Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

Dietary supplementation of *Gracilaria corticata* extracts improved immunity of white leg shrimp exposed to white spot virus

Hossein Houshmand[1], Mina Ahangarzadeh[*2], Seyed Reza Seyed Mortezaei[3], Mehrdad Mohammadidoust[4], Shapoor Kakoolaki[5], Lefteh Mohseninejad[6]

1. South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: houshmand.hossein@gmail.com
2. Corresponding Author, South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: minaahangarzadeh@gmail.com
3. Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E-mail: rmortezaei@yahoo.com
4. South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: mmohammadidoust@yahoo.com
5. Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. E-mail: bsh443@gmail.com
6. South Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. E-mail: lmohseninejad@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 03.12.2022
Revised: 04.29.2022
Accepted: 04.30.2022

Keywords:
Algae,
Gracilaria corticata,
Immunity,
Vannamei,
White spot disease

ABSTRACT

In order to investigate the resistance of shrimp against white spot disease by *Gracilaria cortic*ata algae, 300 Vannamei shrimp in two groups were fed with and without algae extract for 14 days. At the end of the experiment, half of the shrimp of each group were exposed to the white spot virus. After the challenge, during days 0, 3, 9, 18 and 25, the survival rate and immune factors of shrimp were examined. According to the results, survival rate of shrimp fed with algae extract was higher than the shrimp were fed by commercial pellet without the algae extract (positive control) significantly ($P<0.05$). Immune system enhancement from the first to twenty fifth day and the highest levels of THC, TPP, SOD, POD and PO were observed in group Algae on twenty fifth day of the experiment. This condition was also observed in group AV, but less than group A with a significant difference ($P<0.05$). Considering the function of algae in stimulating the immune system, it seems that during the culture period, algae supplementation in the diet can be used as a proposed strategy to control white spot disease.

Cite this article: Houshmand, Hossein, Ahangarzadeh, Mina, Seyed Mortezaei, Seyed Reza, Mohammadidoust, Mehrdad, Kakoolaki, Shapoor, Mohseninejad, Lefteh. 2022. Dietary supplementation of *Gracilaria corticata* extracts improved immunity of white leg shrimp exposed to white spot virus. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (2), 101-117.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.20033.1637
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

بررسی اثر خوراکی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* بر سیستم ایمنی میگوی سفید غربی در مواجهه با ویروس لکه سفید

حسین هوشمند[۱] | مینا آهنگرزاده*[۲] | سید رضا سید مرتضایی[۳] | مهرداد محمدی دوست[٤] | شاپور کاکولکی[٥] | لفته محسنی‌نژاد[٦]

۱. پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: houshmand.hossein@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: minaahangarzadeh@gmail.com

۳. مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: rmortezaei@yahoo.com

٤. پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: mmohammadidoust@yahoo.com

۵. مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. رایانامه: bsh443@gmail.com

٦. پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران. رایانامه: lmohseninejad@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۱۲/۲۱
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۱/۰۲/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۲/۱۰

واژه‌های کلیدی:
ایمنی،
بیماری لکه سفید،
جلبک گراسیلاریا،
میگوی وانامی

چکیده

با هدف پیشگیری از بیماری لکه‌سفید میگو با استفاده از جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* (*Gracilaria corticata*)، تعداد ۳۰۰ عدد میگوی پیش مولد وانامی در دو گروه با عصاره جلبک (A) و دو گروه با غذای تجاری بدون عصاره (کنترل) به مدت ۱٤ روز تغذیه شدند. در پایان روز چهاردهم یک گروه از میگوهایی که با عصاره تغذیه شده بودند (AV) و یک گروه از میگوهای کنترل (کنترل مثبت) با ویروس لکه سفید مواجه شدند. پس از روز چهاردهم طی روزهای ۰، ۳، ۹، ۱۸ و ۲۵ میزان بازماندگی و فاکتورهای ایمنی میگوها بررسی گردید. براساس نتایج میگوهای تغذیه‌شده با عصاره جلبک در مواجهه با ویروس لکه سفید (AV) در مقایسه با میگوهای تغذیه‌شده با غذای تجاری بدون عصاره در مواجهه با ویروس (کنترل مثبت) به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) از بقا بیش‌تری برخوردار بودند (۲۲/۵ ± ۰/۵ b). افزایش فاکتورهای ایمنی از روز اول تا روز ۲۵ مشاهده و بیش‌ترین میزان فاکتورهای ایمنی THC، TPP، SOD، POD و PO در گروه A در روز ۲۵ آزمایش مشاهده شد. این وضعیت برای گروه AV نیز صادق بوده ولی میزان آن به نسبت گروه A کم‌تر و با هم اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵).

با توجه به عملکرد جلبک در تحریک سیستم ایمنی، به نظر می‌رسد می‌توان در طول دوره پرورش از مکمل جلبک در جیره غذایی به عنوان راهکاری پیشنهادی در کنترل بیماری لکه سفید استفاده نمود.

استناد: هوشمند، حسین، آهنگرزاده، مینا، سید مرتضایی، سید رضا، محمدی دوست، مهرداد، کاکولکی، شاپور، محسنی‌نژاد، لفته (۱۴۰۱). بررسی اثر خوراکی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* بر سیستم ایمنی میگوی سفید غربی در مواجهه با ویروس لکه سفید. *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۲)، ۱۱۷-۱۰۱.
DOI: 10.22069/japu.2022.20033.1637

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

ویروس لکه سفید عامل یک بیماری ویروسی با تلفات بالا در میگوهای پرورشی سراسر جهان محسوب می‌شود. در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۳۸۱ در منطقه چوئبده آبادان و سپس در سال ۱۳۸٤ در استان بوشهر در اغلب استخرها و مزارع مشاهده شد و باعث خسارت زیادی به پرورش‌دهندگان گردید (۱، ۲). پس از آن نیز طی سال‌های بعد بیماری به‌طور متناوب بروز کرد و باعث ضرر و زیان شدید به پرورش‌دهندگان گردید (۱، ۲، ۳).

بر اساس اطلاعات به‌دست آمده از آزمایش‌های خوراکی، مکان‌های اولیه تکثیر ویروس در میگوهای جوان ببری سیاه سلول‌های اپی‌تلیال زیر کوتیکولی معده و سلول های آبشش، تگومنت و بافت همبند هپاتوپانکراس می‌باشد (٤). در مطالعه دیگری در میگوی ژاپنی نشان داده شد که سلول‌های روده میانی ممکن است مکان انتقال ویروس‌های تکثیر شده باشد که از غشاء پایه عبور می‌کنند (۵). در یک مطالعه مواجهه‌سازی به روش خوراکی مشخص شد که بافت‌های اولیه تکثیر ویروس سلول‌های اپی‌تلیال روده قدامی، سلول‌های آبشش‌ها و در میزان بالای ویروس (۱۰۰۰۰SID50)، سلول‌های غدد آنتنی نیز هستند (٦). در سخت‌پوستان فقط ایمنی ذاتی بدون حافظه سرم‌شناسی وجود دارد. ایمنی ذاتی شامل سدهای فیزیکی، پاسخ سلولی و خونی است. کوتیکول سفت و مومی شکل در سخت‌پوستان به عنوان یک سد مکانیکی در برابر حمله عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند. فاکتورهای خونی به‌طور عمده از هموسیت‌ها منشاء می‌گیرند و طی پاسخ ایمنی آزاد می‌شوند. موادی که در طی پاسخ ایمنی خونی آزاد می‌شوند شامل: لکتین‌ها، آنزیم‌های دفاعی (فنل اکسیداز)، لیپوپروتئین‌ها، پپتیدهای ضدمیکروبی، پروتئین متصل شونده به بتا ۱،۳ گلوکان، پروتئین متصل‌شونده به لیپوپلی ساکارید[1]، پروتئین متصل‌شونده به پپتیدوگلیکان و میانجی‌های اکسیژن فعال هستند. هموسیت‌ها در ایجاد لخته، شناسایی ذرات خارجی، فاگوسیتوز، ملانیزه کردن، کپسوله کردن، کشندگی سلولی و ارتباطات سلول به سلول نقش دارند. مطالعات اخیر شواهدی از ایمنی ضدویروسی در میگوها را مشخص کرده است که مشتمل بر وجود گیرنده‌های شبه Toll[2]، تداخل RNA، مواد ضدویروسی در بافت‌ها و ژن‌های ایمنی می‌باشد. ماده ضد ویروس ترکیبی است که توانایی تکثیر ویروس را در هر مرحله‌ای از رونوشت‌برداری (اتصال، ورود، پوشش‌برداری، رونویسی، ترجمه و مونتاژ) سرکوب نماید (۷). اثر ضدویروسی پلی‌ساکاریدهای سولفاته استخراج شده از جلبک‌های دریایی در برابر ویروس‌های پستانداران در شرایط آزمایشگاهی به خوبی شناخته شده است (۷). پلی‌ساکاریدهای سولفاته محلول در آب که از اجزاء فراوان دیواره سلولی جلبک‌ها هستند ترکیبات ضدویروسی قوی هستند. ماکروجلبک‌های قهوه‌ای درمان مفیدی را در مواجهه با بسیاری از عفونت‌های حاصل از ویروس‌های پوشش‌دار ارائه می‌دهند. عمده‌ترین پلی‌ساکاریدهای استخراج شده از جلبک‌های دریایی عبارتند از: فوکوئیدان و لامیناران از جلبک‌های قهوه‌ای، کارآگینان‌ها از جلبک‌های قرمز و اولون از جلبک‌های سبز است. فوکوئیدان‌ها پلی‌ساکارید سولفاته با پایه فوکوز به‌طور عمده در جلبک دریایی قهوه‌ای یافت می‌شود و بیش از ٤۰ درصد وزن خشک دیواره‌های سلول جلبک را تشکیل می‌دهند (۸، ۹). فوکان‌های سولفاته (فوکوئیدان) از ٤۳ گونه جلبک قهوه‌ای استخراج می‌شوند. فوکوئیدان‌های

1- LPS
2- TLR

جلبک قهوه‌ای از لحاظ ساختاری بسیار پیچیده و هتروژن هستند (۱۰). در یک پژوهش فوکوئیدان استخراج‌شده از جلبک دریایی *سارگاسوم پلی‌سیستوم*[1] در جیره غذایی استفاده شد. میگوهایی که بیش‌ترین میزان فوکوئیدان در جیره غذایی (۱۰۰ ، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن میگو) را دریافت کرده بودند درصد بازماندگی بالایی را نشان دادند (۱۱). عصاره اتانولی بیس (۲- متیل هپتیل) فتالات[2] برگ‌های گیاه راش هندی نیز در یک جیره غذایی استفاده شد و اثرات ضدویروسی آن در میگوی ببری سیاه در برابر ویروس لکه سفید ارزیابی شد. میگوها برای مدت ٤ روز قبل و ۱۵ روز پس از چالش با ویروس لکه سفید با این جیره تغذیه شدند (روزانه ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم به ازای هر گرم وزن میگو). افزایش بازماندگی (۸۰-٤۰ درصد) در گروه حاوی بالاترین میزان عصاره مشاهده شد (۱۲). مکانیسم عمل فعالیت ضدویروسی عصاره این گیاهان در برابر ویروس لکه سفید مشخص نیست. ادعا شده است که یک پپتید بیان شده توسط فاژ در شرایط In vivo در خرچنگ درازآب شیرین و در شرایط آزمایشگاهی در کشت اولیه ارگان لنفوئیدی میگو در برابر ویروس لکه سفید مؤثر است (۱۳). جلبک‌ها منبعی از ترکیبات مفید و فعال زیستی هستند که تاکنون ترکیبات زیستی متعدد و با گستره کاربردی متنوعی هم‌چون اثرات آنتی‌بیوتیکی، ضدویروسی، ضد قارچی و ضد سرطانی از جلبک‌های پرسلولی شناسایی شده‌اند. استفاده از جلبک‌ها به‌عنوان ماده افزودنی در جیره غذایی آبزیان باعث بهبود شاخص‌های رشد، کیفیت بیوشیمیایی لاشه و پاسخ‌های فیزیولوژیک نسبت به استرس و بیماری می‌شود (١٤). خاصیت ضدویروسی جلبک‌ها را می‌توان به ترکیبات پلی‌ساکاریدی، تانن، فلاونوئید، فنل، برومونفل و کارتینوئیدها مرتبط دانست (۱۵، ١٦). از جمله جلبک‌های دارای خواص ضدویروسی علیه ویروس لکه سفید: *Momordica charantia*، *Lantana camara*، *Cynodon dactylon*، *Aegle marmelos*، *Phyllanthus amarus* می‌باشند، هم‌چنین استفاده از جلبک *گراسیلاریا تنیستیپیتات*[3] در برابر ویروس لکه سفید در میگوی پاسفید موجب بقای بیش‌تر و افزایش فاکتورهای ایمنی شده است (۱۷، ۱۸). گونه جلبک قرمز گراسیلاریا با نام علمی *گراسیلاریا کورتیکاتا*[4] می‌باشد. در این پژوهش در خصوص کنترل و پیشگیری از بیماری لکه سفید میگو با استفاده از جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا*، بررسی و مطالعه صورت گرفت. هم‌چنین میزان بازماندگی و بقا میگوهای تغذیه‌شده با این جلبک بررسی و مقایسه لازم صورت گرفته، فاکتورهای ایمنی THC، TPP، SOD، POD و PO در گروه‌های مختلف محاسبه و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

۳۰۰ عدد میگو با وزن متوسط ۲ ± ۱۵گرم از مزارع پرورش میگوی چوئبده آبادان در هنگام صید نهایی پس از بررسی از لحاظ سلامتی، عدم وجود نکروز روی سطح بدن و آنتن‌ها انتخاب شدند. بعد از مرحله سازگاری میگوها، به منظور بررسی عدم وجود ویروس‌های (WSSV, TSV, MBV, HPV, YHV, BP, IHHNV, IMNV) و باکتری ویبریو نسبت به غربالگری میگوها با استفاده از آزمایش PCR (کیت تجاری IQ2000 TM) اقدام شد. جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* مورد نظر پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل و با آب جاری شسته شد. سپس بر روی یک سطح شیب‌دار به مدت ٤٨ ساعت قرار

1- *Sargassum polycystum*
2- Bis (2-methylheptyl) phthalate
3- *G. tenuistipitate*
4- *Gracilaria corticata*

گرفت تا کاملاً خشک شود. به‌منظور استخراج عصاره جلبک از روش اسیدی استفاده شد. ابتدا جلبک‌های خشک‌شده به منظور بالا بردن تأثیر اسیدکلریدریک بر روی دیواره سلول‌های جلبکی آسیاب شدند. به ۲۰ گرم جلبک آسیاب شده ۲۰۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۱ مولار اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سپری شدن زمان لازم با استفاده از فیلتر مکشی با چشمه ۵۰۰–۴۵۰ میکرون سوسپانسیون فیلتر شد و با سود (NaOH) ۰/۵ مولار خنثی گردید، سپس با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و دو برابر حجم فاز رویی، الکل اتانول اضافه گردید. پس از رسوب‌گذاری مواد معلق در سوسپانسیون رسوب حاصله در درجه حرارت ۴۰–۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شد (۱۹).

میگوهای عاری از عوامل بیماری‌زا به ۲ گروه آزمایشی تقسیم‌بندی شدند: در گروه اول تعداد ۱۵۰ عدد به مدت ۱۴ روز با غذای معمولی (کنترل) و در گروه دوم نیز تعداد ۱۵۰ عدد با غذای حاوی جلبک (A) (به میزان ۱۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) به‌مدت ۱۴ روز تغذیه شدند. آب ورودی پس از آبگیری و ذخیره شدن و عبور از رسوب‌گیر و فیلتر شنی قبل از ورود به تانک‌های نگهداری میگوها با کلر به میزان ppm ۱۰ ضدعفونی شده و سپس وارد تانک‌ها می‌شد. تعویض آب روزانه تانک‌ها به میزان ۱۰ الی ۱۵ درصد و پساب خروجی بعد از ضدعفونی با کلر و گذشت زمان یک هفته به خارج از سالن منتقل می‌شد. پارامترهای دما، pH و اکسیژن محلول آب روزانه در دو نوبت صبح و عصر و شوری آب یک‌بار در روز در نوبت صبح، به‌وسیله دستگاه مولتی پارامتر (WTW) و با دقت ۰/۰۱ اندازه‌گیری و ثبت گردید. غذادهی به صورت روزانه به میزان ۵ درصد وزن توده زنده صورت می‌گرفت. به منظور تهیه ذخیره ویروس، میگوهای تلف شده از بیماری لکه سفید که از مزارع پرورش میگوی خوزستان، سیستان و بلوچستان و بوشهر جمع‌آوری و از نظر وجود ویروس لکه سفید تأیید شده بودند بر اساس روش افشارنسب و همکاران (۲۰۰۹) مورد استفاده قرار گرفتند. به روش ون هولتن (۲۰۰۰)، میزان LD_{50} ویروس تعیین شد (۲۰، ۲۱). در پایان روز چهاردهم تغذیه، میگوهای هر گروه (کنترل و A) به ۲ گروه (با ۳ تکرار ۲۵ تایی) تقسیم و به تانک‌های ۱۰۰۰ لیتری مجزا منتقل شدند (جدول ۱). یک گروه از میگوهای دریافت‌کننده جیره حاوی عصاره جلبک (AV) و یک گروه از میگوهای گروه کنترل (کنترل مثبت) با ویروس لکه سفید به روش غوطه‌وری مواجه شدند و در گروه‌های A و کنترل منفی میگوها با ویروس مواجه نشدند. علایم بالینی و تلفات تا ۱۰ روز بعد از مواجهه‌سازی ثبت شد (۲۲). به منظور اطمینان از آلوده بودن گروه‌های مواجه شده با ویروس طی روزهای ۱، ۳، ۵ و ۱۰ بعد از مواجهه با ویروس نسبت به انجام آزمایش PCR برای نمونه اقدام شد.

جدول ۱- روش اجرای گروه‌های آزمایشی.

گروه	تغذیه	مواجهه با ویروس	تعداد
۱ (A)	جیره حاوی عصاره جلبک	-	۳×۲۵
۲ (AV)	جیره حاوی عصاره جلبک	+	۳×۲۵
۳ (C^-)	جیره معمولی (کنترل منفی)	-	۳×۲۵
٤ (C^+)	جیره معمولی (کنترل مثبت)	+	۳×۲۵

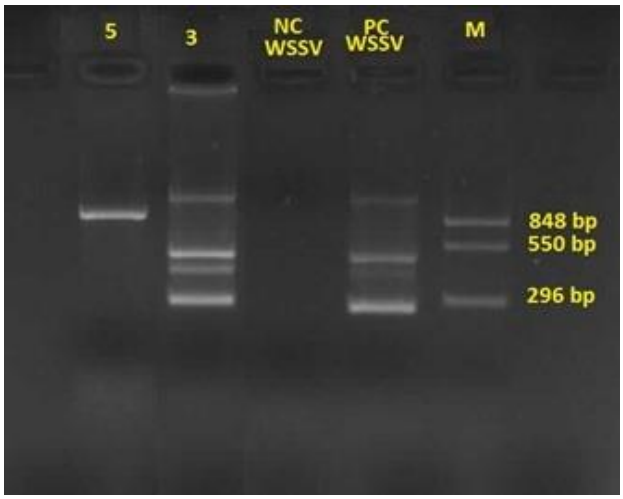
جهت بررسی تغییرات شاخص‌های ایمنی (هموسیت کل[1]، میزان پروتئین کل[2]، آنزیم پراکسیداز[3]، آنزیم سوپراکسیددیسموتاز[4]، آنزیم فنل اکسیداز[5]) از همولنف میگوها نمونه‌برداری گردید. نمونه‌گیری در روزهای صفر و ١٤ پس از تغذیه با جلبک (یا روز ۱ پس از چالش) و روزهای ۳، ۹، ۱۸ و ۲۵ پس از چالش با ویروس (پس از ١٤ روز تغذیه) از هر تکرار در هر بار نمونه‌برداری تعداد ۳ عدد میگو جهت اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی نمونه‌برداری شد. با استفاده از سرنگ انسولین با سوزن شماره ۲۵ پر شده با ۰/٤ میلی‌لیتر از محلول خنک الزویر اصلاح شده به عنوان ضدانعقاد از سینوس شکمی ۰/٦ میلی‌لیتر همولنف از میگو گرفته شد. شمارش هموسیت‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر و روش کاکولکی و همکاران، ۲۰۱۰ انجام شد (۲۳). برای اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز طبق دستورالعمل ساخت محلول اصلی واکنشی، مقادیر موردنیاز از محلول‌های مختلف تهیه و ۲۰ میکرولیتر از محلول نمونه، در دو ظرف و شاهد ۲ ریخته شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر آب به هر کدام از نمونه‌های شاهد ۱ و ۳ اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. بعدازآن، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از WST با هر یک از محلول‌ها مخلوط شد. در مرحله بعد، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌شده بافر، به هر یک از نمونه‌های شاهد ۲ و ۳ اضافه و مخلوط شد. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیم به نمونه شاهد ۱ اضافه و کاملاً مخلوط گردید. در پایان نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد، میکروپلیت‌ها در طول‌موج ٤٥۰ نانومتر قرائت گردید و مقدار SOD فعال (بر اساس درصد بازماندگی) محاسبه شد. اندازه‌گیری فنل اکسیداز بر اساس پروتکل هوانگ و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد (٢٤). برای اندازه‌گیری پروتئین کل پلاسما از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. دمای سانتریفیوژ ٤ درجه سانتی‌گراد و از هر گروه سه نمونه مخلوط ضد انعقاد و همولنف اخذ و سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی حذف شد و محلول حاصل پس از ٢٤ ساعت به صورت منجمد به آزمایشگاه ارسال گردید. در آزمایشگاه به روش آنالیز بیوشیمیایی توسط دستگاه اتوآنالایزر RA 1000 Technicon پروتئین پلاسما به روش Lowry سنجیده شد. در این آزمایش آلبومین سرم گاو[6] به عنوان استاندارد در نظر گرفته شد (۲۵). جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه استفاده شد، سپس وجود تفاوت معنی‌دار در

1- Total Hemocyte
2- Total Protein
3- Peroxidase Enzyme
4- Superoxide dismutase
5- Phenoloxidase Enzyme
6- BSA

داده‌های به دست آمده در سطح احتمال (P<۰/۰۵) به کمک پس آزمون دانکن، بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۹ استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از PCR پس از آزمایش مواجهه‌سازی نشان‌دهنده فرم حاد بیماری و وجود ویروس در میگوهای مواجهه شده با ویروس بود (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج PCR در نمونه‌های مختلف میگو.

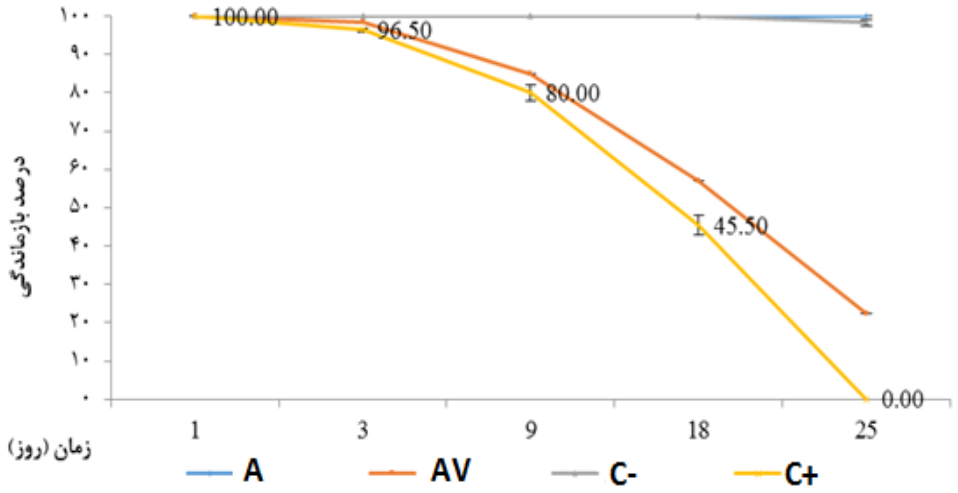
M- نشانگر، NC WSSV- کنترل منفی کیت، PC WSSV- کنترل مثبت کیت، ۳- میگوهای تغذیه‌شده با جلبک گراسیلاریا کورتیکاتا، ۵- کنترل منفی نمونه‌ها

بیش‌ترین میزان بقاء در گروه‌های ۱ و ۳ به ترتیب ۰/۰۰ ±۱۰۰ و ۹۸/۳۳±۰/۸۸ و کم‌ترین میزان بقا در گروه‌های ۲ و ٤ به میزان ۲۲/۵±۰/۵ و ۰/۰۰±۰/۰۰ بود. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که مصرف جلبک در میگوهای گروه ۲ که در مواجهه با ویروس بودند در مقایسه با گروه ٤ که جلبک مصرف نکرده بودند ولی با ویروس مواجه شدند به‌میزان ۲۲/۵ درصد بازماندگی از خود نشان داد (جدول ۲ و شکل ۲).

جدول ۲- درصد بازماندگی میگوهای پاسفید در گروه های مختلف.

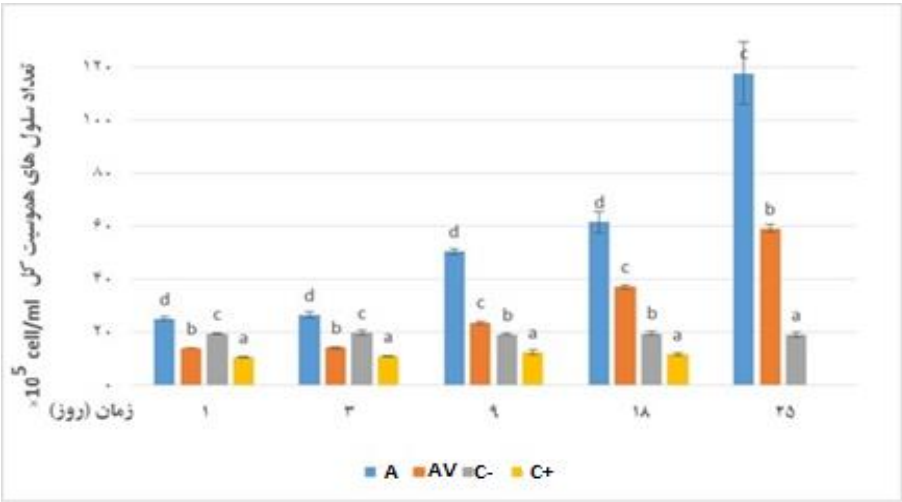
روز / گروه	۱	۳	۹	۱۸	۲۵
A (جلبک)	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]	۱۰۰ ± ۰/۰ [b]	۱۰۰ ± ۰/۰ [c]	۱۰۰ ± ۰/۰ [c]	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]
AV (جلبک/ویروس)	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]	۹۸/۵±۰/۵۰ [B]	۸۵ ± ۱/۰۰ [b]	۵۷ ± ۱/۰۰ [b]	۲۲/۵ ± ۰/۵ [b]
C^- (شاهد)	±۱۰۰ ۰/۰۰ [a]	۱۰۰ ± ۰/۰ [b]	۱۰۰ ± ۰/۰ [c]	۱۰۰ ± ۰/۰ [c]	۹۸/۳۳±۰/۸۸ [a]
C^+ (شاهد/ویروس)	۱۰۰ ± ۰/۰ [a]	۹٦/۵ ± ۰/۵ [a]	۸۰ ± ۰/۵ [a]	٤۵/۵ ± ۰/۲ [a]	۰ ± ۰/۰

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



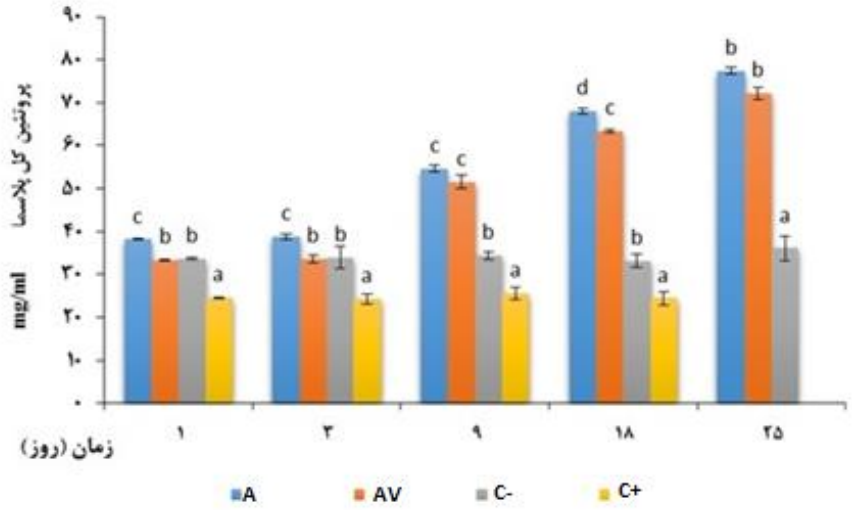
شکل ۲- مقایسه درصد بازماندگی در گروه آزمایشی شاهد و جلبک پس از مواجهه با ویروس.

در بررسی فاکتورهای ایمنی از روز اول تا روز ۲۵ پس از چالش افزایش مشاهده شد که بیش‌ترین میزان فاکتورهای ایمنی THC، TPP، SOD، POD و PO در گروه A در روز ۲۵ آزمایش مشاهده شد. این وضعیت برای گروه AV نیز مشابه بود ولی میزان آن در مقایسه با گروه A کم‌تر بود و با هم اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). برای گروه‌های کنترل منفی و مثبت نیز افزایش معنی‌دار فاکتورهای ایمنی در روزهای آزمایش دیده شد که با هم اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) داشتند. میزان هموسیت کل برای گروه‌های مختلف از روز اول آزمایش روند صعودی داشت به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان آن در گروه A (روز ۲۵) بود. میزان هموسیت کل در روزهای مختلف در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). کم‌ترین میزان هموسیت کل نیز در گروه کنترل مثبت مشاهده گردید. نتایج نشان می‌دهد که مصرف جلبک باعث افزایش میزان هموسیت کل در گروه‌های AV و A در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی و مثبت شد و مواجهه با ویروس موجب کاهش میزان هموسیت کل در گروه‌های AV و کنترل مثبت شد (شکل ۳).



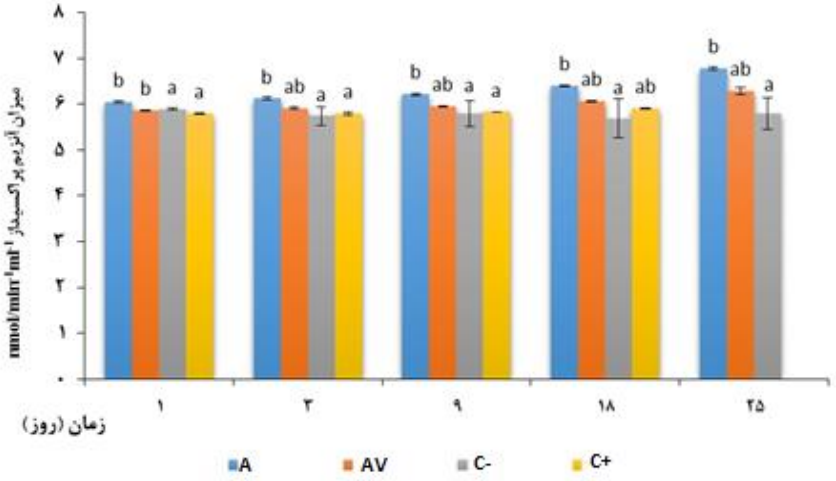
شکل ۳- مقایسه شاخص هموسیت کل در گروه آزمایشی شاهد و جلبک پس از مواجهه با ویروس.

پروتئین کل نیز در همه گروه‌ها روند افزایشی داشت. بیش‌ترین میزان در گروه AV و کم‌ترین میزان در گروه کنترل مثبت مشاهده شد که در همه گروه‌ها اختلاف معنی‌دار داشتند (P<۰/۰۵). نتایج نشان می‌دهد در گروه‌هایی که در جیره غذایی آن‌ها جلبک وجود داشت افزایش میزان پروتئین کل دیده شد و مواجهه میگوها با ویروس باعث کاهش پروتئین کل در گروه‌های A و کنترل مثبت گردید (شکل ٤).



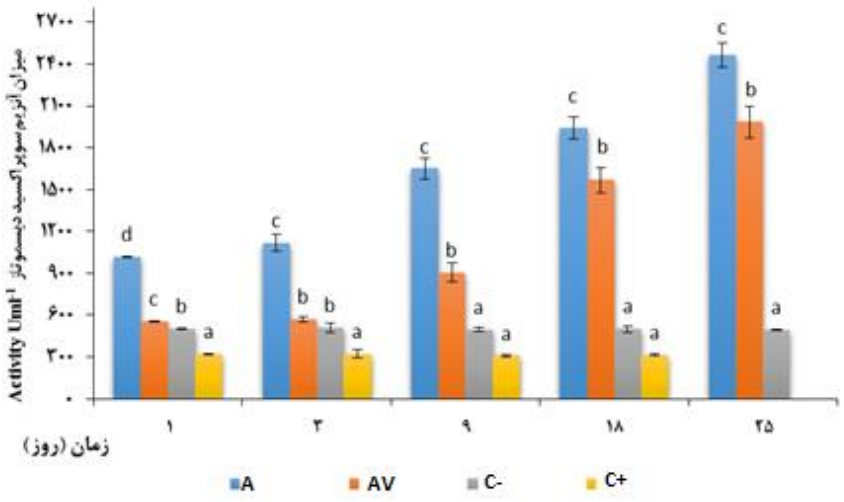
شکل ٤- مقایسه شاخص پروتئین کل در گروه آزمایشی شاهد و جلبک پس از مواجهه با ویروس.

آنزیم پراکسیداز در گروه‌ها افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) داشت. بیش‌ترین میزان در گروه A و کم‌ترین میزان در گروه کنترل مثبت مشاهده شد. میزان این آنزیم در گروه کنترل مثبت طی روزهای ۱، ۳ و ۹ با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی با روز ۱۸ اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج نشان داد که مصرف جلبک باعث افزایش آنزیم شد ولی مواجهه میگوها با ویروس باعث کاهش میزان این آنزیم در مقایسه با گروه‌های AV و کنترل مثبت شد (شکل ۵).



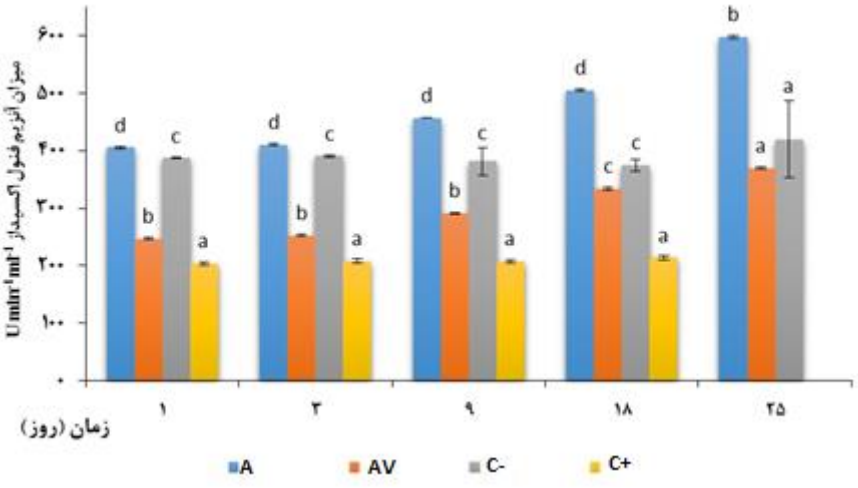
شکل ۵- مقایسه آنزیم پرواکسیداز در گروه آزمایشی شاهد و جلبک پس از مواجهه با ویروس.

میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در گروه‌های AV و A در مقایسه با گروه‌های کنترل منفی و مثبت به‌شدت افزایش یافت و اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین مقایسه گروه‌های AV و کنترل مثبت که با ویروس مواجهه شده با گروه‌های A و کنترل منفی که با ویروس مواجهه نشده بودند نشان می‌دهد که مواجهه ویروس موجب کاهش این آنزیم در مقایسه با گروه‌های مشابه بدون مواجهه (A و کنترل منفی) شده است (شکل ٦).



شکل ٦- مقایسه آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در گروه آزمایشی شاهد و جلبک پس از مواجهه با ویروس.

روند افزایشی آنزیم فنول اکسیداز در گروه‌های AV و A در مقایسه با گروه‌های کنترل مثبت و منفی کاملاً معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در گروه کنترل مثبت میزان این آنزیم در میگوهای مواجهه شده با ویروس و بدون مصرف جلبک در تمام روزها تغییرات معنی‌دار نشان ندادند (P<۰/۰۵) (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه آنزیم فنول اکسیداز در گروه آزمایشی شاهد و جلبک، قبل و پس از مواجهه با ویروس.

بحث و نتیجه‌گیری

موضوع بهداشت و بیماری‌های میگو یکی از مهم‌ترین چالش‌های صنعت پرورش میگو می‌باشد. در میان بیماری‌های ویروسی میگو بیماری لکه سفید خسارت زیادی به مزارع پرورشی وارد نموده و پرورش‌دهندگان از بابت این بیماری خسارت سنگینی متحمل شده‌اند. از سال ۱۹۹۲ که این بیماری بروز کرد تلفات بسیار زیادی در مزارع پرورش میگو در سراسر جهان بروز کرده است. جهت پیشگیری از این بیماری با اعمال شیوه‌های ایمنی زیستی مانند ضدعفونی‌کردن مزارع و آب، جلوگیری از ورود حاملین و ناقلین ویروس به مزارع پرورشی و ذخیره‌سازی استخرهای پرورشی با میگوها و پست لاروهای عاری از بیماری موجب کاهش خطرات ناشی از این بیماری شده‌اند. اعمال این شیوه‌ها در مزارع پرورشی موجب افزایش تولید نیز گردیده است (۲۶).

از مهم‌ترین روش‌ها می‌توان به استفاده از میگوهای عاری از عوامل بیماری‌زای خاص (SPF)، محرک‌های سیستم ایمنی، ایمنی زیستی و واکسیناسیون اشاره کرد. در بین محرک‌های سیستم ایمنی میگو می‌توان به عصاره گیاهان دریایی و مخمرها اشاره نمود (۲۷). اصلی‌ترین راه‌های ورود ویروس لکه سفید به میگو سلول‌های اپتلیال روده قدامی، آبشش، کوتیکول (٤) و روده میانی (٥) می‌باشد. مکانیسم‌های مختلفی ممکن است در خاصیت ضدویروسی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* نقش داشته باشند. به نظر می‌رسد که ترکیبات پلی‌ساکارید موجود در جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* با ویروس لکه سفید رقابت نموده و در این رقابت ویروس نمی‌تواند وارد سلول‌های میگو گردد (۲۸).

ویروس لکه سفید به گیرنده‌های سطح سلول‌ها متصل و سپس وارد سلول‌ها می‌شود (۲۸). یکی دیگر از الگوهای شناسایی ویروس گیرنده سی‌لکتین است که با پروتئین VP28 (یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های مؤثر در ورود ویروس لکه سفید) متصل می‌شود. سی‌لکتین دارای یک یا دو محل باند شدن در سطح سلول‌ها بوده و به کربوهیدرات‌ها نیز بسیار حساس می‌باشد. در صورت تغذیه میگو با جلبک گراسیلاریا، کربوهیدرات‌ها به محل سی‌لکتین متصل و مانع از چسبیدن VP28 ویروس لکه سفید شده و به این طریق مانع بیماری‌زایی ویروس می‌شوند (۲۹).

مطالعات صورت گرفته قبلی نیز تأیید می‌کند که جلبک‌های حاوی کربوهیدرات و فوکوئیدان شامل جلبک قهوه‌ای *Sargassum polycystum* (۱۱)، جلبک *Sargassum wightii* (۳۰) عصاره جلبک قرمز *Gracilaria tenuistipitata* (۳۱) و جلبک *Gracilaria fisheri* (۳۲) می‌توانند موجب کاهش تلفات ویروس لکه سفید شده و به‌نظر می‌رسد مکانیسم عمل جلبک استفاده شده در این پژوهش شبیه سایر جلبک‌های خانواده گراسیلاریا باشد. سلول‌های لنفاوی کل و تغییرات آن‌ها یکی از شاخص‌های مهم در استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی در میگو می‌باشد (۳۳) میزان تولید سلول‌های لنفاوی میگو در برابر تغییرات محیطی و یا استرس تغییر می‌کند (۳٤).

در این پژوهش میزان هموسیت کل میگوهای تغذیه شده با جلبک در مواجهه با ویروس کاهش یافت که این کاهش ممکن است ناشی از هجوم ویروس لکه‌سفید به بافت‌های سازنده سلول‌های لنفاوی و محدود کردن هماتوپویزیس و یا مهاجرت سلول‌های لنفاوی گرانولار، سمی گرانولار و هیالین

سل به بافت‌هایی که مورد هجوم ویروس قرارگرفته به‌منظور دفاع از بافت‌های آسیب‌دیده و مقابله با ویروس باشد. نتایج حاصله از پژوهش حاضر با نتایج پژوهش‌های انجام‌شده توسط بالاسوبرامانیان و همکاران (۲۰۰۸)، لین و همکاران (۲۰۱۱) و وونگپراسرت و همکاران (۲۰۱٤) همخوانی داشت، به‌طوری‌که این پژوهش‌گران پیشنهاد کردند که سولفات گالاکتان و کربوهیدرات موجود در گراسیلاریا موجب تحریک سیستم ایمنی میگو و هم‌چنین افزایش خاصیت ضدویروسی در مقابل ویروس لکه سفید می شود (۱۷، ۳۲، ۳۵).

پروتئین کل پلاسما یکی از مهم‌ترین پارامترهای دفاعی میگو می‌باشد، تعداد زیادی از الگوهای شناسایی گیرنده‌ها (PRRs) شبیه متصل‌کننده‌های پروتئین گرم منفی، لیپوپلی‌ساکارید یا متصل‌کننده‌های پروتئینی بتا ۱ و ۳ گلوکان، پروتئین حاوی تیواستر، پروتئین مرتبط با فیبرینوژن که در همولنف و هپاتوپانکراس یافت می‌شوند مرتبط با میزان پروتئین کل پلاسما هستند (۲۹). میزان پروتئین کل پلاسما نیز شبیه هموسیت کل یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده سلامتی میگوها می‌باشد (۲۲). در مطالعه حاضر میزان پروتئین کل پلاسما در گروه A که از غذای حاوی جلبک تغذیه شده بود بالاتر از میگوهایی بود که غذای مشابه مصرف نمودند ولی با ویروس لکه سفید مواجهه گردید (AV). این در حالی است که میگوهای تغذیه‌شده با غذای بدون جلبک (کنترل منفی) و میگوهای تغذیه‌شده با همین نوع غذا و مواجهه شده با ویروس لکه سفید (کنترل مثبت) از نظر میزان پروتئین کل پلاسما کاملاً اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$) و میزان آن‌ها با میزان پروتئین کل پلاسما در گروه AV و A نیز کاهش چشمگیری داشت و اختلاف معنی‌داری بود ($P<۰/۰۵$). افزایش میزان پروتئین کل پلاسما در گروه AV و A در مقایسه با کنترل مثبت و منفی ممکن است ناشی از فعالیت بالای بافت‌های همولنف ساز در میگوهای تغذیه‌شده با جلبک باشد. بر اساس گزارش چن و چنگ (۱۹۹۳)، تغییر در میزان پروتئین کل پلاسما به اندازه، سن، جنس، وضعیت تغذیه و شرایط محیطی بستگی دارد. احتمالا وجود جلبک موجب افزایش میزان الگوهای شناسایی گیرنده در همولنف گردیده و این فاکتورها می‌توانند در محافظت میگوها در مقابل با بیماری لکه سفید مؤثر باشند (۳٦).

فاکتور مؤثر دیگر آنزیم پراکسیداز موجود در پلاسما است که به‌شدت با مولکول‌های رادیکال آزاد اکسیژن ارتباط داشته و در زمان فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی در برابر هجوم ذرات خارجی می‌باشد (۳۷). ارگانل‌های پراکسیدزم حاوی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیداز و کاتالاز هستند که می‌توانند موجب حفاظت سلول‌ها از مواد تغییردهنده سلول‌ها مانند آب اکسیژنه، آب غیرسمی و رادیکال‌های اکسیژن آزاد باشد (۳۸). در پژوهش حاضر میزان پراکسیداز در سلول‌های اصلی این آنزیم با مصرف جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* در گروه A افزایش یافت هم‌چنان‌که یان و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کرده‌اند وقتی میگوهای تغذیه شده با جلبک با ویروس مواجه شدند، میزان آن در همولنف کاهش یافت (۳۹). در پژوهش حاضر میزان پراکسیداز در گروه A از روز اول تا روز ۲۵ افزایش یافت ولی در گروه AV میزان آن در همه روزها در مقایسه با A کاهش نشان داد. این نتایج با نتایج پژوهش‌های یان و همکاران (۲۰۱۰) و وانگ و همکاران (۲۰۱۲) همخوانی دارد (۳۸، ۳۹).

یکی از آنزیم‌های مؤثر دیگر در واکنش‌های دفاعی میگوها آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز است که به‌طور وسیعی در بافت‌های هوازی و غیر هوازی پدید می‌آید و در بررسی سلامتی میگوها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. میزان سوپراکسیداز دیسموتاز در پژوهش حاضر در گروه A که با جلبک تغذیه‌شده بود در مقایسه با همه گروه‌ها میزان آن در هر روز افزایش نشان داد و به‌طور معنی‌داری با میزان آن در سایر گروه‌ها اختلاف داشت (P<۰/۰۵). بر اساس گزارش پاچکو و همکاران (۲۰۱۱) میگوهای تغذیه‌شده با بتا ۱ و ۳ گلوکان، ویتامین E و بتاکاروتن افزایش معنی‌داری در میزان سوپراکسیداز دیسموتاز در هپاتوپانکراس و عضلات بعد از ۱۲ و ۲٤ ساعت نشان دادند ولی در مواجهه با ویروس میزان آن کاهش یافت (٤۰). نتایج پژوهش پاچکو و همکاران (۲۰۱۱) و چانگ و همکاران (۲۰۰۳) نشان می‌دهد که مصرف محرک‌های سیستم ایمنی موجب افزایش سوپراکسیداز دیسموتاز در میگوی ببری سیاه شده و وقتی با پاتوژن‌هایی مثل ویروس لکه سفید مواجهه می‌گردند کاهش می‌یابد و با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همخوانی دارد (٤۰).

آنزیم دیگری که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفت، آنزیم فنل‌اکسیداز است. سیستم پروفنل اکسیداز یکی از اجزا سیستم دفاعی میگو است که در شناسایی اجزا غیرخودی نقش بسیار اساسی دارد (٤۱). این آنزیم توسط پلی‌ساکارید دیواره باکتری‌ها و بتا ۱ و ۳ گلوکان دیواره قارچ‌ها فعال می‌گردد. هم‌چنین عصاره تعداد زیادی از گیاهان دارویی مانند *Aegle marmelos*، *Cyanodon dactylon*، *Tinospora cordifolia*، *Picrorhiza kurooa* و *Eclipta alba* برای مواجهه با ویروس لکه سفید مورد آزمایش قرار گرفته و همه آن‌ها سیستم پروفنل اکسیداز را فعال و موجب افزایش آنزیم فنل اکسیداز گردیده‌اند (٤۲). در پژوهش حاضر آنزیم فنل اکسیداز در گروه A به دلیل مصرف جلبک و ترکیب پلی‌ساکارید موجود در آن افزایش یافت، این در حالی است که در گروه AV پس از مواجهه با ویروس لکه سفید بخشی از آنزیم فنل اکسیداز به‌دلیل مقابله با ویروس لکه سفید کاهش یافت. نتایج حاصل از این پژوهش با پژوهش صورت گرفته توسط چن و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد که عصاره جلبک *گراسیلاریا تنیستیپیتات*را در میگوی سفید غربی بررسی نمودند و نتایج نشان داد که فاکتورهای ایمنی شبیه فنل اکسیداز فعال ولی در مواجهه با استرس میزان آن کاهش می‌یابد (٤۳).

در مطالعه حاضر در زمان تغذیه میگوها با جیره حاوی جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* میزان بالائی از پراکسیداز تولید شد ولی وقتی با ویروس مواجه شدند میزان آن کاهش یافت. این نتایج با مطالعه سان و همکاران (۲۰۱۵)، لین و همکاران (۲۰۱۱) و ونیینگ و همکاران (۲۰۰۷)، همخوانی دارد. با توجه به بررسی صورت گرفته در این پژوهش و مقایسه یافته‌های حاضر می‌توان عنوان نمود که عصاره جلبک *گراسیلاریا کورتیکاتا* دارای قدرت محافظت‌کنندگی در برابر ویروس لکه سفید می‌باشد (۱۷، ٤٤، ٤٥).

منابع

1. Afsharnasab, M., Mortezaei. S.R., Ahangarzadeh, M., Houshmand, H., Kor, N., Jorfi, E., Sabzalizadeh, S., and Mohseni, L. 2009. Assessing the health and diseases status of shrimp breeding centers in Iran, Iranian Fisheries Science Research Institute (In Persian)
2. Afsharnasab, M., Mortezaei, S.R., Eskandari, Gh., Kor, N., Jorfi, E., and Lalouei, F. 2006. Investigation and determination of white spot disease Source in farmed shrimps in Abadan. Iranian Fisheries Science Research Institute, 75p. (In Persian)
3. Statistical Yearbook, 2019. The amount of farmed shrimp. Iran Fisheries Organization. 64p. (In Persian)
4. Chang, P.S., Chen, H.C., and Wang, Y.C. 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture. 164: 233-242.
5. Di Leonardo, V.A., Bonnichon, V., Roch, P., Parrinello, N., and Bonami, J.R. 2005. Comparative WSSV infection routes in the shrimp genera Marsupenaeus and Palaemon. Journal of Fish Diseases. 28: 565-569.
6. Escobedo-Bonilla, C.M., Wille, M., Alday-Sanz, V., Sorgeloos, P., Pentair, M.B., and Nauwynck, H.J. 2007. Pathogenesis of a Thai strain of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF Litopenaeus vannamei. Diseases of Aquatic Organisms. 74: 85-94.
7. Witvrouw, M., and De Clercq, E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. General Pharmacology. 29: 497-511.
8. Eluvakkal, T., Sivakumar, S.R., and Arunkumar, K. 2010. Fucoidan in some Indian brown seaweeds found along the Coast Gulf of Mannar. International Journal of Botany. 6: 2. 176-81.
9. Patankar, M.S., Oehninger, S., Barnett, T., Williams, R.L., and Clark, G.F. 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. Journal of Biological Chemistry, 268: 29. 21770-6.
10. Berteau, O., and Mulloy, B. 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. Glycobiology, 13: 29-40.
11. Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K., and Phongdara, A. 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture. 233: 23-30.
12. Rameshthangam, P., and Ramasamy, P. 2007. Antiviral activity of bis (2-methylheptyl) phthalate isolated from *Pongamia pinnata* leaves against White spot syndrome virus of *Penaeus monodon* Fabricus. Virus Research, 126: 38-44.
13. Yi, G., Qian, J., Wang, Z., and Qi, Y. 2003. A phage-displayed peptide can inhibit infection by white spot syndrome virus of shrimp. Journal of General Virology, 84: 2545-2553.
14. Jaime Ceballos, B., Villareal, H., Garcia, T., Pérez Jar, L., and Alfonso, E. 2005. Effect of Spirulina platensis meal as feed additive on growth, survival and development in *Litopenaeus schmitti* shimp larvae. Rev. Invest. Mar. 26: 3. 235-241.
15. Rajasekar, T., Deivasigamani, B., Kumaran, S., Sakthivel, M., Balamurugan, S., Jothi, E.G., and Priyadharshini, P. 2012. Antibacterial Activity of Cultivated Marine Seaweeds against Fish pathogenic bacteria Vibrio harvey. Asian Pac. J. Trop. Biomed. pp. 1-5.
16. Rodriguez-Bernaldo De Quiros, A., Lage-Yusty, M., and Lopez-Hernandez, J. 2010. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. Food Chem. 121: 634-638.
17. Lin, Y.C., Yeh, S.T., Li, C.C., Chen, L.L., Cheng, A.C., and Chen, J.C. 2011. An immersion of Gracilaria tenuistipitata extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology, 31: 1239-1246.

18. Balasubramanian, G., Sarathi, M., Rajesh Kumar, S., and Sahul Hameed, A.S. 2007. Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. Aquaculture. 263: 15-19.
19. Shiroma, R., KoniShi, T., Uechi, S., and TaKo, M. 2008. Structural study of fucoidan from the brown seaweed Hizikia fusiformis. Food science and technology research. 14: 176-182.
20. Afsharnasab, M., Mortezaei, R., Yegane, V., and Kazemi, B. 2009. Gross sign, histopathology and polymerase chain reaction observations of white spot syndrome virus in shrimp specific pathogen free *Litopeneaus vannamei* in Iran. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 4: 297-305.
21. Van Hulten, MC.W., Tsai, M.F., Schipper, C.A., Lo, C.F., Kou, G.H., and Valk, J.M. 2000. Analysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase genes and repeat regions, J. Gen. Virol. 81: 307-316.
22. Yoganandhan, K.S.S., Murugan, V., Narayanan, R.B., and Sahul Hameed, A.S. 2003. Screening the organs for early detection of white spot syndrome virus in *Penaeus indicus* by histopathology and PCR techniques. Aquaculture, 215: 21-29.
23. Kakoolaki, S., Sharifpour, I., Soltani, M., Ebrahimzadeh Mousavi, H., Mirzargar, S., and Rostami, M. 2010. Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp, *Fenneropenaeus indicus* in Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 9: 219-232.
24. Huang, J., Yang, Y., and Wang, A. 2010. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 28: 240-244.
25. Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
26. Valderrama, D., and Anderson, J.L. 2011. Shrimp production review. Food and Resource Economics Department, University of Florida, USA. Santiago, Chile, November 6-9.
27. Afsharnasab, M., Houshmand, H., Ahangarzadeh, M., and Mortezaei, S.R., 2016. Assessing the sustainability of western white leg shrimp white spot disease vaccinated and fed with yeast and algae Sacchromayces cerevisiae *Gracilaria corticata* in the face of white spot disease virus, Iranian Fisheries Science Research Institute, 110p. (In Persian)
28. Verbruggen, B., Bickley, L.K., Van Aerle, R., Bateman, K.S., Stentiford, G.D., Santos, E.M., and Tyler, C.R. 2016. Molecular Mechanisms of White Spot Syndrome Virus Infection and Perspectives on Treatments. Viruses 8, 23: 1-29.
29. Wang, X.W., and Wang, J.X. 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. Fish & Shellfish Immunology, 34: 981-989.
30. Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S., and Palavesam, A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed Sargassum wightii on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish and Shellfish Immunology. 32: 551-564.
31. Sirirustananun, N., Chen, J.C., Lin, Y.C., Yeh, S.T., Liou, C.H., Chen, L.L., Sim, S.S., and Chiew, S. 2011. Dietary administration of a Gracilaria tenuistipitata extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology. 31: 848-855.
32. Wongprasert, K., Rudtanatip, T., and Praiboon, J. 2014. Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed Gracilaria fisheri and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. Fish & Shellfish Immunology, 36: 52-60.

33. Wang, F.I., and Chen, J.C. 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to Photobacterium damselae subsp. damselae. Fish Shellfish Immunol. 20: 671-81.
34. Kumar, S., Ahamed, V., Sarathi, M., Basha, A., and Hameed, A. 2008. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). Fish and Shellfish Immunology, 24: 4. 467-478.
35. Balasubramanian, G., Sarathi, M., Venkatesan, C., Thomas, J., and Sahul Hameed, A.S. 2008. Studies on the immune modulatory effect of extract of Cyanodon dactylon in shrimp, *Penaeus monodon*, and its efficacy to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). Fish & Shellfish Immunology, 25: 820-828.
36. Chen, J.C., and Cheng, S.Y. 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonieus* based on sex, size and moulting cycle. Comp Biochem Physiol. 106B: 293-296.
37. Le Moullac, G., and Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture, 191: 121-131.
38. Wang, D.L., Zuo, D., Wang, L.M., Sun, T., Wang, Q., and Zhao, Y.L. 2012. Effects of white spot syndrome virus infection on immuno-enzyme activities and ultrastructure in gills of *Cherax quadricarinatus*. Fish and Shellfish Immunology. 32: 645-650.
39. Yan, X., Jie, A., Jing-Qiu, S., Ya-Dong, Y. and Jun-Qiang, Y. 2010. Cytochemical location of superoxide dismutase and peroxidase in different tissues of *Litopenaeus vannamei*. Acta Hydrobiologica Sinica, 34: 2. 402-409.
40. Pacheco, R., Ascencio, F., Zarain, M., Gómez, G., and Campa, A. 2011. Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β-1.3 glucan vitamin E, and β-carotene and infected with white spot syndrome virus. Lat. Am. J. Aquat. Res. 39: 3. 534-543.
41. Van De Braak, C.B.T. 2002. Haemocytic defence in black tiger shrimp (Penaeus monodon). PhD thesis, Wageningen University, Wageningen Institute of Animal Sciences. PO Box 338, 6700 AH Wageningen, The Netherlands., 168p.
42. Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., and Murugan, V. 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish and Shellfish Immunology, 21: 372-384.
43. Chen, Y.Y., Chen, J.C., Lin, Y.C., Yeh, S.T., and Huang, C.L. 2015. White Shrimp *Litopenaeus vannamei* That Have Received *Gracilaria tenuistipitata* Extract Show Early Recovery of Immune Parameters after Ammonia Stressing. Mar. Drugs. 13: 6. 3606-3624.
44. Sun, C.B., Wang, G., and Chan, S.F. 2015. Effects of artificial infection of Litopenaeus *vannamei* by *Micrococcus lysodeikticus* and WSSV on the activity of immunity related enzymes. Fish and Shellfish Immunology, 46: 778-786.
45. Wen-Ying, S., Hui-Jun, Y., Hui-Feng, K.E., and Lan, Q.I. 2007. Effect of β-glucan on Enzyme Activity of Immunity in Pacific White Leg Shrimp *Litopenaeus vannmei*. Fisheries Science, 2007-07.