت IQ2000 صورت پذیرفت که دستورالعمل برای هر کدام از بیماری‌ها کاملاً متفاوت بود (شکل ۷).



شکل ۷: اشکال حاصل از نمونه‌های مثبت بیماری ویروسی لکه سفید تشکیل شده برروی ژل الکتروفورز

باند ۱: نمونه‌هایی که آلودگی شدید دارند.

باند ۲: نمونه‌هایی که آلودگی متوسط دارند.

باند ۳: نمونه‌هایی که آلودگی خفیف دارند.

باند ۴: نمونه‌هایی که آلودگی خیلی خفیف دارند.

باند ۵: نمونه‌های منفی

باند ۶: کنترل منفی (tRNA مخمر یا ddH_2O)

باند ۷: نمونه‌های استاندارد کنترل مثبت ویروس WSSV با ۲۰۰۰ copies/reaction.

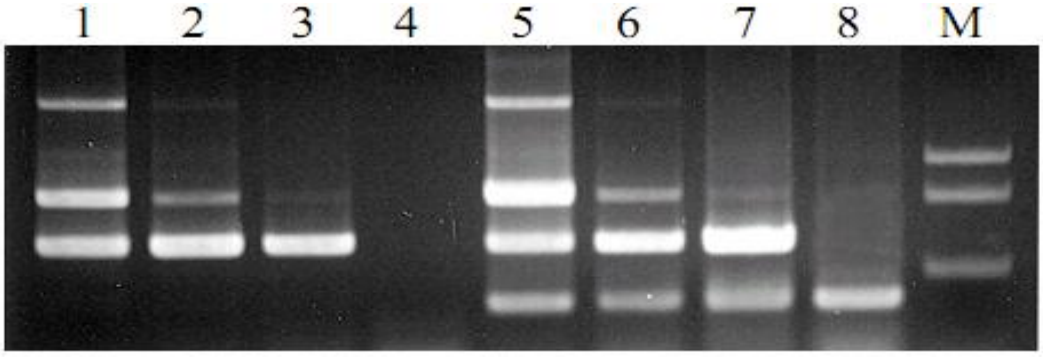
باند ۸: نمونه‌های استاندارد کنترل مثبت ویروس WSSV با ۲۰۰ copies/reaction.

باند ۹: نمونه‌های استاندارد کنترل مثبت ویروس WSSV با ۲۰ copies/reaction.

باند M: نشانگر وزن مولکولی DNA، ۸۴۸ bp، ۶۳۰ bp، ۳۳۳ bp

نمونه‌های منفی تنها یک باند در ۸۴۸ bp تشکیل می‌دهند

از این رو باندهای تشکیل شده در bp ۲۹۶ و یا bp ۵۵۰ مثبت و باند تشکیل شده در محدوده bp ۸۴۸ منفی بودند (شکل ۸).



شکل ۸: اشکال حاصل از نمونه‌های مثبت بیماری ویروسی IHHNV تشکیل شده برروی ژل الکتروفورز

باند ۱: نمونه‌های استاندارد کنترل مثبت ویروس WSSV با ۲۰۰۰۰ copies/reaction.
باند ۲: نمونه‌های استاندارد کنترل مثبت ویروس WSSV با ۲۰۰۰ copies/reaction.
باند ۳: نمونه‌های استاندارد کنترل مثبت ویروس WSSV با ۲۰ copies/reaction.
باند ۴: کنترل منفی (tRNA مخمر یا ddH_2O)
نمونه‌هایی که آلودگی خیلی خفیف دارند.
باند ۵: نمونه‌هایی که آلودگی شدید دارند
باند ۶: نمونه‌هایی که آلودگی متوسط دارند
باند ۷: نمونه‌هایی که آلودگی خفیف دارند
باند ۸: نمونه‌های منفی
باند ۹: باند M: نشانگر وزن مولکولی DNA، ۸۴۸ bp، ۶۳۰ bp، ۳۳۳ bp
گفتنی است که نمونه‌های منفی تنها یک باند در ۲۴۳ bp تشکیل می‌دهند ولی باندهای تشکیل شده در ۴۳۸ bp و یا ۶۴۴ bp مثبت می‌باشند.

۹-۲- شناسایی عوامل بیمایزای باکتریایی

شایان ذکر است که بمنظور شناسایی عوامل باکتریایی پس از نمونه گیری از آب محیط پرورش و همولنف پیش مولدین مراکز انتخاب شده و کشت آن بر روی محیط کشت تریپتیک سویل آگار (TSA[1]) و محیط TCBS[2] تعداد کلی سلول‌های باکتریایی و در صورت مشاهده تعداد سلول‌های ویبریو شمارش شدند. همچنین جهت شناسایی عوامل قارچی از محیط کشت سابروز دکستروز آگار (SDA[3]) و پتیتو دکستروز آگار (PDA[4]) استفاده شد (Saulnier *et al.*, 2000).

1 -Tryptone Soya Agar
2 -Thiosulfate citrate bile salt sucrose Agar
3 -Sabouraud Dextrose Agar
4 -Potato Dextrose Agar

۲-۱۰- شناسایی عوامل بیمایزای انگلی

شناسایی عوامل بیماریزای انگلی همانند گریگارین‌ها و انگل تک یاخته میکروسپوریده بر اساس علائم بالینی همراه با تهیه مقاطع بافتی از میگوهای پرورشی رنگ آمیزی شده توسط هماتوکسین و ائوزین صورت گرفت (افشار نسب، ۱۳۸۶؛ Lightner, 1996).

۲-۱۱- انتخاب مزارع پرورش میگو سفید غربی

در این مطالعه انتخاب مزارع پرورش میگو، براساس اطلاعات حاصل از بررسی تاریخچه ورود مولدین به داخل کشور، نتایج حاصل از مطالعات مولکولی، آزمایشات بیماری شناسی، عدم شیوع بیماری در سابقه مزارع پرورشی، مدیریت مزارع پرورشی، میانگین وزن و طول میگوهای پرورشی، میزان بازماندگی و ضریب تبدیل غذایی پیش مولدین صورت پذیرفت. با این وجود بمنظور جلوگیری از حذف برخی از مزارع هدف در صورت مثبت بودن نتایج حاصل از شناسایی عوامل بیماریزا سعی شد که تعداد مزارع مورد بررسی بیشتر از حد مورد نیاز باشد.

۲-۱۲- آماده سازی ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه

۲-۱۲-۱- آماده سازی سالن قرنطینه

در این مطالعه آماده سازی سالن قرنطینه ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه براساس دستورالعمل ایمنی زیستی ارائه شده توسط سازمان بهداشت جهانی دام [1] صورت پذیرفت. از این رو دستورالعمل‌های ایمنی زیستی بصورت تابلوهای هشدار در محل‌های ورودی سالن قرنطینه نصب شدند (شکل ۹). بدین منظور با احداث حوضچه ضدعفونی در ورودی ایستگاه، ضدعفونی خودروهای ورودی توسط ماده ضدعفونی کننده هیپوکلریت کلسیم با درصد خلوص ۷۵ به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر صورت گرفت. از سوی دیگر با نصب روشوئی و جایگاه تعویض لباس و احداث حوضچه‌های ضدعفونی در ورودی‌های منتهی به سالن قرنطینه، از ورود هرگونه عامل بیماریزای ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی به سالن قرنطینه جلوگیری به عمل آمد (Lightner, 2005) (شکل ۱۰).

1 -OIE

شکل ۹: نصب تابلوهای هشدار در محل ورودهای منتهی به سالن قرنطینه

شکل ۱۰: ضدعفونی خودروهای ورودی به محوطه

همچنین بمنظور جلوگیری از ورود حشرات و سایر موجودات موزی تمامی پنجره‌های سالن توسط توری با چشمه ۵۰۰ میلی‌متر پوشانده شدند. از سوی دیگر قبل ورود به سالن قرنطینه بمنظور افزایش سطح ایمنی، کلیه پرسنل شاغل در سالن قرنطینه با عبور از حوضچه ضد عفونی حاوی محلول هیپوکلریت کلسیم با درصد خلوص ۷۵ به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر با پوشیدن لباس یکبار مصرف، چکمه و ضدعفونی دست‌ها با استفاده از مواد شوینده و بتادین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از ورود و خروج هرگونه عامل بیماریزا به سالن قزنطینه جلوگیری به عمل آمد (شکل ۱۱).

شکل ۱۱: رعایت مسائل مربوط به ایمنی زیستی در ورودهای سالن قرنطینه

۲-۱۲-۲- آماده سازی تانک‌های نگهداری پیش مولدین

در این مطالعه بمنظور نگهداری پیش مولدین نسل صفر در سالن قرنطینه از تانک‌های چهار تنی فایبرگلاس استفاده شد. از این رو بعد از شستشو و ضدعفونی تانک‌های فایبرگلاس توسط مواد شوینده (دترجنت) و ضدعفونی کننده (هیپوکلریت پتاسیم)، هوادهی تانک‌ها با استفاده از شلنگ و سنگ‌های هوا صورت پذیرفت (Pruder, 2004) (شکل ۱۲و شکل ۱۳).

شکل ۱۲: تعبیه تانک‌های نگهداری مولدین در سالن قرنطینه

شکل ۱۳: آماده سازی تانک‌های نگهداری مولدین در سالن قرنطینه

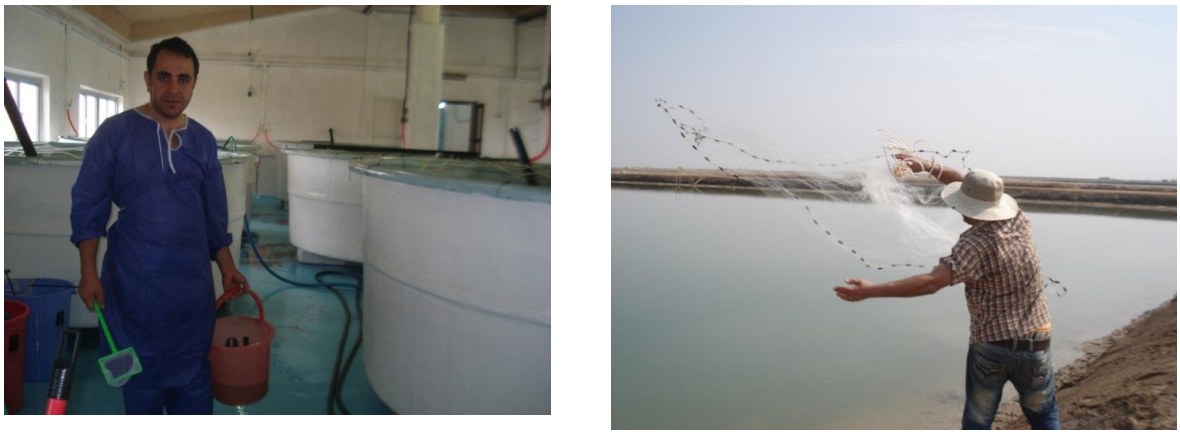
۳-۱۲-۲- تعبیه سیستم سرمایش و گرمایش

با توجه به محصور بودن سالن قرنطینه جهت تأمین هوای گرم و سرد و جلوگیری از ورود و خروج عوامل بیماریزای ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی به داخل و خارج سالن قرنطینه به ترتیب از دستگاه گرمایش شوفاژ هوای گرم مدل انرژی و کولر گازی اسپیلت ۳۰۰۰۰ مدل LG استفاده شد. از این رو سعی شد درجه حرارت سالن در طول مدت نگهداری پیش مولدین در سالن قرنطینه در محدوده دمایی ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردد.

۴-۱۲-۲- انتقال پیش مولدین از مراکز پرورش به سالن قرنطینه

براساس داده‌های حاصل از مطالعات مولکولی برحسب وجود جمعیت‌های مختلف و با توجه به نتایج حاصل از شناسایی عوامل بیمایزا و با اطلاع از عاری بودن پیش مولدین از عوامل بیمایزای ذکر شده از مورخه ۱۳۹۱/۰۷/۱۷ لغایت ۱۳۹۱/۰۸/۰۳ اقدام به انتقال ۲۳۸۳ قطعه پیش مولدین از مراکز پرورش به سالن قرنطینه نموده شد. شایان ذکر است که انتقال پیش مولدین به سالن قرنطینه براساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی دام با رعایت کلیه اصول ایمنی زیستی صورت پذیرفت. بدین منظور جهت انتقال پیش مولدین از مزارع پرورشی به سالن قرنطینه از آب ضدعفونی شده توسط هیپوکلریت کلسیم (۷۵ درصد) به میزان ۲۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. از این رو قبل از ذخیره سازی پیش مولدین در تانک‌های فایبرگلاس سالن قرنطینه ضدعفونی آن‌ها توسط محلول بتادین به میزان ۴۰ قسمت در میلیون صورت گرفت (شکل ۱۴). گفتنی است که در طول مدت زمان نگهداری پیش مولدین در سالن قرنطینه کلیه وسایل هر کدام از تانک‌های فایبرگلاس بصورت جداگانه تعبیه و مورد استفاده مورد قرار گرفت. همچنین برای هر کدام از تانک‌های از دو سطل یکی حاوی ماده ضدعفونی کننده بتادین و دیگر حاوی آب ضدعفونی شده بمنظور آب کشی وسایل بصورت جداگانه استفاده شد. ازاین رو بعد از استفاده از ساچوک، شلنگ‌های تعویض آب و سایر اداوات مربوط به هر تانک، سریعاً

توسط ماده ضدعفونی کننده بتادین (۴۰ قسمت در هزار) ضدعفونی و آب کشی صورت می‌گرفت (Sedhuraman *et al*., 2014) (شکل ۱۵).



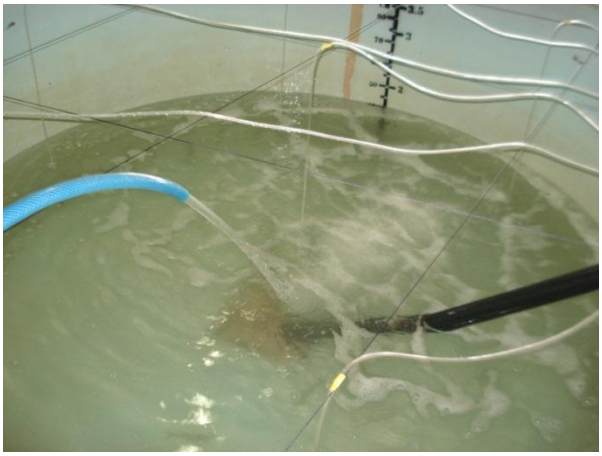
شکل ۱۴: جمع آوری پیش مولدین از مزارع پرورش میگو و ذخیره سازی آن‌ها در تانک‌های مستقر در سالن قرنطینه

شکل ۱۵: استفاده از وسایل جداگانه برای هر تانک و ضد عفونی آن‌ها

۵-۱۲-۲- نگهداری پیش مولدین در سالن قرنطینه

از آنجا که این امکان می‌تواند وجود داشته باشد که مولدین جمع آوری شده بصورت ناقل عمل نموده و برخی از عوامل بیماریزا بصورت نهفته همراه با پیش مولدین بدون علامت منتقل شوند. در این مطالعه سعی شد تا بمنظور جلوگیری از انتقال عوامل بیماریزای به سالن نگهداری میگوهای عاری از بیماری خاص، پیش مولدین جمعیت‌های مختلف منتقل شده، به مدت یک ماه در شرایط کاملاً کنترل شده بصورت جداگانه در تانک‌های

چهار تنی فایبرگلاس در سالن قرنطینه نگهداری شوند. از این رو در طول این مدت علاوه بر رعایت کلیه موارد مربوط به ایمنی زیستی با جداسازی وسایل و ادوات مربوط به هر تانک از انتقال عوامل بیماریزای احتمالی بین پیش مولدین ذخیره سازی شده در تانک‌ها جلوگیری به عمل آمد. همچنین تغذیه پیش مولدین توسط غذای کنسانتره مرحله رشد شرکت هوورراش (۴۰۰۶) به میزان ۲-۱ درصد وزن بدن صورت پذیرفت (Van Wyk *et al.*, 1999) (شکل ۱۶).



شکل ۱۶: شستشو و تعویض آب تانک‌های نگهداری پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه

شایان ذکر است که در طول این مدت با نمونه گیری هفتگی از غذا، آب محل نگهداری، همولنف و بافت پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه با استفاده از روش‌های مولکولی، باکتریایی و شیمیایی وجود عوامل بیماریزا باکتریایی، ویروسی، قارچی و انگلی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین بمنظور اندازه‌گیری نوترینت های سمی موجود در آب از قبیل آمونیاک، نیتریت و نیترات از دستگاه Genway مدل ۶۶۰۰ استفاده شد. شایان ذکر است که در صورت مشاهده موارد مشکوک و یا مثبت در طول نگهداری پیش مولدین در سالن قرنطینه علاوه بر ضبط و معدوم سازی آن‌ها اطلاع رسانی مراجع ذی صلاح نیز صورت می‌گرفت.

۱۳-۲- سنجش میانگین وزن و طول

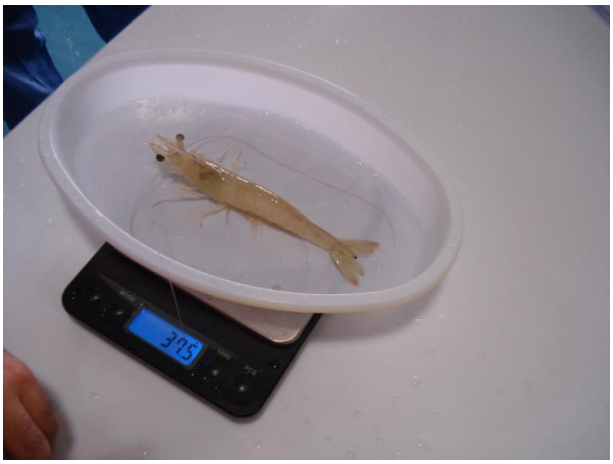
در این مطالعه با سنجش میزان وزن و طول پیش مولدین جمع آوری شده از مراکز پرورش انتخاب شده قبل و بعد از ذخیره سازی در سالن قرنطینه ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه میانگین وزن و طول آن‌ها بر اساس معادلات ۱ و ۲ محاسبه گردید(شکل ۱۷).

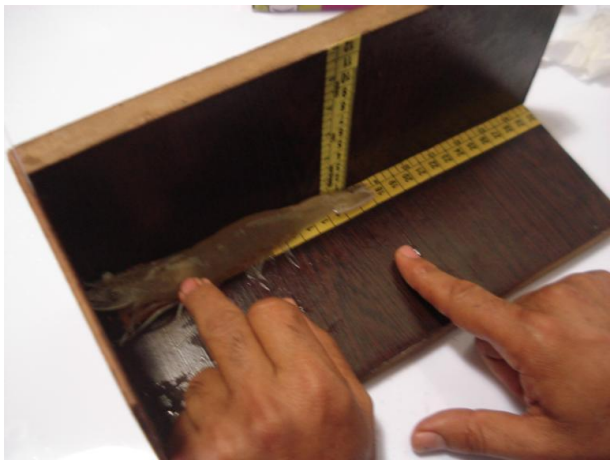
$$\text{میانگین وزن} = \frac{(W_1) + (W_2) + (W_3) + \cdots}{\text{تعداد میگوهای سنجش شده}}$$

معادله ۱: تعیین میانگین وزن پیش مولدین جمعیت‌های مختلف

$$\text{میانگین طول} = \frac{(L_1) + (L_2) + (L_3) + \cdots}{\text{تعداد میگوهای سنجش شده}}$$

معادله ۲: تعیین میانگین طول پیش مولدین جمعیت‌های مختلف





شکل ۱۷: سنجش وزن و طول پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه

۲-۱۴- تعیین میزان بازماندگی پیش مولدین ذخیره سازی شده در سالن قرنطینه

بدین منظور در پایان مدت زمان نگهداری پیش مولدین جمعیت‌های مختلف در سالن قرنطینه با شمارش تعداد میگوهای باقی مانده درصد بازماندگی آن‌ها براساس معادله زیر محاسبه شد (معادله ۳).

$$\text{درصد بازماندگی} = \frac{\text{تعداد میگوهای بازمانده}}{\text{تعداد میگوهای ذخیره سازی شده}} \times ۱۰۰$$

معادله ۳: تعیین درصد بازماندگی پیش مولدین جمعیت‌های مختلف

۲-۱۵- سنجش فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب

در طول مدت مطالعه کلیه فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب از قبیل درجه حرارت آب، اکسیژن محلول در آب، شوری و pH به ترتیب با استفاده از اکسیژن سنج مدل WTW 300، pH متر مدل HACH و شوری سنج چشمی مدل ATAGO و نوترینت های آب از قبیل آمونیاک، نیتریت و نیترات با استفاده از دستگاه Genway مدل ۶۰۰۰ مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۱۸).

شکل ۱۸: اندازه گیری و ثبت فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب

۱۶-۲- تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده

در پایان مطالعه با استفاده از آزمون کلموگراف-اسمیرنوف نرمال نمودن پراکنش داده‌های حاصل از تعیین میانگین وزن، طول و درصد بازماندگی صورت پذیرفت. در ادامه توسط نرم افزار EXCEL 2010 و نرم افزار آماری SPSS (Ver:18) از طریق آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA با استفاده از آزمون Tukey`s و آنالیز t-test با سطح اطمینان ۹۵ درصد داده‌های بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

۳- نتایج

۱-۳- شاخص‌های ژنتیکی

۱-۱-۳- نتایج میزان تنوع ژنتیکی و فراوانی آلل ها

نتایج حاصل از بررسی میزان تنوع ژنتیکی میگوهای سفید غربی سه جمعیت مورد بررسی توسط هشت آغازگر اختصاصی میکروستلایت حاکی از این مطلب بود که دامنه هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) در جمعیت‌های ترکیبی، های هلث و مولوکائی به ترتیب ۰/۷-۰/۱۱، ۰/۸۵-۰/۱۶ و ۰/۹-۰/۲۱ بود. این در حالی بود که حداکثر و حداقل هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e) در جمعیت‌های فوق به ترتیب ۰/۸۵-۰/۴۳، ۰/۸۲-۰/۴۸ و ۰/۸۳-۰/۱۹ بود.

همچنین بیشترین تعداد آلل واقعی (N_a) مشاهده شده در جمعیت‌های ترکیبی، های هلث هر کدام ۹ و در جمعیت مولوکائی ۸ بود که همگی مربوط به جایگاه آغازگر Lava07 بود. از سوی دیگر مشاهده شد که دامنه آلل واقعی مشاهده شده در سه جمعیت مورد بررسی در فاصله ۹ – ۲ قرار داشت. در رابطه با آلل های مؤثر (N_e) نتایج نشان داد که حداکثر و حداقل آن در جمعیت ترکیبی، های هلث و مولوکائی به ترتیب ۵/۶-۱/۷۶، ۵/۵۵-۱/۹۳ و ۵/۸۸-۱/۲ می‌باشد.

همچنین نتایج حاصل بررسی آنالیز آماری داده‌های هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار حاکی از این مطلب بود که مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده در تمام جمعیت ترکیبی و های هلث بطور معنی داری کمتر از مقادیر مرتبط با هتروزیگوسیتی مورد انتظار می‌باشد ($P<0.05$). این در حالی بود که علیرغم کمتر بودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده نسبت به هتروزیگوسیتی مورد انتظار در جمعیت مولوکائی هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۵).

جدول ۵: مقادیر شاخص‌های ژنتیکی میگوهای جمعیت مختلف

جمعیت	آغازگر	میانگین
ترکیبی (Mix)	تعداد آلل واقعی (N_a)	۵/۱۲۵±۰/۶۹۳
	تعداد آلل مؤثر (N_e)	۳/۴۴۸±۰/۴۹۹
	هتروزگوسیتی مشاهده شده (H_o)	۰/۳۸۴±۰/۰۶۹
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e)	۰/۶۷۰±۰/۰۴۴
های هلث (H.H)	تعداد آلل واقعی (N_a)	۵/۳۷۵±۰/۷۳۰
	تعداد آلل مؤثر (N_e)	۳/۸۲۵±۰/۴۷۶
	هتروزگوسیتی مشاهده شده (H_o)	۰/۵۰۱±۰/۰۹۱
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e)	۰/۷۰۴±۰/۰۴۲
مولوکائی (M)	تعداد آلل واقعی (N_a)	۴/۳۷۵±۰/۶۸۰
	تعداد آلل مؤثر (N_e)	۳/۱۳۰±۰/۵۴۷
	هتروزگوسیتی مشاهده شده (H_o)	۰/۴۶۹±۰/۰۹۲
	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_e)	۰/۵۸۸±۰/۰۸۴

۲-۱-۳- میزان ضریب هم خونی (F_{is})

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از ضریب هم خونی نشان داد که میزان این ضریب در جمعیت‌های مورد بررسی به دلیل کاهش میزان تنوع ژنتیکی (هتروزیگوسیتی) مثبت می‌باشد. لیکن در جمعیت ترکیبی و های هلث به ترتیب در دو آغازگر Pvan0013 و TUMXLv 5.27 این میزان به دلیل افزایش میزان تنوع ژنتیکی منفی بود. این در حالی بود که در جمعیت مولوکائی این میزان در چهار آغازگر Pvan0013، Pvan 1815، TUMXLv 5.27 و TUMXLv 5.38 منفی بود (جدول ۶).

جدول ۶: مقادیر ضریب هم خونی (Fis) در جمعیت‌های ترکیبی، های هلث و مولوکائی

جمعیت	Lvan 01	Lvan 07	Pvan 0013	Pvan 1758	Pvan 1815	TUMXLv 5.27	TUMXLv 5.38	TUMXLv 8.32
ترکیبی	+۰/۶۹۹	+۰/۴۶۸	−۰/۰۳۷	+۰/۵۱۸	+۰/۵۴۵	+۰/۲۲۹	+۰/۰۲۶	+۰/۸۵۲
های هلث	+۰/۶۷۳	+۰/۲۰۷	+۰/۵۶۱	+۰/۳۸۳	+۰/۶۶۶	−۰/۲۴۸	+۰/۲۰۵	+۰/۰۶۱
مولوکائی	+۰/۶۰۹	+۰/۳۳۷	−۰/۱۱۸	+۰/۵۲۲	−۰/۱۴۸	−۰/۳۰۴	−۰/۱۸۷	+۰/۴۴۷

۳-۱-۳- تمایز ژنتیکی (F_{st}) جمعیت‌ها

نتایج حاصل از تمایز ژنتیکی میان جمعیت‌های مورد مطالعه حاکی از وجود یک تمایز ژنتیکی پائین تا متوسط بود. به گونه‌ای که تمایز ژنتیکی موجود میان جمعیت‌های های هلث و مولوکایی ۰/۱۸۲ بود که در سطح متوسط قرار داشت و از لحاظ آماری کاملاً معنی دار بود ($P<0.01$). این در حالی بود که تمایز موجود بین جمعیت‌های هلث و ترکیبی و همچنین جمعیت ترکیبی و مولوکائی به ترتیب ۰/۱۳۵ و ۰/۱۱۷ بود که این میزان در سطح پائین تمایز ژنتیکی قرار داشت، لیکن از لحاظ آماری کاملاً معنی دار بود ($P<0.01$). در رابطه با مقادیر جریان ژنی (ارتباطات ژنتیکی) میان جمعیت‌های مختلف بیشترین میزان میان جمعیت‌های ترکیبی و مولوکائی و کمترین میزان میان جمعیت‌های هلث و مولوکائی بود (جدول ۷).

جدول ۷: مقادیر جریان ژنی (Nm) جفت جمعیت‌های مورد مطالعه

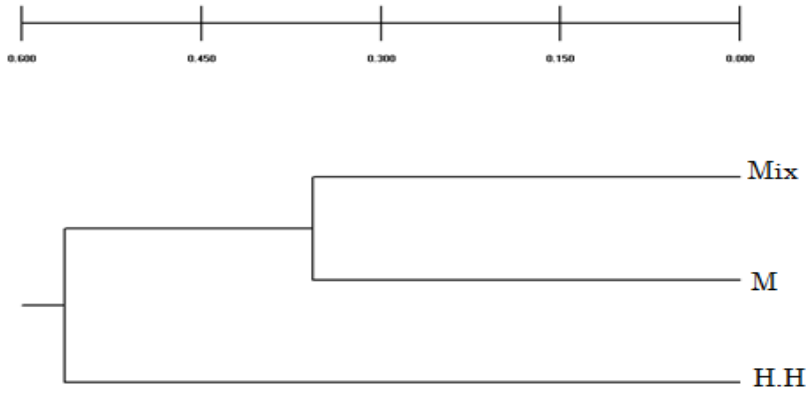
جمعیت	ترکیبی	های هلث
ترکیبی		
های هلث	۱/۶۰۷	
مولوکائی	۱/۸۸۲	۱/۱۲۷

۴-۱-۳- فاصله ژنتیکی[1] و شباهت ژنتیکی[2] (Nei, 1972)

در این رابطه نتایج نشان داد که بیشترین میزان فاصله ژنیتکی میان جمعیت‌های هلث و مولوکائی و کمترین میزان میان جمعیت‌های ترکیبی و مولوکائی مشاهده شد. همچنین بیشترین شباهت ژنتیکی نیز میان جمعیت ترکیبی و مولوکائی مشاهده شد (جدول ۸) (نمودار ۲).

جدول ۸: مقادیر فاصله موجود در میان جفت جمعیت‌های مورد مطالعه

جمعیت	فاصله ژنتیکی	
	ترکیبی	های هلث
های هلث	۰/۵۱۲	
مولوکائی	۰/۳۵۷	۰/۶۱۵



نمودار ۲: درخت موضع شناسی تکاملی براساس فاصله ژنتیکی (براساس معیار Nei, 1972)

۲-۳- انحراف از تعادل هاردی–واینبرگ

براساس آزمون مربع کای (χ^2) در هر سه جمعیت ترکیبی، های هلث و مولوکائی در جایگاه‌های مختلف ریزماهواره انحراف از تعادل هاری واینبرگ مشاهده شد (*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001). به استثنای جایگاه Pvan 0013 در جمعیت ترکیبی، جایگاه‌های TUMXLv 5.38 و TUMXLv 8.32 در جمعیت‌های هلث و جایگاه‌های Pvan 0013، Pvan 1815، TUMXLv 5.27 و TUMXLv 5.38 در جمعیت مولوکائی که هیچگونه اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (جدول ۹).

1 -Genetic Distance
2 -Genetic Identity

جدول ۹: نتایج آزمون کای (χ^2) برای تعادل هاری – واینبرگ برای جایگاه‌های مختلف پلی مورفیک در جمعیت‌های مختلف

جمعیت	عوامل تعادل χ^2	Lvan 01	Lvan 07	Pvan 0013	Pvan 1758	Pvan 1815	TUMXLv 5.27	TUMXLv 5.38	TUMXLv 8.32
ترکیبی	درجه آزادی	۳	۳۶	۳	۱۰	۶	۱۰	۱۵	۱۵
	آزمون مربع کای	۱۶/۴۷۱	۷۷/۰۳۷	۲/۸۱۳	۲۷/۱۲۲	۲۱/۹۲۷	۲۵/۴۱۸	۳۸/۵۱۹	۷۶/۲۳۵
	احتمال	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۴۲۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰
	معنی دار بودن	***	***	ns	**	**	**	***	***
های هلث	درجه آزادی	۳	۳۶	۶	۲۱	۳	۱۰	۱۵	۱۵
	آزمون مربع کای	۱۱/۶۱۸	۷۱/۰۷۸	۲۴/۹۱۰	۳۸/۸۶۱	۱۹/۹۱۷	۳۸/۳۰۰	۱۶/۲۵۰	۲۰/۱۷۴
	احتمال	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۱۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۳۶۶	۰/۱۶۵
	معنی دار بودن	**	***	***	*	***	***	ns	ns
مولوکائی	درجه آزادی	۳	۲۸	۱	۱۵	۳	۱۰	۶	۶
	آزمون مربع کای	۱۸/۷۲۰	۴۸/۶۸۶	۰/۲۶۳	۳۳/۶۰۲	۰/۶۲۳	۱۴/۸۱۵	۶/۲۳۶	۱۵/۵۰۹
	احتمال	۰/۰۰۰	۰/۰۰۹	۰/۶۰۸	۰/۰۰۴	۰/۸۹۱	۰/۱۳۹	۰/۳۹۷	۰/۰۱۷
	معنی دار بودن	***	**	Ns	**	ns	ns	ns	*

۳-۳- شناسایی عوامل بیماریزا

نتایج حاصل آزمایشات باکتریایی، مولکولی و آسیب شناسی حاکی از این بود که هیچگونه عامل بیماریزایی از پیش مولدین مراکز پرورش انتخاب شده شناسایی و جداسازی نشد.

۳-۴- تعداد میگوهای جمع آوری شده از مزارع پرورش میگو

تعداد میگوهای جمعیت‌های مختلف ذخیره سازی شده در تانک‌های چهار تنی سالن قرنطینه

با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مولکولی و جمعیت‌های شناسایی شده اقدام به جمع آوری پیش مولد از مزارع پرورش میگو نموده شد. لذا پس از جمع آوری پیش مولدین، با تراکم‌های مختلف در تانک‌های چهار تنی فایبرگلاس در سالن قرنطینه ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه ذخیره به مدت یک ماه ذخیره سازی و از لحاظ وجود عوامل بیماریزا مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱۰).

جدول ۱۰: تعداد میگوهای ذخیره سازی شده در تانک‌های نگهداری پیش مولدین به تفکیک جمعیت

جمعیت	مولوکائی					ترکیبی							های هلث					
تانک	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
تعداد میگوهای ذخیره سازی شده	۱۷۳	۱۴۷	۱۳۰	۱۰۶	۱۹۰	۱۲۹	۸۵	۱۲۴	۹۵	۱۰۰	۱۰۳	۱۰۶	۱۴۸	۱۷۳	۱۱۳	۸۲	۲۲۰	۱۷۷
مجموع کل	۷۴۶					۷۴۲							۹۱۳					

۳-۵- میانگین وزن و طول پیش مولدین منتقل شده به سالن قرنطینه

با توجه به نتایج بدست آمده میانگین وزن و طول پیش مولدین جمعیت‌های مختلف میگو حاکی از آن بود که حداکثر و حداقل وزن و طول پیش مولدین ماده ذخیره سازی شده در سالن قرنطینه به ترتیب ۳۷/۳۰ گرم، ۱۶/۵ سانتیمتر و ۱۹/۹ گرم، ۱۳/۸ سانتیمتر مربوط به جمعیت ترکیبی و مولوکائی بود. همچنین در رابطه با پیش مولدین نر ذخیره سازی شده در سالن قرنطینه مشاهده شد که حداکثر و حداقل وزن وطول به ترتیب ۳۴ گرم، ۱۴ سانتیمتر و ۲۳ گرم و ۱۴ سانتیمتر مربوط به جمعیت‌های ترکیبی و مولوکائی می‌باشد. از سوی دیگر نتایج حاکی از آن بود که میانگین وزن و طول پیش مولدین جمعیت‌های هلث و ترکیبی بطور معنی داری بیشتر از پیش مولدین جمعیت مولوکائی بود ($P<0.05$). این در حالی بود که علیرغم بیشتر بودن میانگین وزن و طول پیش مولدین جمعیت ترکیبی نسبت به پیش مولدین جمعیت های‌هلث هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۱۱).

جدول ۱۱: میانگین وزن و طول ± انحراف معیار پیش مولدین منتقل شده به سالن قرنطینه

شاخص	جنسیت	مولوکائی	ترکیبی	های هلث
وزن	ماده	۲۲/۸۰±۰/۷۰^{b}	۲۷/۹۱±۰/۶۱^{a}	۲۵/۶۷±۰/۸۳^{a}
	نر	۲۱/۲۸±۰/۷۵^{b}	۲۵/۹۵±۰/۵۸^{a}	۲۶/۱۸±۰/۵۹^{a}
طول	ماده	۱۳/۶۴±۰/۱۴^{c}	۱۴/۷۲±۰/۱۱^{b}	۱۴/۲۱±۰/۱۴^{a}
	نر	۱۳/۴۵±۰/۱۷^{b}	۱۴/۳۸±۰/۶۱^{a}	۱۴/۴۶±۰/۶۲^{a}

۶-۳- میانگین وزن و طول پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه

از آنجا که پیش مولدین به مدت یکماه در سالن قرنطینه نگهداری شده بودند نتایج حاصل از سنجش وزن و طول پیش مولدین نشان داد که حداکثر و حداقل وزن و طول پیش مولدین نر و ماده نگهداری شده در سالن قرنطینه بعد از گذشت یک ماه از ذخیره سازی به ترتیب ۴۰/۳۰ گرم، ۱۷ سانتیمتر و ۱۰/۶۰ گرم و ۱۲ سانتیمتر به ترتیب مربوط به پیش مولدین ترکیبی و مولوکائی بود. همچنین نتایج حاکی از آن بود که میانگین وزنی پیش مولدین جمعیت ترکیبی بطور معنی داری بیشتر از میانگین وزن پیش مولدین های هلث و مولوکائی است ($P<0.05$). از سوی دیگر میانگین وزنی پیش مولدین مولوکائی بطور معنی داری کمتر از پیش مولدین های هلث بود ($P<0.05$).

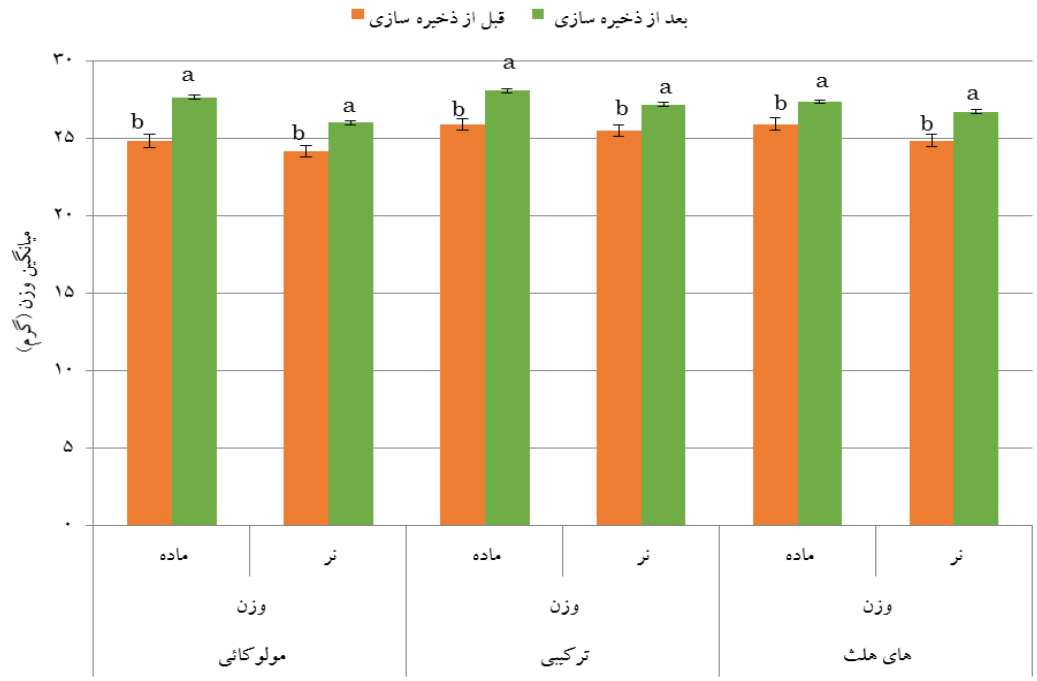
مشاهده شد که میانگین طولی پیش مولدین ترکیبی بطور معنی داری بیشتر از پیش مولدین های هلث و مولوکائی می‌باشد ($P<0.05$). این در حالی بود که علیرغم بیشتر بودن میانگین طولی پیش مولدین های هلث در مقایسه با پیش مولدین مولوکائی هیچگونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$) (جدول ۱۲).

جدول ۱۲: میانگین وزن و طول ± انحراف معیار پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه

شاخص	جنسیت	مولوکائی	ترکیبی	های هلث
وزن	ماده	۲۴/۷۹±۰/۲۰^{c}	۲۸/۸۹±۰/۱۷^{a}	۲۶/۷۳±۰/۱۴^{b}
	نر	۲۴/۷۵±۰/۲۱^{b}	۲۸/۷۵±۰/۱۸^{a}	۲۶/۷۷±۰/۱۴^{a}
طول	ماده	۱۴/۳۲±۰/۰۴^{c}	۱۴/۸۳±۰/۰۳^{a}	۱۴/۴۷±۰/۰۲^{b}
	نر	۱۴/۲۸±۰/۰۴^{c}	۱۴/۸۰±۰/۰۳^{a}	۱۴/۴۸±۰/۰۲^{b}

۲-۶-۳- میانگین وزن و طول پیش مولدین جمعیت‌های مختلف قبل و بعد از ذخیره سازی در سالن قرنطینه

نتایج حاصل از مقایسه میانگین وزن و طول پیش مولدین نر و ماده جمعیت‌های مختلف حاکی از آن بود که میانگین وزن و طول پیش مولدین نر و ماده بطور معنی داری نسبت به زمان قبل از ذخیره سازی در سالن قرنطینه افزایش یافته بود ($P<0.05$) (نمودار ۳ و نمودار ۴).

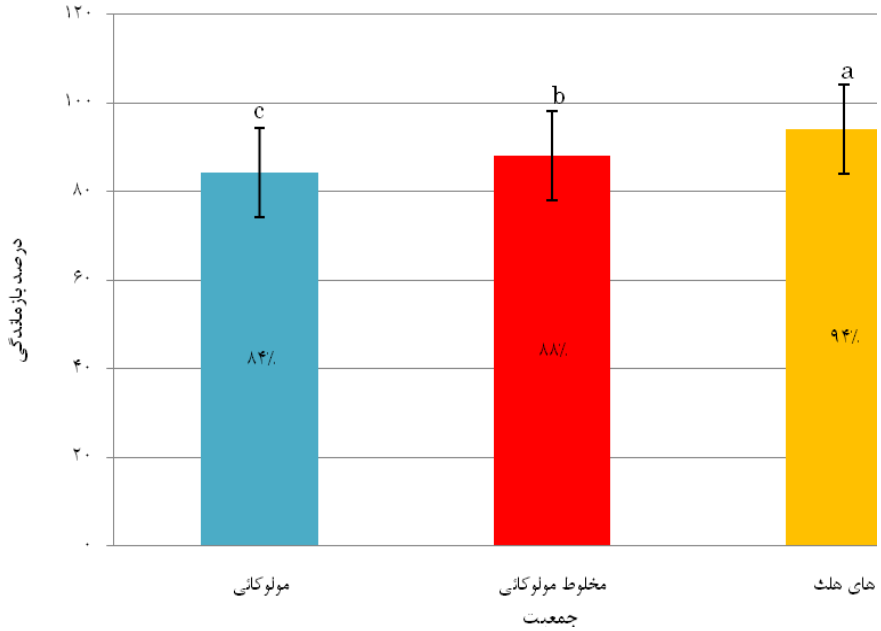


نمودار ۳: میانگین وزن ±انحراف معیار میگوهای جمعیت‌های مختلف قبل و بعد از ذخیره سازی بااطمینان ۹۵ درصد (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن می‌باشد).

نمودار ۴: میانگین طول ±انحراف معیار میگوهای جمعیت‌های مختلف قبل و بعد از ذخیره سازی بااطمینان ۹۵ درصد (حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دار بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن می‌باشد)

۳-۷- بازماندگی پیش مولدین نگهداری شده در سالن قرنطینه

نتایج حاصل از آن بود که میزان بازماندگی پیش مولدین های هلث بطور معنی داری بیشتر از پیش مولدین ترکیبی و مولوکائی بود ($P<0.05$). از سوی دیگر مشاهده شد که میزان بازماندگی پیش مولدین مولوکائی بطور معنی داری کمتر از پیش مولدین ترکیبی می‌باشد ($P<0.05$)(نمودار ۵).



نمودار ۵: میزان بازماندگی پیش مولدین جمعیت‌های مختلف

۴- بحث

امروزه میگوی سفید غربی به عنوان مهم‌ترین گونه پرورشی در جهان محسوب شده که به سرعت جایگزین گونه‌های بومی در مناطق پرورشی شده است. لذا با توجه به توسعه صنعت آبزی پروری در جهان، پرورش این گونه از سال ۱۳۸۴ با ورود اولین محموله میگوی عاری از بیماری خاص در کشور نهادینه شد و در طی چند سال اخیر همزمان با افزایش سطح زیر کشت میگو در کشور این گونه بطور کامل جایگزین میگوی سفید هندی شده است. از این رو با توجه به غیر بومی بودن این گونه و مسئله انتقال عوامل بیماریزا به گونه‌های بومی کشور به دنبال واردات این آن همزمان با افزایش سریع مزراع پرورشی همواره نگرانی‌های محیطی و اجتماعی از جمله خطر شیوع عوامل بیماریزای ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی وجود داشته است (Aguirre Guzman & Ascencio Valle, 2000). لذا عملکرد ضعیف مدیریتی و استفاده از میگوهای آلوده به عوامل بیماریزا همواره می‌تواند با خطر شیوع بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری ویروسی همراه باشد که علاوه ضرر و زیان اقتصادی فراوانی با رکود صنعت همراه خواهد شد (Saulnier *et al*., 2000).

از جمله راهکارهای ارائه شده استفاده از میگوهای عاری از بیماری خاص بمنظور کاهش خطر ورود عوامل بیماریزا به داخل کشور می‌باشد (Flegel, 2006). با توجه به اینکه میگوهای عاری از بیماری خاص در شرایط عاری از عوامل بیماریزا و تحت شرایط غربالگری شدید نگهداری و تولید می‌شوند، به عنوان گزینه مناسب جهت جلوگیری از شیوع بیماری در مزارع پرورشی محسوب می‌شوند (Saulnier *et al*., 2000).

شایان ذکر است که در کشور کره واردات میگوهای سفید غربی عاری از بیماری خاص اولین بار در سال ۲۰۰۳ با ورود مولدین عاری از بیماری خاص از هاوائی صورت پذیرفت که نتایج حاصل از پرورش پست لاروهای تولید شده از آن‌ها در سال ۲۰۰۴ حاکی از آن بود که میزان رشد آن‌ها ۳۰ تا ۵۰ درصد بیشتر از میگوهای چینی[1] بود. همچنین فراوانی شیوع بیماری ویروسی لکه سفید در مزارع پرورشی با کاهش معنی داری همراه شد (Jang & Jun, 2005). در کشور تایلند نیز واردات مولدین میگوی سفید غربی عاری از بیماری خاص اولین بار در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت که پست لاروهای بدست آمده از آن‌ها هم از بازماندگی بالا و هم از رشد سریعی برخوردار بودند. با توجه به اینکه میگوهای سفید غربی عاری از بیماری خاص قادر است در تراکم‌های بالا نسبت به سایر گونه‌ها از جمله میگوی ببری سیاه پررورش داده شوند (Wyban, 2007). از این با توجه به اهمیت میگوی سفید غربی همواره این احتمال وجود دارد که به دلیل اختصاصی بودن برخی از عوامل بیماریزای حتی در صورت واردات محموله‌های عاری از بیماری خاص از مناطق مختلف جهان، برخی از عوامل بیماریزای

1 -*F. chinensis*

غیراختصاصی بصورت نهفته از طریق این گونه وارد کشور شوند (Hopkins *et al*., 1995; Pruder, 2004; Barman *et al*., 2012).

از این رو در این مطالعه سعی شد تا با بستر سازی مناسب شرایط برای تولید میگوهای سفید غربی عاری از بیماری خاص در داخل کشور فراهم گردد. لذا با توجه به پرورش این گونه در مناطق مختلف کشور میگوهای نسل صفر از مناطقی جمع آوری شدند که تا کنون هیچگونه سابقه‌ای از شیوع بیماری در آن مناطق گزارش نشده بود (Moss *et al*., 2012; Sedhuraman *et al*., 2014). لذا با مراجعه به سوابق موجود مشاهده شد که اخیراً گزارشاتی مبنی بر شیوع ویروس لکه سفید در مزارع پرورشی میگو در استان‌های خوزستان و سیستان و بلوچستان در طی سال‌های ۸۷ تا ۹۱ ارائه شده بود که با آگاهی از این موضوع جمع آوری میگوهای نسل صفر از این دو استان صورت نپذیرفت.

از سوی دیگر بمنظور جلوگیری از ایجاد هم خونی در نسل‌های تولیدی میگوی عاری از بیماری خاص و مسائل مربوط به کاهش شاخص‌های ژنتیکی از قبیل کاهش تنوع ژنتیکی و فراوانی آللی ناشی از آمیزش‌های درون گروهی میگوهای عاری از بیماری خاص در نسل‌های تولیدی که گاهاً می‌تواند با کاهش تحمل میگوها در برابر بیماری، کاهش شاخص‌های رشد و توسعه ناهنجاری‌ها در نسل‌های تولید شده همراه باشد جلوگیری به عمل آمد (Pruder *et al*., 1995; Lotz, 1997; Fegan & Clifford, 2001). همچنین در این مطالعه سعی شد که انتخاب میگوهای نسل صفر از مناطق مختلف پرورشی کشور، براساس شاخص‌های ژنتیکی و منشاء ورود آن‌ها از جمعیت‌های مختلف صورت گیرد (Tamayo, 2006; Sedhuraman *et al*., 2014).

تعیین تاریخچه و منشاء ورود مولدین عاری از بیماری خاص به داخل کشوردر طی سال‌های گذشته حاکی از این بود که تنها نسل‌های سوم و چهارم جمعیت‌های های‌هلث و مولوکائی در برخی مناطق وجود دارد. لذا براساس نتایج مطالعات مولکولی جمعیت‌های مختلف میگو سه جمعیت مولوکائی، های‌هلث و ترکیبی از میگوهای سفید غربی شناسایی شدند، به گونه‌ای که جمعیت های‌هلث نسبت به میگوهای جمعیت مولوکائی و ترکیبی از بیشترین میزان فاصله ژنتیکی برخوردار بودند لیکن کمترین فاصله ژنتیکی میان میگوهای جمعیت مولوکائی و ترکیبی وجود داشت. از سوی دیگر مشاهده شد که میزان تنوع ژنتیکی میگوهای جمعیت های‌هلث بطور معنی داری بیشتر از میگوهای جمعیت مولوکائی و ترکیبی می‌باشد. از این رو بمنظور بهبود شاخص‌های ژنتیکی و فنوتیپی از قبیل رشد و بازماندگی، انتخاب میگوهای نسل صفر از هر سه جمعیت صورت پذیرفت.

شایان ذکر است که با توجه به دستورالعمل سازمان دامپزشکی قبل از انتقال میگوهای سه جمعیت فوق به عنوان پیش مولدین نسل صفر به سالن قرنطینه با انجام آزمایشات تشخیصی و غربالگری‌های متعدد از عدم وجود هر گونه عامل بیماریزا اطمینان حاصل شد. ازا ین رو Sedhuraman و همکاران (۲۰۱۴) عنوان نمودند که میگوهای خانواده پنائیده براساس بیماری‌های لیست شده توسط سازمان جهانی دامپزشکی می‌بایست از لحاظ وجود عوامل بیماریزای ویروسی از قبیل بیماری ویروسی لکه سفید، بیماری ویروسی نکروز بافت خونساز و غدد زیرپوستی،

کله زرد، سندروم تورآ، بیماری نکروز عفونی عضلات، بیماری باکتریایی نکروز بافت هپاتوپانکرس، بیماری انگلی میکروسپوریده و گریگارین‌ها مورد غربالگری قرار گیرند.

پس از حصول اطمینان از عدم وجود عوامل بیماریزا در جمعیت‌های مختلف میگوی پرورشی با هدف نگهداری میگوها در سالن قرنطینه بمنظور ایجاد شرایط مناسب جهت بروز حالت‌های پنهان بیماری و عوامل بیماریزا نهفته، میگوها به مدت یکماه در سالن قرنطینه نگهداری شدند، از این رو در طی این مدت آب ورودی و خروجی، پرسنل، وسایل و تجهیزات از سایر قسمت‌ها منفک شد (جلالی و برزگر، ۱۳۸۷؛ Barman *et al*., 2012). به گونه‌ای که با گندزدائی آب ورودی و خروجی منتهی به سالن قرنطینه توسط هیپوکلریت کلسیم و نور ماوراءبنفش از ورود و یا خروج هر گونه عامل بیماریزا جلوگیری به عمل آمد (Fulks & Main, 1992; Haq *et al*., 2013).

Lightner (۲۰۰۳) عنوان نمود که عفونت‌های ویروسی در سخت پوستان توسط ۲۰ نوع ویروس مختلف می‌تواند ایجاد گردد. لذا با توجه به اینکه میگوهای عاری از بیماری خاص موجوداتی هستند که در شرایط عاری از عوامل بیماریزا تحت شرایط غربالگری شدید نگهداری می‌شوند و نسبت به عوامل بیماریزا هیچگونه مقاومتی ندارند (Pérez Farfante & Kensley, 1997; Aguirre Guzman & Ascencio Valle, 2000)، در این مطالعه سعی شد تا در طول مدت زمان نگهداری جمعیت‌های مختلف میگوهای جمع آوری شده در سالن قرنطینه، اثرات متقابل اجزای زنده و غیر زنده بر روی آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. از این رو با انجام آزمایشات دوره‌ای وجود یا عدم وجود هشت بیماری ویروسی، یک بیماری باکتریایی و دو بیماری انگلی مورد ارزیابی قرار گرفت. لیکن تا حصول اطمینان از سلامت ذخائر جمع آوری شده، با رعایت کلیه شرایط ایمنی زیستی میگوهای جمعیت‌های مختلف به مدت یکماه بصورت جدا از هم در سالن قرنطینه نگهداری شدند. همچنین در طول این مدت هر گونه کاهش اشتها، اختلال در شنا و مرگ و میر بصورت روزانه کنترل و ثبت شد (Lightner, 1996; Khadijah *et al*., 2003).

این در حالی بود که Barman و همکاران (۲۰۱۲) عنوان نمودند که میگوهای عاری از بیماری خاص در مقایسه با میگوهای معمولی نسبت به عوامل بیماریزا از یک مقاومت نسبی برخوردار می‌باشند، لیکن این بدین معنا نیست که این موجودات آلوده نمی‌شوند. لذا دراین مطالعه بمنظور جلوگیری از ورود عوامل بیماریزا به سالن قرنطینه با وضع قوانین سخت گیرانه علاوه بر جلوگیری از ورود و خروج افراد غیر مرتبط با انجام آزمایشات مولکولی و میکروبیولوژی از سلامت غذای مصرفی قبل از تغذیه پیش مولدین اطمینان حاصل شد.

از این رو عنوان شده که در صورت مثبت بودن نتایج میگوهای نگهداری در سالن قرنطینه می‌بایست علاوه بر اطلاع رسانی به سازمان‌های مربوطه، معدوم سازی ذخیره میگو بصورت کامل همراه با ضدعفونی تمام وسایل بمنظور جلوگیری از انتشار عوامل بیماریزا صورت گیرد (Lotz *et al*.,1995; Lightner, 2005). این در حالی بود که در طول این مدت هیچگونه عامل بیماریزایی از میگوهای نگهداری شده در سالن قرنطینه جداسازی نشد.

همچنین نتایج حاصل از زیست سنجی میگوهای جمعیت‌های مختلف حاکی از آن بود که میانگین وزن و طول میگوهای جمعیت ترکیبی بطور معنی داری بیشتر از میگوهای جمعیت مولوکائی می‌باشد، لیکن علیرغم بیشتر بودن میانگین وزن و طول میگوهای جمعیت ترکیبی نسبت به میگوهای جمعیت های‌هلث هیچگونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد. این در حالی بود که بعد از گذشت یک ماه از ذخیره سازی پیش مولدین جمعیت‌های مختلف نتایج حاکی از افزایش میانگین وزن و طول میگوهای جمعیت‌های مختلف بود. به گونه‌ای که بیشترین و کمترین میانگین وزن و طول به ترتیب مربوط به پیش مولدین جمعیت ترکیبی و مولوکائی بود. از سوی دیگر میزان بازماندگی میگوهای جمعیت های‌هلث بطور معنی داری بیشتر از میگوهای جمعیت ترکیبی و مولوکائی بود. لذا تفاوت موجود در مقادیر وزن و طول جمعیت‌های مختلف میگو جمع آوری شده قبل از ذخیره سازی در سالن قرنطینه ممکن است ناشی از تفاوت در مدیریت مزارع پرورشی بوده باشد، این در حالی بود که اختلاف موجود در میانگین وزن و طول میگوهای ذخیره سازی شده در سالن قرنطینه بعد از گذشت یک ماه ممکن است ناشی از اختلافات ژنتیکی موجود میان جمعیت‌های جمع آوری شده باشد (Pérez Farfante & Kensley, 1997; Fegan & Clifford, 2001).

۵- نتیجه گیری

شایان ذکر است که در مطالعه حاضر از میان ذخائر مختلف میگوی پرورشی سفید غربی در کشور براساس بررسی تاریخچه و منشاء ورود و شاخص‌های ژنتیکی از قبیل میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی قابل انتظار، میزان فراوانی آللی، ضریب هم خونی، تمایز ژنی، فاصله ژنتیکی و شباهت ژنتیکی تنها سه جمعیت مولوکائی، ترکیبی و های‌هلث شناسایی شدند. همچنین هیچگونه عامل بیماریزای ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی از میگوهای جمعیت‌های مختلف قبل از ذخیره سازی آن‌ها در سالن قرنطینه جداسازی نشد. از سوی دیگر نتایج حاصل از زیست سنجی حاکی از آن بود که میانگین وزن و طول میگوهای جمعیت ترکیبی و های‌هلث بطور معنی داری بیشتر از میگوهای جمعیت مولوکائی بود. از این رو با رعایت کلیه شرایط ایمنی زیستی میگوهای جمعیت‌های مختلف بصورت جداگانه در سالن قرنطینه نگهداری شدند. همچنین در طول مدت زمان نگهداری میگوها در سالن قرنطینه با انجام آزمایشات مولکولی، میکروبیولوژی و بیوشیمیایی وجود عوامل بیماریزای زنده و غیر زنده مورد ارزیابی قرار گرفت. لذابه دلیل عدم مشاهده هر گونه عامل بیماریزا در طول دوران قرنطینه میگوها جهت انجام پروژه مولد سازی به استخرهای مولدسازی منتقل گردید.

منابع

۱- افشار نسب، م. ۱۳۸۶. بیماری‌های ویروسی میگوهای خانواده پنائیده. وزارت جهاد سازندگی، موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۰ صفحه.

۲- جلالی، ب.، برزگر، م.۱۳۸۷. مدیریت بهداشتی مزارع پرورش میگو. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۱۹۸ صفحه.

3- Aguirre Guzman, G., Ascencio Valle, F., 2000. Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. Recent research developments in microbiology, 333-348.

4- Barman, D., Kumar, V., Roy, S., Mandal, S.C., 2012. Specific pathogen free shrimps: Their scope in aquaculture. World Aquaculture 43, 67.

5- Borrell, Y., Espinosa, G., Romo, J., Blanco, G., Vázquez, E., Sánchez, J., 2004. DNA microsatellite variability and genetic differentiation among natural populations of the Cuban white shrimp Litopenaeus schmitti. Marine Biology 144, 327-333.

6- Cruz, P., Ibarra, A.M., Mejia-Ruiz, H., Gaffney, P.M., Pérez-Enríquez, R., 2004. Genetic variability assessed by microsatellites in a breeding program of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei). Marine Biotechnology 6, 157-164.

7- FAO, 2013. Fishery and Aquaculture Statistics. Global capture production 1950-2011 (FishstatJ).In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online or CD-ROM]. Rome. Updated 2013.

8- Fegan, D., Clifford III, H., 2001. Health management for viral diseases in shrimp farms. In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture, pp. 168-198.

9- Flegel, T., 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture 258, 1-33.

10- Freitas, P.D., Jesus, C.M., GALETTI, P.M., 2007. Isolation and characterization of new microsatellite loci in the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei and cross-species amplification in other penaeid species. Molecular Ecology Notes 7, 324-326.

11- Freitas, P.D.d., Galetti Junior, P.M., 2002. PCR-based VNTR core sequence analysis for inferring genetic diversity in the shrimp Litopenaeus vannamei. Genetics and Molecular Biology 25, 431-434.

12- Fulks, W., Main, K.L., 1992. Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. Oceanic Institute.

13- Gitterle, T., Rye, M., Salte, R., Cock, J., Johansen, H., Lozano, C., Suárez, J.A., Gjerde, B., 2005. Genetic (co) variation in harvest body weight and survival in Penaeus (Litopenaeus) vannamei under standard commercial conditions. Aquaculture 243, 83-92.

14- Haq, M.B., Kavitha, P., Ahamed, A.S., Shalini, R., Srinivasan, M., 2013. Characterization and propensity of white spot syndrome virus extracted from imported specific pathogen free (SPF) pacific Litopenaeus vannamei brooders progeny by performing SF9 cell line culture. African Journal of Microbiology Research 7, 5159-5165.

15- Hopkins, J.S., Sandifer, P.A., DeVoe, M.R., Holland, A.F., Browdy, C.L., Stokes, A.D., 1995. Environmental impacts of shrimp farming with special reference to the situation in the continental United States. Estuaries 18, 25-42.

16- Jang, I., Jun, J., 2005. Current status of shrimp diseases and its control in Korea. In: Final report of the first Korea-US seminar and workshop on the sustainable marine shrimp culture: challenges and opportunities for the future of marine shrimp farming.

17- Khadijah, S., Neo, S.Y., Hossain, M., Miller, L.D., Mathavan, S., Kwang, J., 2003. Identification of white spot syndrome virus latency-related genes in specific-pathogen-free shrimps by use of a microarray. Journal of virology 77, 10162-10167.

18- Lightner, D., 2003. Exclusion of specific pathogens fro disease prevention in a penaeid shrimp biosecurity program 1-116 in C.-S. Lee and PJ O'Bryen, editors. Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. The World Aquaculture Society, 1-116.

19- Lightner, D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp.

20- Lightner, D.V., 2005. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. Journal of the World Aquaculture Society 36, 229-248.

21- Lotz, J.M., 1997. Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 13, 405-413.

22- Lotz, J.M., Browdy, C.L., Carr, W.H., Frelier, P.F., Lightner, D.V., 1995. USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. In: Swimming through troubled water. Proceedings of the special session on shrimp farming, Aquaculture, pp. 66-75.
23- Meehan, D., Xu, Z., Zuniga, G., Alcivar-Warren, A., 2003. High frequency and large number of polymorphic microsatellites in cultured shrimp, Penaeus (Litopenaeus) vannamei [Crustacea: Decapoda]. Marine Biotechnology 5, 311-330.
24- Moss, S.M., Arce, S.M., Moss, D.R., Otoshi, C.A., 2006. Disease prevention strategies for penaeid shrimp culture. The Oceanic Institute, Hawaii USA.
25- Moss, S.M., Doyle, R.W., Lightner, D.V., 2005. Breeding shrimp for disease resistance: challenges and opportunities for improvement. Diseases in Asian aquaculture V. Manila: Asian Fisheries Society, 379-393.
26- Moss, S.M., Moss, D.R., Arce, S.M., Lightner, D.V., Lotz, J.M., 2012. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. Journal of invertebrate pathology 110, 247-250.
27- Munro, J., Owens, L., 2007. Yellow head-like viruses affecting the penaeid aquaculture industry: a review. Aquaculture research 38, 893-908.
28- Nunan, L., Poulos, B., Lightner, D., 1998. The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. Aquaculture 160, 19-30.
29- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 288-295.
30- Pérez Farfante, I., Kensley, B., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle (France).
31- Pruder, G.D., 2004. Biosecurity: application in aquaculture. Aquacultural engineering 32, 3-10.
32- Pruder, G.D., Brown, C.L., Sweeney, J.N., Carr, W.H., 1995. High health shrimp systems: seed supply—theory and practice. Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Sociely, Baton Rouge, LA USA, 40-52.
33- Rosenberry, B., 1996. Shrimp news international. In. World Shrimp Farming, San Diego, 2006 (19): 1-164, City.
34- Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D., 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. Aquaculture 191, 133-144.
35- Sedhuraman, V., Haq, M.B., Kavitha, P., Ahamed, A.S., Banu, M.N., Tiwary, C., Srinivasan, M., 2014. Geographical differentiation and wssv infestation of spf litopenaeus vannamei brood stock shrimp using molecular verdicts.
36- Singh, A., Lakra, W., 2012. Culture of Pangasianodon hypophthalmus into India: impacts and present scenario. Pakistan Journal of Biological Sciences 15, 19.
37- Soto-Hernandez, J., Grijalva-Chon, J., 2005. Genetic differentiation in hatchery strains and wild white shrimp Penaeus (Litopenaeus) vannamei (Boone, 1931) from northwest Mexico. Aquaculture International 12, 593-601.
38- Tamayo, R.J.M., 2006. Assessment of genetic variability in two lots of white shrimp, Litopenaeus vannamei (Boone, 1931) introduced to Cuba.
39- Tapay, L.M., Nadala Jr, E.C.B., Loh, P.C., 1999. A polymerase chain reaction protocol for the detection of various geographical isolates of white spot virus. Journal of virological methods 82, 39-43.
40- Valles-Jimenez, R., Cruz, P., Perez-Enriquez, R., 2004. Population genetic structure of Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. Marine Biotechnology 6, 475-484.
41- van Hulten, M.C., Reijns, M., Vermeesch, A.M., Zandbergen, F., Vlak, J.M., 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. Journal of General Virology 83, 257-265.
42- Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, C., Main, K.L., Mountain, J., Scarpa, J., 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Florida Department of Agriculture & Consumer Services.
43- Wyban, J., 2007. Thailand's shrimp revolution. Aquaculture Asia-Pacific Magazine 2007, 15-18.

Abstract
Nowadays, *Litopenaeus vannamei* are the most important species of farmed penaeidae shrimp in the world that is rapidly replacing native species in areas aquaculture. Due to demand increase for this species culture, shrimp displacement to different areas may be associated with some potential pathogens transferred to new areas farmed. Therefore, in this study were prepared bi-osecurity conditions for specific disease-free production of *L. vannamei*. Thereafter, three populations (Molokaei, High health and mix of Molokaei and High health) of the shrimp various reserves were detected base on origin and genetic indexes such as: observed heterozygosity, expected heterozygosity, allele frequency, coefficient inbreeding, genetic differentiation, genetic distance and genetic identity. On the other hand, epidemiological studies indicate non pathogens (viral, bacterial, fungal and parasitic) recognition of different populations selected in the quarantine salon. The bioassay results showed that the average weight and length of the populations of High health and Mix significantly greater than was a population of Molokaei. The shrimp populations were stocked in fiberglass tank (five ton) and were kept separated in the quarantine salon. During maintenance shrimp of populations in the quarantine salon were evaluated living and non-living pathogens with PCR, microbiology and biochemical methods. There is not any pathogens detection from shrimp populations stocking in the quarantine salon, so the shrimps were carried over to pond for broodstock culture of specific pathogenic free.

Keyword: *Litopenaeus vannamei*, specific pathogenic free, bi-osecurity, population

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Shrimp Research Center

---

Project Title : Supply and protected different population of *Litopenaus vannamei* subadult zero foster (F_0) from difference provices Iran
Approved Number:14-80-12-9101-91001-9101K
Author: Mohammad Khalil Pazir
Project Researcher : Mohammad Khalil Pazir
Collaborator(s) *:* A. Matinfar, J. Hosseini, A . Ghasemi, E. Ashori, A. Yarahmadi, W. Rasti, M.J. Shabani, H.Ghanaatian, J. Moazedi, A. Zendehbodi, Gh. Gharibi, M. Mirbakhsh, V. Yeganeh, A.A. Mottalebi, M. Afsharnasab, S.A. Paygozar, A. Asadi, M. Sobohi, J. Moaref, Bahmanabadi, M. Ramazani, Kh. Aeinjamshid, B. Ghaednia, R. Ghorbani, A. Mallolhi, M. Porkazemi, I. Sharifpor
Advisor(s): -
Supervisor:-
Location of execution : Bushehr Province
Date of Beginning : 2013
Period of execution : 1 Year & 6 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2017

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute -Shrimp Research Center

Project Title :

Supply and protected different population of *Litopenaus vannamei* subadult zero foster (F_0) from difference provices Iran

Project Researcher :

Mohammad Khalil Pazir

Register NO.

50937