شناسائی ویروس ایجاد کننده بیماری لکه سفید (WSSD) در میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

• محمد افشار نسب، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران
• سهراب اکبری، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: آبان ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۳

Email: mafsharnasab @ yahoo.com

چکیده

در تابستان سال ۱۳۸۱ گزارشی از مرگ و میر شدید در میگوهای منطقه چوئیبده آبادان واصل گردید. میگوهای بیمار دارای علائم ظاهری از جمله وجود پلاک‌های سفید رنگ، بزرگ شدن هپاتوپانکراس، قرمز شدن رنگ بدن میگو و خالی بودن معده بودند. تعدادی نمونه از میگوهای سالم و میگوهائی که علائم بیماری را نشان می‌دادند در محلول نگهدارنده گلوترالدهید ۴٪ فیکس شده و جهت مشاهده بافت‌های میگو با استفاده از میکروسکوپ الکترونی آماده گردید. در مشاهده بافت‌های میگو بالاخص آبشش و بافت‌های اپی‌تلیال روده، سلول‌ها به شدت آسیب دیده و هسته سلول‌ها متورم، کروماتین‌ها به کناره‌های غشا سلول‌ها مهاجرت نموده، سیتوپلاسم رقیق شده و هستک‌ها در سلول ناپدید شده بودند. در مراحل پیشرفته بیماری گنجیدگی‌های داخل سلولی در هسته سلول ایجاد گردیده که ویروس عامل ایجاد کننده بیماری در آن کاملاً مشخص بود. ویروس شناسائی شده به‌صورت بیضی تا نسبتاً گرد با پوشش سه لایه (Trilamina) که اندازه قطر آن ۱۱± ۱۰۷نانومتر و اندازه طول آن۸۷± ۲۴۸ نانومتر و اندازه طول کپسول پروتیینی ۱۷± ۵۹ نانومتر و قطر کپسول۱۵± ۱۶۲ نانومتر گزارش می‌گردد. بر اساس نظر کمیته تاکسونومی‌ویروس‌ها (ICTV) و اطلس ویروس‌های بی مهرگان ویروس را از خانواده Whispoviridae تشخیص و بیماری لکه سفید (WSSD) تائید می‌گردد. همچنین بر اساس مورفولوژی سروتیپ‌های ایجاد کننده بیماری لکه سفید ویروس تشخیص داده شده به سروتیپ SEMBV شباهت دارد.

کلمات کلیدی: میگوی سفید هندی، میکروسکوپ الکترونی، بیماری لکه سفید، Whispoviridae , SEMBV.

Pajouhesh & Sazandegi No 66 pp: 8-13

Identification of white spot syndrome disease (WSSD) by electron microscopy in *Penaeus indicus*

By: Afsharnasab,M .Iranian Fisheries Research organization,Tehran.Iran.
Akbari,S, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz. Iran

In the Summer of (2002), a serious mortality among cultured *P. indicus* occurred in Abadan. One of the typical external sign of infected shrimp was white spot on the inside of the carapace. The body colour of the infected shrimps

become reddish and the hepatopancreas was swollen and yellow. The abdomen and intestine was empty and reduce the preening activity. The sample of shrimp was collected and fixed in %4 glutaraldehyde and processed routinely and studied by TEM. The study by TEM revealed that the nuclei of infected cells were slightly hypertrophic, the chromatin was marginated along the nuclear membrane and the nucleolus disappeared in the cell. The cytoplasm changed to transparent zone. In the late stage of disease the intranuclear Cowdry type –A inclusion body was seen in the profile. The virion were elliptical to short rods with trilamilar envelop that measured 248±87×107±11nm and nucleocapside were 162±15×59±17nm. According the ICTV and Atlas of invertebrate virus this virus belong to Whispoviridae family and the morphology of virus is similar to SEMBV of WSSD group serotype.

Key words: *Penaeus indicus*,Electron microscopy, White spot syndrome disease, Whispovirdae,SEMBV of WSSD group serotype.

مقدمه

بیماری لکه سفید (WSSD) بیماری بسیار مهلک و کشنده‌ای می‌باشد که به‌طور خیلی سریع کلیه مزارع میگوهای یک منطقه را آلوده می‌کند. این بیماری برای نخستین بار در سال ۱۹۹۲ در کشور چین گزارش گردیده و باعث تلفات سنگینی درمزارع پرورشی میگوهای آن کشور گردید(۴،۶،۸).

در ابتدای بهار سال ۱۹۹۳ در ژاپن مرگ و میر بسیار زیادی در میان میگوهای خانواده Kuruma shrimp (*P. japonicus*) اتفاق افتاد . از علائم مشخص این بیماری وجود لکه‌های سفید در کاراپاس و بدن میگوها بود. رنگ بدن میگوها نیز به‌صورت قرمز یا بی رنگ تغییر کرده و هپاتوپانکراس میگوهای آلوده بزرگ و شکننده شده بود. این بیماری را Rod shope (RV-PJ) virus-*Penaeus japonicus* نامگذاری کردند (۱۴). سایر نام‌های این بیماری شامل

White spot baculovirus disease (WSB)

White spot syndrome baculovirus (WSBV)

white spot syndrome (WSS)

White spot syndrome (WSD)

می‌باشد اندازه ویروس ۳۸۰ – ۲۵۰ × ۱۵۰ – ۷۰ nm و اندازه کپسول پروتیینی آن ۶۷ ± ۵۸ × ۳۰ ± ۳۳۰ nm می‌باشد(۱۲).

در سال ۱۹۹۵ ویروسی کشف شد که آنرا Systemic ectodermal and mesodermal baculovirus یا (SEMBV) نامگذاری کردند. این ویروس نیز بیماری را ایجاد می‌کرد که علائم ظاهری آن شامل لکه های سفید در کاراپاس در مراحل انتهائی عفونت بود(۱۸). شبیه این عفونت در سایر کشورها باعث ایجاد بیماری در سایر گونه ها کرده و عامل ایجاد کننده بیماری مشخصات متفاوتی را دارا بود، که در بعضی کشورها آن را White spot syndrome baculovirus (WSSB) (۴) بیماری Hypodermal and hematoporetic necrosis virus (HHNBV) (۸) و یا بیماری Penaeid rod-shaped DNA virus یا DV- (۱۴) می‌نامند.

ویروس‌هائی که در مناطق مختلف این بیماری را ایجاد می‌کنند از نظر هیستوپاتولوژی و مورفولوژی بسیار شبیه به هم می‌باشند (۶) . بنابراین چون ویروس‌ها بسیار شبیه هم و سویه‌های مختلف یک خانواده بودند آنها را White spot syndrome virus (WSSV) نامیدند(۱۰). در تابستان سال ۱۳۸۱ بیماری لکه سفید در منطقه چوئیبده آبادان باعث تلفات سنگینی در میگوهای مزارع پرورشی منطقه گردید. این بیماری از نظر علائم ظاهری ایجاد لکه های سفید رنگ به اندازه ۰/۵ تا ۲ میلی‌متر در روی کاراپاس و بدن میگو نموده است . در این بیماری هپاتوپانکراس میگو بزرگ و شکننده، معده میگوهای آلوده خالی، میگوهای بی حال و در کناره های استخرقرار گرفته بودند. رنگ بدن میگوها در مراحل انتهائی بیماری قرمز رنگ و در نهایت با تلفات بسیار بالا در مزارع اثرات بیماریزائی خود را نشان می‌داد(۱).

با توجه به اینکه ویروس ایجاد کننده بیماری لکه سفید در نقاط مختلف دنیا دارای مورفولوژی متفاوتی بوده ولی علائم ظاهری بیماری شبیه یکدیگر می‌باشند، در این مقاله با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ویروس ایجاد کننده بیماری در منطقه چوئیبده آبادان شناسائی و از نظر تطابق با سویه های مختلف این ویروس بررسی و اعلام نظر می‌گردد.

مواد و روش‌ها

تعـداد ۱۰ عـدد میگوهای جمـع آوری شـده در منطقه نام برده شـده برای مطالعات مورفولوژیکی و مطالعات سـلولی توسط میکروسـکوپ الکترونـی (Transmission electron microscopy TEM) انتخاب گردید. محلول ۴٪ گلوترالدئید (Glutaraldehyde) و محلول بافر فسـفات (Cacodylate) را به نمونه تزریق و سـپس قسمت سر میگو را به قطعات ۱تا۲ میلی‌متر برش داده و اندام‌های آبشـش و روده را جدا و در محلول گلوترالدئید ۴٪ و بافر فسـفات (Cacodylate) به مدت ۲۴ سـاعت فیکس گردید. سپس نمونه ها در محلـول ۱٪ (Osmium tetroxide) بـه غلظـت M ۰/۱ و بافر فسفات (cacodylate) برای ۲-۱ ساعت قرار داد شد. نمونه ها را با غلظتهای مختلف استون آبگیری نموده و با محلول رزین به صورت قالبهای مشخص جهت ایجاد برش آماده گردید. ابتدا برشهای ۲-۱ میکرومتـر تهیه و بـا محلول متیلن بلو به مـدت ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد رنگ آمیزی گردید. بلوک‌هائی که ضایعات بافتی و گنجیدگی‌های درون سلولی

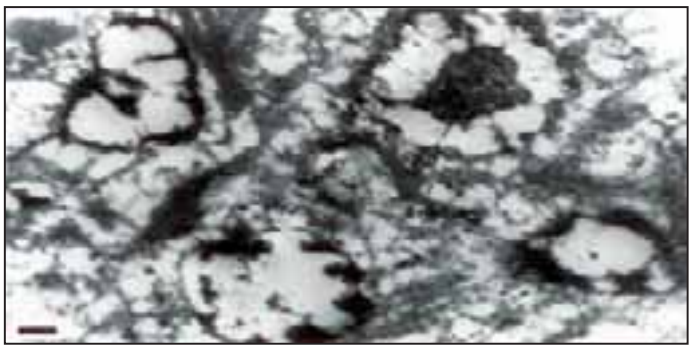
(Intranuclear cowdry type-A Inclusion body) را نشـان می‌دادنـد جهت تهیه مقاطـع برای میکروسـکوپ الکترونی آماده شـدند. این دسـته از نمونه ها را با میکروتـوم اتوماتیک مدل (C. reichert , austria, omu[۳]) بـرش داده و مقاطـع ۸۰-۵۰ نانومتر تهیه گردید و سپس روی بلوکهای مسی قرار داده و با رنگ آمیزی Lead citrate , uranyl acetate رنگ آمیزی شدند(۹،۲).

نمونـه های رنگ آمیزی شـده با اسـتفاده از میکروسـکوپ الکترونـی مـدل (CM۱۰ philips) مـورد مطالعه و بررسـی قرار گرفت.

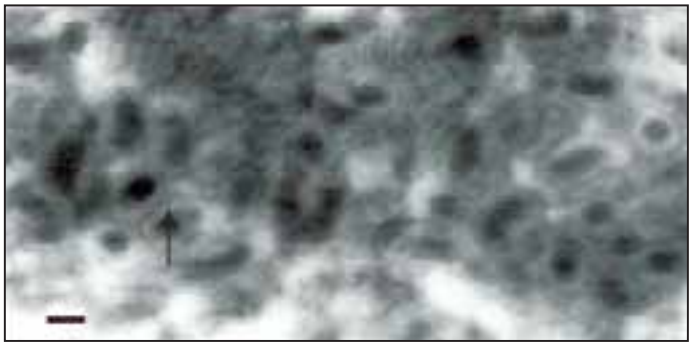
نتایج

مشـاهدات میکروسـکوپ الکترونـی تأئیـد می‌کنـد کـه گنجیدگی‌های درون سـلولی با ویروس‌هـای ایجاد کننده بیماری ارتباط دارند. همچنین تغییرات داخل سلولی مشخص قابل روئیت بود . این تغییرات بالاخص در سـلول‌های آبشـش و اپی‌تلیال روده از سـایر بافت‌ها بهتر قابل تشـخیص بود. در مراحل اولیه بیماری سلول‌های آبشش کاملاً از حالت طبیعی خارج شده و هسته سلول متورم و کروماتین‌ها به کناره های غشـاء هسته مهاجرت نموده‌اند. هسـتک و کروماتین‌ها کاملاً به هم چسبیده و باعث شده که مرکز سـلول رقیق و نازک شـده و نسـبت به بقیه قسـمت‌های سلول یکنواختـی نشـان دهد . در این مرحله هیچ ویروسـی در ضایعات سلولی مشاهده نمی‌شـود. حدفاصل هسته و سیتوپلاسم یک لایه روشن کاملاً مشخص است(تصویر ۱).

در مرحلـه دوم که بیماری پیشـرفت می‌کند هسـته‌ها بر اثر هیپرتروفی کاملاً گرد شده و در نهایت غشاء هسته پاره شده و لایه روشـنی که حد فاصل غشاء هسته و سیتوپلاسـم می‌باشد از بین رفته و ناپدید می‌شـود. در این مرحله مرکز سلول که کاملاً متراکم بوده و حالت انکلوژن بادی به خود گرفته بود از بین رفته و سـلول شـکل طبیعی خود را از دسـت می‌دهد. در این مرحلـه می‌توان ویروس‌های ایجاد کننده انکلوژن بادی را در بخشـی از سلول‌های



تصویر(۱)- هیپروتروفی سلول‌های آبشش در میگوی سفید هندی (P. indicus).
هستهٔ کاملاً متورم و هستک و کروماتینها به هم چسبیده اند (Bar: ۲µm).



تصویر ۲- ویروس‌های ایجاد کننده بیماری لکه سفید در سیتوپلاسم سلول‌های متلاشی شده در بافت آبشش میگوی سفید هندی (Bar:۲۳۰nm).

متلاشی شده مشاهده نمود (تصویر ۲).

در مراحل انتهائی، سلول کاملاً متلاشی شده و ویروس‌های عامل ایجاد کننده بیماری را کاملاً می‌توان تشـخیص داد. مشـاهدات میکروسکوپ الکترونی در این مرحله نشان می‌دهد که ویروس‌های باسیل شکل در هسته سلول پراکنده هستند. پوشـش ویروس‌ها(Envelope) به صورت بیضی تا نسـبتاً گرد در برشـهای طولی کاملاً قابل دیدن می‌باشد و در برشهای عرضی به صورت گرد دیده می‌شود. پوشش ویروس به صورت سه لایه (Trilamilar)که دارای دو لایه متراکم و یک لایه روشن است در بین آنها دیده می‌شود. انـدا زه ویروس‌ها ۱۱± ۱۰۷ × ۸۷ ±۲۴۸ نانومتـر مـی‌باشـد در صورتیکـه اندازه کپسول پروتیینی(Capsid) ۱۷± ۵۹ × ۱۵ ±۱۶۲ نانومتر می‌باشد(تصویر ۳).

بـر اسـاس مشـاهدات میکروسـکوپ الکترونـی و تغییـرات سـلولی چند مرحله مشـخص در سـاختمان ویروس‌ها قابل روئیت اسـت . به نظر می‌رسد که نوکلوتیدهای تشـکیل دهنده ویروس قبل از اینکه به صورت ویروس ظاهر شـوند در هسـته سلول‌های آسـیب دیده قابل روئیت می‌باشد و به طور همزمان پوشش ویروس‌ها نیز در هسـته سـلول قابل روئیت می‌باشد. در مرحله دوم نصف کپسول ویروس‌ها با یک لایه ظاهر شـده و در نهایت پوشـش با سـه لایه کامل می‌شـود و واحدهای نوکلوتید پشـت سـر هم قرار گرفته و یک نوکلوتید کامل ویروسی که حداکثراندازه آن ممکن اسـت به ۳۰۰ نانومتر برای ویروس‌های بالغ برسـد ظاهر

می‌شود. در مرحله سوم نوکلوتیدها شکل بیضی به خود گرفته و از یک طرف وارد پوشش پروتیینی شده و ویروس را بطور کامل در داخل کپسول بوجود می‌آورد. در مرحله نهائی یک ویروس کامل به شکل بیضی تا نسبتاً گرد قابل دیدن می‌باشد. در بعضی مواقع کپسول خالی از نوکلوتید نیز در سلول‌ها قابل روئیت می‌باشد که بعد از اینکه نوکلوتید ها کامل شدند، وارد کپسول شده و یک ویروس کامل را بوجود می‌آورد (تصویر ۴).

حوادثی در سلول‌های زیر کوتیکول نیز اتفاق افتاده و باعث تخریب سوراخ‌های موجود در سطح سلول‌های اپی تلیال شده و واکوئلها یا حفره‌هائی در سطح سلول‌ها ظاهر شده و ذرات مختلفی در کنار حفره ها دیده می‌شود. اندازه این حفره ها نیز شبیه لکه سفید ایجاد شده در روی بدن میگو می‌باشد و این نظریه را تقویت می‌کند که حفره های ایجاد شده در سلول‌های کوتیکول به همراه ذرات همراه، ایجاد پلاک‌های سفید در سطح کاراپاس و بدن میگو می‌نمایند (تصویر ۵).

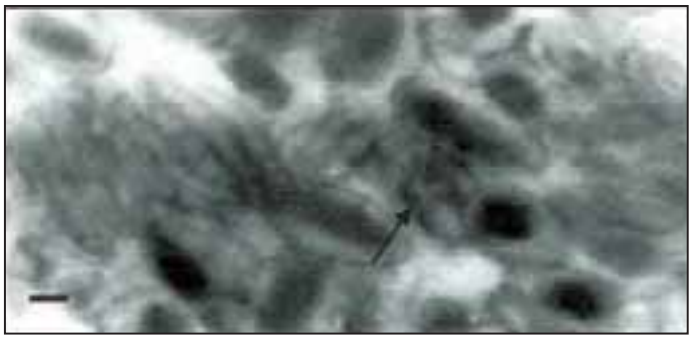
بحث

بیماری لکه سفید که آن را بیماری چین (China disease) نیز گویند دارای علائمی‌از قبیل ایجاد پلاک‌های سفید در روی کاراپاس و بدن میگو، بزرگ شدن هپاتوپانکراس، قرمز شدن بدن میگو، خالی بودن معده و کاهش اشتها می‌باشد. همچنین داشتن گنجیدگی‌های درون سلولی از علائم دیگر بیماری است که با میکروسکوپ الکترونی قابل روئیت بوده و با تخریب سلول در مراحل انتهائی بیماری ویروس ایجاد کننده بیماری بخوبی قابل تشخیص است(۱۷،۴).

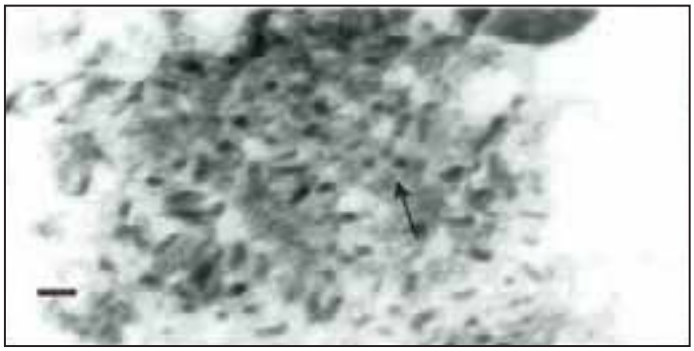
نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز شبیه نتایج بدست آمده از سایر محققین می‌باشد. بر اساس مورفولوژی، اندازه، محل تکثیر و بیماریزائی ویروس، ویروس شناسائی شده در این مطالعه شبیه ویروس جدا شده توسط Wongteerasupaya و همکاران در سال ۱۹۹۵ می‌باشد. اندازه ویروس جدا شده در مطالعه حاضر ۱۰۷ × ۲۴۸ نانومتر می‌باشد و اندازه ویروس جدا شده توسط Wongteerasupaya معادل ۱۱۱ × ۲۹۲ نانومتر می‌باشد(۱۸). این ویروس متعلق به خانواده Baculovirdae بوده که جزوء (subgraup C) و به صورت گرد می‌باشد.

خانواده Baculovridae به سه زیر گروه تقسیم می‌شوند.۱- Granular (GV) - ۲ Nuclear polyhedrosis virus (NPVs) NPVs ۳- Nuclear polyhedrosis virus از زیر گروه دو ویروس برای میگوهای‌خانواده پنائیده گزارش گردیده است‌که شامل Baculovirus (MBV) *Penaeus monodon* Baculovirus penaei (BV) می‌باشد (۵).

در سال ۱۹۹۶ Lightner گزارش کرده است که ویروس MBV نیز دارای دو سویه مختلف می‌باشد که یکی به نام PmsNPV می‌باشد که در میگوهای منطقه آسیا و اقیانوسیه ایجاد بیماری می‌کند و دیگری baculovirus midgut gland necrosis virus یا BMNV یا Type C Baculovirus می‌باشد که در کره



تصویر ۳- در این برش میکروسکوپ الکترونی ویروس‌های WSSV با نوکلئوپروتیین گرد و دیواره سه لایه مشاهده میشوند. در برش عرضی حالت گرد و در برش طولی حالت بیضی را از خود نشان می‌دهند .(Bar:۲۰۰nm)



تصویر ۴- برش ایجاد شده برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده بعضی از کپسولهائی می‌باشد که در حال کامل شدن بوده و سپس نوکلئوتیدها درون کپسول جا می‌گیرند و یک ویروس کامل بوجود می‌آید.(Bar:۴۵۰nm)

تصویر۵- ایجاد حفره هائی در لایه اپی درم زیر کوتیکول به همراه ذرات موجود (کتین، کربنات کلسیم و پروتیین) ایجاد پلاک‌های سفید در زیر کوتیکول می‌نمایند (Bar:۹۰۰nm)

و ژاپن ایجاد بیماری می‌کند(۱۲).

انـدازه ویروس جدا شـده از بیماری لکه سـفید (WSSD) شـبیه به ویروس ایجاد کننده بیماری MBV و BMNV می‌باشد. اما ویروس WSSD مقداری پهن تر و متراکم تر بوده و ضمناً ویروس MBV در هپاتوپانکـراس ایجاد بیمـاری می‌کنـد ولی ویـروس WSSD در هپاتوپانکراس میگو ایجاد بیمـاری نمی‌کنـد(۱۱). در صورتی که ویروس BMNV هم در مقایسـه با اندازه و هم از نظر بیماریزائی با ویروس WSSD متفاوت می‌باشد (۱۳).

عامـل ایجاد کننده بیماری لکه سـفید در میگوهای خانـواده پنائیده توسـط محققین مختلفی مورد بررسـی و مطالعه قرار گرفته است. در سال ۱۹۹۲ که اولین بار این بیماری در کشور چین گزارش شد اعلام گردید که بیماری به‌صورت مزمن بوده و معمولاً در مراحل اولیه رشد میگو و در زمانی که هوا نسـبتاً سرد است به وقوع می‌پیوندد تا اینکه Huang و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش کردند که این بیماری باعث تخریب سلول‌های هیپودرم و نکروز سـلول‌های هماتوپویتیک می‌شود و بیماری را Hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus (HHNBV) نامیدند (۸). مشخص گردید که عامـل HHNBV ویروسـی اسـت که انـدازه ویروس آن ۳۶۰ × ۱۲۰ نانومتـر و اندازه کپسـول آن ۸۲ × ۳۰۴ نانومتر می‌باشـد. در سال ۱۹۹۵، Chen گزارش کرد ویروسـی که در تایوان ایجاد بیماری لکه سفید می‌کند از خانـواده Baculoviridae بوده و طول آن ۲۲۰ نانومتر و قطر آن ۸۴ نانومتر می‌باشـد(۳). در سـال ۱۹۹۵ Chou و همکاران گزارش کردند ویروسـی ایجـاد کننـده بیماری در تایـوان بطور کلی انـدازه آن در طول ۳۳۰ ±۲۰ نانومتـر و در قطر ۸۷±۷ نانومتر می‌باشـد(۴). همچنین Wang و همکاران در سال ۱۹۹۵ در تایوان ویروس این بیماری را خالص و گزارش نمودنـد که قطـر آن ۷۰ – ۱۵۰ نانومتر و طـول آن ۲۵۰ – ۳۸۰ نانومتر می‌باشـد(۱۶). درژاپـن Takahashi و همکاران در سـال۱۹۹۴ ویروس را اندازه گیری و اندازه پوشش پروتیینی آنرا ۲۶± ۲۲۶ نانومتر در طول و ۶± ۸۴ نانومتـر در قطر گزارش نمودند(۱۴). در تایلند نیز ویروس ایجاد کننده بیماری لکه سـفید که آنرا SEMBV می‌نامند اندازه گیری و ویروس کامل ۲۹±۲۹۲ نانومتـر در طول و ۸± ۱۱۱ نانومتر در قطر و اندازه کپسـول آن ۲۸±۲۴۴ نانومتـر در طـول و ۱۱±۸۰ نانومتر در قطر اعلام نمودند(۷). در مالزی Wang در سـال ۲۰۰۰ اندازه ویروس لکه سـفید را گزارش و اعلام نمود ویروس کامل اندازه آن ۳۰±۳۰۵ نانومتر در طول و ۱۱± ۱۲۷ نانومتر در قطر و کپسـول آن ۲۵±۲۷۱ نانومتـر در طول و ۹± ۸۴ نانومتر در قطر می‌باشد.

در مقایسه با اندازه ویروس جدا شده در مطالعه حاضر مشخص می‌شود کـه در مناطق مختلف اندازه ویـروس متفاوت بوده و انـدازه ویروس جدا شـده در این گـزارش ۱۱± ۱۰۷ × ۸۷ ± ۲۴۸ برای ویـروس کامل و ۱۷ ±۵۹×۱۵±۱۶۲ برای کپسـول بوده که شبیه به ویروس SEMBV می‌باشد. تفاوت در اندازه سـویه های مختلف ویروس‌ها ممکن است ناشی از شرایط خاص آب و هوای هر منطقه باشد که ویروس‌ها خود را با آن شرایط تطبیق می‌دهند لیکن برای یافتن دلیل آن نیاز به تحقیقات بیشتر می‌باشد.

در سـال ۲۰۰۰، van Hulten و همـکاران بـر اسـاس تعیین ردیف بازهای ویروس لکه سفید و مطالعات فایلوژنی اعلام نمودند که این ویروس متعلق به خانواده جدیدی از ویروس‌ها به نام Whispoviridae می‌باشد که شبیه به خانواده Baculovirdae می‌باشد(۱۵). با توجه به اینکه این بیماری در ایران نیز در علائم ظاهری و علائم هیستوپاتولوژی شبیه به بیماری لکه سـفید گزارش شده در سایر مناطق می‌باشد ویروس شناسائی شده در این مطالعه نیز عامل بیماری لکه سفید و از خانواده Whispoviridae می‌باشد. پیشـنهاد میشـود به منظور شناسـائی دقیق ویروس مطالعات فایلوژنی بر روی ویروس انجام گرفته و بر این اسـاس کیتهای تشخیص سریع بیماری تولید گردد.

تشکر و سپاسگزاری

از ریاسـت محترم مرکز تحقیقات شیلاتی استان خوزستان برادر دکتر جاسم مرمضی و برادر دکتر بهروز تمجیدی از بخش بیماریهای آن مرکز که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه داشته اند تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱ - تخم افشـان، محمد و بهروز تمجیدی، ۱۳۸۲، علایم ظاهری و آسیب شناسی بافتـی بیماری لکه سـفید White Spot Syndrome Virus (WSSD) در میگوی پرورشـی سفید هندی (*Penaeus indicus*) در استان خوزستان، مجله علمی‌شیلات ایران،شماره ۲، صفحه ۱۵.

2- Adams J.R., Bonami J.R., .1991; Preparation of invertebrate viruses and tissues for examination. In J.R. Adams, and J.R. Bonami (eds.) Atlas of Invertebrate Viruses. Boca Raton: CRC Press, Inc., pp. 9-30.

3- Chen S.N., 1995; Current status of shrimp aquaculture in Taiwan in the special session on shrimp farming, Aquaculture 95, held in San Diego, California., 1-4 Feb. 1995: Proceeding swimming through trouble water (Eds) by Browdy C.L., Hopkins J.S., Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society.

4- Chou HY., Huang C.Y., Wang C.H., Chang H.C., Lo C.F., 1995; Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis.Aquat.Org. 23 :165-173.

5- Couch J.A., 1991; Nuclear polyhedrosis virus of invertebrates other than insect. In J.R. Adams and J.R. Bonamei (eds.) Atlas of Invertebrate Viruses. Boca Raton: CRC Press,Inc., pp. 205-226.

6- Flegel T.W., 1997; Special topic review: Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. World J. Microbiol Biotech 13:433-442.

7- Flegel T.W., Boonyaratplain S., Withyachumnamkul B., 1996; Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: LeRoy Creaawell R (ed) Book of abstracts. World Aquaculture 96 held in Bangkok, Thiland, Jen26-Feb 2, 1996; World Aqaculture Society. Harbor Branch Ocenographic Institute, Ft Pierce, FL, p126-127.

8- Huang J., Song X.L., Yu J., Yang C.H., 1995; Baculovirus hypodermal and hematopoietic necrosis–study on the pathogen and

pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. Mar Fish Res 16 (1):1-10

9- Hayat M.A., 1986; Basic techniques for transmission electron microscopy. California: Academic, Inc.

10- Kasornchandra J., Boonyaratpalin S., 1998; Primary shrimp cell culture applications for Studing white spot syndrome virus (WSS). In Flegel T.W.,(ed.) Advance in shrimp Biotechnology. Bankok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, pp. 273-276.

11- Lightner D.V., Redman R.M., Bell T.A., 1983; Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. J. Invertebr. Pathol. 42: 62-70.

12- Lightner D.V., 1996; A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.

13- Sano T., Nishimura T., Fukuda H., Hayashida T., Momoyama K., 1984; Baculovirus mid-gut gland necrosis (BMN) of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus)* larvae in Japanese intensive culture systems. Helgolander Meeresunters 37: 255-264.

14- Takahashi Y., Itami T., Kondo M., Maeda M., Fujii R., Tomonaga S., Supamattya K., Boonyaratpalin S., 1994; Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*). Fish Pathol. 29(2): 121-125.

15- van Hulten M.C.W., Tsai M.F., Schipper C.A., Lo C.F., Kou G.H., Valk J.M., 2000; Analaysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase and repeat regions.J. Virol. 81;307-316.

16- Wang C.H., Lo C.H., Leu J.H., Chou C.M., Yeh P.Y., Chou H.Y., Tung M.C., Chang C.F., Su M.S., Kou G.H., 1995. Purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) of *Penaeus monodon*. Dis. Aquat. Orga 23:239-242.

17- Wang Y.G., Lee K.L., Najiah M., Shariff M., Hassan M.D., 2000; A new baculovirus white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrom (WSS) caused by virus. Dis. Aquat. Org 41:9-18

18- Wongteerasupaya C., Vickers J.E., Sriurairatana S., Nash G.L., Akarajamrn A., Boonsaeng V., Panyim S., A. Tassanakajon A., Withachumnarnkul B., Flegel T.W., 1995; A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon* . Dis. Aquat. Org. 21: 69-77.