



بهبود شاخص‌های ایمنی همولنف میگوی پاسبید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با تغذیه از پودر برگ حرا (*Avicennia marina*) در شرایط استرس دمایی پایین

معصومه اسحق نیم‌وری، آرش اکبرزاده*، ایمان سوری نژاد

گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۷/۰۲/۲۹	
اصلاح: ۹۷/۰۶/۲۱	
پذیرش: ۹۷/۱۲/۰۲	
کلمات کلیدی:	
ایمنی	
حرا	
میگو	
هموسیت	

مطالعه حاضر به منظور بررسی تأثیر تغذیه‌ای پودر برگ حرا (*Avicennia marina*) بر بهبود شاخص‌های ایمنی همولنف میگوی پاسبید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در شرایط استرس دمایی پایین صورت گرفت. پس از ۹۰ روز غذاهای با سطوح مختلف پودر برگ حرا (صفر، ۲/۵، ۵، و ۱۰ درصد)، دما تدریجاً طی شش ساعت از ۲۴ به ۲-۳ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. بعد از ۲۴ ساعت بازماندگی محاسبه و از سه میگوی زنده‌ی هر تیمار برای سنجش پارامترهای خونی، همولنف گرفته شد. نتایج نشان داد تعداد هموسیت کل (THC) در تیمار ۵٪ به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). در شمارش افتراقی هموسیت‌ها تعداد سلول‌های نیمه دانه‌دار در میگوهای تغذیه شده با پودر برگ حرا نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < 0.05$). سلول‌های دانه‌دار بزرگ و هیالین در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار ۲/۵ و ۱۰ درصد بود ($P < 0.05$)، اما با تیمار ۵ درصد اختلاف معنی‌داری نداشت. در مجموع، تغذیه با سطوح مختلف پودر برگ حرا بویژه به میزان ۵ درصد موجب بهبود شاخص‌های ایمنی و بازماندگی میگوی پاسبید غربی (*L. vannamei*) در شرایط استرس دمایی پایین شد.

مقدمه

آبزی‌پروری یکی از بخش‌های مهم تولید غذای مورد نیاز بشر است و صنعتی است که به سرعت در جهان در حال گسترش است. در بین آبزینان سخت‌پوستان جزء گونه‌های مهم آبزی‌پروری به شمار می‌روند (FAO, 2012). میگوهای خانواده Penaeidae و جنس *Penaeus* در آب‌های گرمسیری و نیمه گرمسیری یافت می‌شوند. میگوی پاسبید غربی به دلیل رشد سریع، نیاز پروتئینی کمتر نسبت به سایر گونه‌های میگو، تحمل بالای شرایط محیطی (تراکم بالا، دامنه وسیع شوری و دما) و مقاومت در برابر بیماری‌ها مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین گونه میگوی پرورشی محسوب می‌شود (Huang et al., 2014). میگوها در سیستم‌های پرورش متراکم اغلب در شرایط استرس‌زا قرار می‌گیرند. برای دستیابی به موفقیت در پرورش میگو باید به عوامل زیادی توجه داشت. در بسیاری از کشورها، عفونت‌های باکتریایی و ویروسی، ضررهای جبران‌ناپذیری را به تولید میگوهای Penaeidae وارد کرده است. بیماری‌های میگو نتیجه ارتباطی پیچیده بین میگو، عامل بیماری‌زا و محیط زیست می‌باشد و سلامت میگو تحت تأثیر طیف وسیعی از عوامل استرس‌زای محیطی از جمله pH، شوری، دما و اکسیژن محلول قرار دارد. سوء مدیریت در این زمینه می‌تواند موجب کاهش ایمنی و در نتیجه بروز بیماری‌ها در میگو شود (Perazzolo et al., 2014).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: akbarzadeh@ut.ac.ir

2002). تغییرات محیطی باعث ایجاد شرایط تنش‌زا شده و آسیب‌پذیری میگو را نسبت به فلور طبیعی باکتریایی افزایش می‌دهد. همچنین استرس دمای پایین اثرات سوئی بر بسیاری از سخت‌پوستان بویژه میگوها داشته است. دما یکی از عوامل استرس‌زا در میگوها به شمار می‌رود که می‌تواند بر بقا، رشد، توان تولیدمثلی، پوست‌اندازی، عملکرد فیزیولوژیک و سیستم ایمنی میگو اثرگذار باشد. مطالعات گذشته نشان داده است که دمای پایین با اثر بر روی فعالیت‌های میتوزی بافت خون‌ساز، موجب تغییر هموسیت‌های کل و درصد هموسیت‌های افتراقی در همولنف میگو شده و در نهایت کاهش عملکرد سیستم ایمنی را به همراه داشته است (Luo *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010). هموسیت‌ها نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی میزبان بازی می‌کنند که از آن جمله می‌توان به شناسایی اجرام بیماری‌زا، فاگوسیتوز، تولید ملانین و مسمومیت سلولی اشاره کرد. این سلول‌ها بر اساس نسبت هسته به سیتوپلاسم، تعداد گرانول، نوع رنگ و اندازه به سه دسته تقسیم می‌شوند که شامل سلول‌های هیالینه (HC)، سلول‌های نیمه گرانولار (SGC) و سلول‌های گرانولار (LGC) هستند. این هموسیت‌ها اغلب به‌طور دائم با هموسیت‌های جدید در همولنف جایگزین می‌شوند. تعداد هموسیت‌ها در گونه‌های مختلف سخت‌پوستان و با توجه به ویژگی‌های فردی موجود و شرایط مختلفی که گونه‌ای از سخت‌پوستان در آن قرار دارند، متفاوت خواهد بود (Soltani, 2008).

وضعیت تغذیه‌ای یکی از عوامل مؤثر بر توانایی موجود در مقابله با عوامل تنش‌زا و بیماری‌زا محسوب می‌شود. امروزه به منظور جلوگیری از بروز بیماری‌ها و درمان آن‌ها در سیستم‌های متراکم پرورشی تحت استرس، از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Barman *et al.*, 2013). استفاده بیش از حد از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش مقاومت بدن به داروها و کاهش عملکرد سیستم ایمنی، بالا رفتن مقاومت باکتری‌ها، آلودگی محیط‌زیست و باقی ماندن بقایای سمی آن‌ها در بدن آبی می‌شوند. همچنین در انسان موجب بروز اثرات سمی، واکنش‌های حساسیت‌زا، شیوع عفونت‌های ثانویه و اختلال در سوخت‌وساز می‌گردد (Immanuel *et al.*, 2012). راهکارهای مختلفی برای کاهش نیاز به استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از این رویکردها استفاده از مکمل‌های غذایی است که علاوه بر افزایش رشد، اثرات سودمندی بر ایمنی میزبان و ایجاد مقاومت در برابر استرس و عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کند (Hosseinifar *et al.*, 2010). مکمل‌های غذایی با پایه طبیعی مانند گیاهان، دارای حداقل اثرات سوء ذکر شده می‌باشند. از مزیت‌های ترکیبات گیاهی راحتی جذب در دستگاه گوارش آبریان، بالا نبودن هزینه تولید آن‌ها، دامنه وسیع تأثیر بر پاتوژن‌ها و اینکه بسیاری از آن‌ها از راه افزوده شدن به جیره به موجود داده می‌شوند می‌باشد. این ترکیبات قابلیت تجزیه شدن در بدن آبریان را دارند و همانند آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن آن‌ها باقی نمی‌مانند (Kumar Bairwa *et al.*, 2012). خوشبختانه استراتژی استفاده از ترکیب‌های گیاهی در غذای آبریان پرورشی موفقیت‌آمیز بوده و توانسته است باعث افزایش حجم تولید شود (Gatlin *et al.*, 2007).

گیاهان مانگرو درختان یا درختچه‌هایی هستند که در کرانه‌های کم شیب و دانه‌ریز نواحی جزر و مدی گرمسیری و همچنین حاشیه مصب‌ها حد فاصل عرض‌های ۳۰ درجه شمالی تا ۲۰ درجه جنوبی پراکنش دارند و با زندگی در آب‌های شور و لب‌شور با تناوب غرقابی سازگار شده‌اند (Shelar *et al.*, 2012). جنگل‌های مانگرو در سواحل جنوبی کشور در کناره خلیج فارس و دریای عمان در مناطق متعددی حد فاصل مدارهای ۲۵ درجه و ۱۱ دقیقه تا ۲۷ درجه و ۵۲ دقیقه در کرانه استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان و بوشهر از خلیج گواتر تا سردخون گسترش یافته‌اند (Soleimani *et al.*, 2015). گونه حرا *Avicennia marina* (Forsk) Vierh از تیره شاه‌پسند *Verbenaceae* یا *Avicenniaceae*، جنس *Avicennia* می‌باشد. این گونه به‌عنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو می‌باشد که نسبت به سایر گونه‌ها بیشترین مقاومت را نسبت به تغییرات دمای هوا و میزان شوری نشان می‌دهد (Camai *et al.*, 2017).

ترکیبات شیمیایی و زیست‌فعال حرا می‌توانند به‌عنوان عوامل ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد اکسیدان و ضد التهاب، در ارتباط با مواد غذایی و دارویی استفاده شوند (Dhayanithi *et al.*, 2013). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که گیاه حرا همچنین منبع غنی از ترکیبات ضد اکسیدان است و مشخص شده است که ویتامین C و E و اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در آن‌ها از جمله ترکیباتی هستند که باعث افزایش مقاومت جانوران شامل ماهی و میگو به عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Hagian *et al.*, 2017).

از تحقیقات انجام شده در زمینه تأثیر عصاره برگ گیاه حرا در میگو می‌توان به مطالعه بر روی لارو میگوی *P. monodon* (Gatune *et al.*, 2012) اشاره داشت.

با توجه به این که در مزارع پرورش میگو استرس‌های محیطی مانند شوری، دما، pH و غیره نیز وجود دارد، آزمایش‌های اندکی در مورد تأثیر استرس دمایی پایین در میگو انجام شده است (Cheng and chen, 2000; Jiravanichpaisal *et al.*, 2004). هدف از مطالعه حاضر ارزیابی استفاده از سطوح مختلف پودر برگ حرا در جیره غذایی بر تحریک سیستم ایمنی و تأثیر بر بازماندگی میگوی پاسفید غربی در برابر استرس دمایی بوده است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در یک دوره ۹۰ روزه، از آبان تا بهمن ماه سال ۱۳۹۵ روی میگوهای با میانگین وزنی $5/26 \pm 0/21$ گرم و طول $8/59 \pm 0/73$ سانتی‌متر در کارگاه بازسازی ذخایر آبزیان کلاهی وابسته به اداره کل شیلات استان هرمزگان انجام شد. مواد اولیه مورد استفاده در جیره غذایی میگوها به صورت خلاصه در جدول ۱ ارائه شده است. برگ حرا (*A. marina*) از منطقه تیاب میناب واقع در استان هرمزگان جمع‌آوری شد و همچنین پودر برگ حرا جهت آنالیز به آزمایشگاه فرستاده شد (جدول ۲). جیره‌های غذایی آزمایشی شامل سطوح شاهد، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪ از پودر برگ حرا بودند (Es-haghi Nimvari, 2018). بعد از گذشت ۹۰ روز از تغذیه میگوها با جیره حاوی پودر برگ گیاه حرا میگوها در معرض شوک دمایی قرار داده شدند. میانگین وزن میگوها قبل از شروع تست در هر تیمار به ترتیب شامل $11/7 \pm 0/20^b$ ، $13/62 \pm 0/48^a$ ، $13/55 \pm 0/41^a$ و $13/13 \pm 0/24^a$ می‌باشد. لازم به ذکر است تمامی شرایط به‌گونه‌ای اجرا گردید که شرایط محیطی تأثیری بر روی آزمایش نداشته باشد. به دلیل عدم تمایل میگو به خوردن غذا و انباشته نشدن مواد آلی به علت عدم تعویض آب در حین انجام استرس، غذایی یک نوبت در روز متناسب با تعداد میگو انجام شد. هوادهی نیز در طی آزمایش استرس صورت گرفت.

تست استرس دما

تعداد هشت قطعه میگو از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب و در ظرف‌های پلاستیکی با گنجایش ۵۰ لیتر در دو تکرار برای هر تیمار قرار داده شدند و به تدریج در معرض استرس دمایی پایین قرار گرفتند. بدین منظور آب با دمای مورد نظر به وسیله‌ی کیسه‌های یخ بسته‌بندی شده (کاهش دمای آب) تهیه شد. دمای آب به‌طور مستمر توسط دماسنج جیوه‌ای ثبت می‌گردید. دما به تدریج طی ۶ ساعت از ۲۴ درجه سانتی‌گراد به دمای ۲-۳ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت درصد بازماندگی در هر تیمار تعیین گردید. سپس از میگوهای باقیمانده سه عدد از هر تیمار به‌طور تصادفی انتخاب شده تا از آن‌ها نمونه‌ی همولنف برای سنجش پارامترهای خونی گرفته شود.

برای همولنف‌گیری ابتدا سرنگ انسولین با سوزن شماره ۲۵ به‌میزان ۰/۴ میلی‌لیتر با محلول ضد انعقاد (سیترات سدیم: ۳/۵۷۱۶gr، ساکارز: ۸/۵۵۷۵gr، Tris HCL: ۰/۱۵۷۶gr) که دمای آن ۴ درجه سانتی‌گراد و pH روی ۷/۶ تنظیم شده بود پر شده و به‌میزان ۰/۴ میلی‌لیتر از میگو همولنف گرفته شد. از این نمونه برای تعیین میزان هموسیت کل (THC) و هموسیت‌های افتراقی (DHC) استفاده شد (Jiang *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2014).

شمارش کل هموسیت‌ها (THC)

برای شمارش کلی هموسیت‌ها از هر نمونه همولنف حاوی ضد انعقاد، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و با حجم برابر از بافر فرمالین (۱۰ درصد) برای ۳۰ دقیقه فیکس گردیده و سپس شمارش کلی هموسیت‌ها به‌وسیله لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰x انجام شد. پس از شمارش قسمت‌های مشخص شده در لام نئوبار، تعداد هموسیت کل با استفاده از فرمول زیر و احتساب ضریب رقت، برآورد گردید (Song *et al.*, 2003).

تعداد هموسیت کل = [(تعداد سلول‌های شمارش شده) / (تعداد خانه‌های شمارش شده × حجم خانه)] × (حجم رقت نمونه / حجم ترکیب اصلی در نمونه)]

شمارش افتراقی هموسیت‌ها (DHC)

برای انجام شمارش افتراقی هموسیت‌ها، گسترش تهیه شد. به این ترتیب که ۵۰ میکرولیتر (یک قطره) از نمونه همولنف و ماده ضدانعقاد روی لام ریخته شده و با کمک یک لام دیگر با زاویه ۴۵ درجه گسترش تهیه گردید. بعد از خشک شدن گسترش‌ها، برای فیکس کردن، لام به مدت ۳۰ ثانیه داخل متانول خالص قرار داده شد و پس از خشک شدن، لام‌ها به روش می‌گرانوالد گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. با میکروسکوپ نوری، تعداد ۳۰۰ سلول هموسیت شمارش شد و تعداد هموسیت‌های دانه‌دار بزرگ، نیمه دانه‌دار و هیالین بر اساس نسبت هسته به سیتوپلاسم، تعداد گرانول‌های، نوع رنگ و اندازه هموسیت‌ها تعیین گردید.

جدول ۱. ترکیب جیره‌های غذایی حاوی سطوح مختلف پودر برگ حرا (*A. marina*) (برحسب درصد)

مواد غذایی	جیره‌ی غذایی بر حسب درصد			
	۰	۲/۵٪	۵٪	۱۰٪
پودر ماهی	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
آرد سویا	۱۸	۱۷/۵	۱۷	۱۶
آرد گندم	۱۵/۴	۱۵/۸	۱۶/۱	۱۶/۸
آرد میگو	۶/۴	۶/۴	۶/۴	۶/۴
آرد برنج	۱۰/۶	۸/۶	۶/۶	۲/۶
گلو تین گندم	۹/۶	۹/۶	۹/۶	۹/۶
بنتونیت	۱	۱	۱	۱
هم‌بند ^۱	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی	۱	۱	۱	۱
مکمل ویتامینی ^۲	۱	۱	۱	۱
روغن ماهی	۴	۳/۷۳	۳/۵۳	۳/۰۷
روغن سویا	۲	۱/۸۷	۱/۷۷	۱/۵۳
پودر برگ حرا	۰/۰	۲/۵	۵	۱۰

۱- تهیه شده از شرکت کیمیا رشد

۲- 1-2 kg per ton, 1.5-3% of added Vegetable fat/oil, Az directed by nutritionist/Veterinarian

جدول ۲. ترکیب شیمیایی جیره و پودر برگ حرا (*A. marina*) (برحسب درصد)

ترکیب	تیمار			
	۰	۲/۵٪	۵٪	۱۰٪
پروتئین	۳۳/۶۵	۳۳/۲۸	۳۴/۴۸	۳۴/۰۱
چربی	۴/۸۵	۵/۱۰	۵/۹۰	۶/۰۵
خاکستر	۱۱/۹۰	۱۱/۲۰	۱۲/۰۵	۱۲/۲۰
رطوبت	۹/۴۵	۹/۷۵	۹/۵۵	۱۰/۴۵

تجزیه و تحلیل آماری

پس از اتمام آزمایش، داده‌های به دست آمده برای بررسی تأثیرات تیمارهای غذایی بر میزان THC و DHC با استفاده از برنامه SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ابتدا نرمالیتیه بودن داده‌ها توسط کلموگروف اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت و در ادامه از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Wey ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan) در سطح احتمال ۵ درصد جهت

بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در فاکتورهای مورد بررسی استفاده گردید. تمام داده‌ها بر اساس (Mean \pm S.E) ارائه شدند.

نتایج

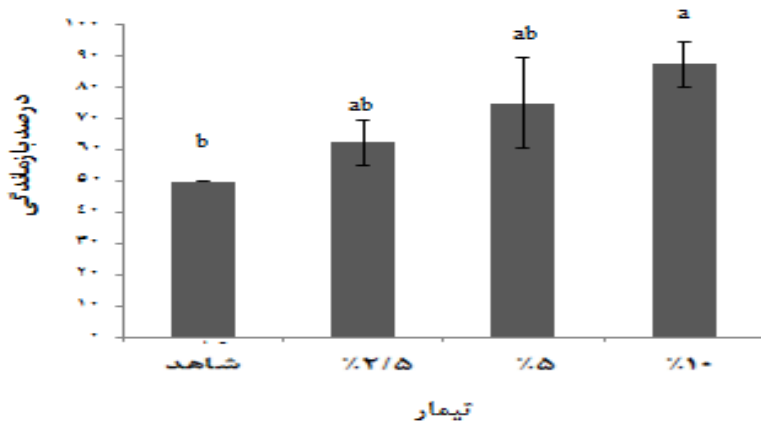
نتایج سنجش پارامترهای ایمنی شامل تعداد کل هموسیت‌ها (THC)، شمارش افتراقی هموسیت‌ها (DHC): (سلول‌های هیالینه (HC)، سلول‌های نیمه دانه‌دار (SGC)، و سلول‌های دانه‌دار بزرگ (LGC) میگوی پاسبید غربی در تیمارهای آزمایشی تحت استرس دمایی در جدول ۲ و ۳ ارائه داده شده است. طبق نتایج، میزان هموسیت کل در تیمار ۵ درصد در مقایسه با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داده است و دارای بیشترین میزان تعداد هموسیت کل بوده است ($P < 0.05$) و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری با هم نشان ندادند. در شمارش افتراقی هموسیت‌ها، در میگوهای تغذیه شده با پودر برگ گیاه حرا افزایش سلول‌های نیمه دانه‌دار نسبت به تیمار شاهد دیده شد ($P < 0.05$). سلول‌های دانه‌دار بزرگ (LGC) در تیمار شاهد دارای بیشترین میزان بود و اختلاف معنی‌دار با تیمار ۲/۵ و ۱۰ داشت ($P < 0.05$) اما با تیمار ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. از لحاظ سلول‌های هیالین (HC) بیشترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۲/۵ و ۱۰ درصد داشته است ($P < 0.05$).

تغذیه میگوها با پودر برگ گیاه حرا باعث افزایش میزان بازماندگی در آن‌ها شد به طوری که با افزایش میزان پودر برگ گیاه حرا در جیره، بازماندگی نیز افزایش یافت. بیشترین میزان بازماندگی در تیمار ۱۰ درصد مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد ($P < 0.05$) ولی با تیمار ۲/۵ و ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱).

جدول ۳. شمارش کل و افتراقی هموسیت همولف میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف پودر برگ *A. marina* در برابر مقاومت به استرس دمایی

تیمار				THC ($\times 10^4$ Cells \times ml $^{-1}$)	
شاهد	۲/۵	۵	۱۰		
۳۹۱ \pm ۱۵۳/۵۹ ^b	۲۹۰/۴۴ \pm ۷۵/۵۱ ^b	۸۳۶ \pm ۲۸/۴۸ ^a	۲۷۵/۵۵ \pm ۴۵/۰۹ ^b		
۱۶/۵۸ \pm ۰/۹۱	۱۲/۱۶ \pm ۱/۳۰ ^b	۱۳/۵۸ \pm ۰/۹۱ ^{ab}	۱۲/۱۲ \pm ۰/۳۶ ^b	LGC	
۶۱/۲۸ \pm ۱/۲۹ ^b	۷۱/۵۰ \pm ۲/۱۷ ^a	۶۹/۱۶ \pm ۱/۶۳ ^a	۷۴/۵۰ \pm ۱/۴۴ ^a	SGC	DHC
۲۲/۰۸ \pm ۲/۲۶ ^a	۱۶/۳۳ \pm ۰/۸۸ ^b	۱۷/۲۵ \pm ۰/۷۲ ^{ab}	۱۳/۴۱ \pm ۱/۷۳ ^b	HC	

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند و وجود حروف غیر همسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



شکل ۱. میزان بازماندگی میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف پودر برگ حرا *A. marina* در پایان استرس دمایی

بحث

گیاه حرا بدلیل داشتن ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، تانن، بتائین، کارتنوئیدها، ساپونین، تری‌ترپن‌ها و غیره (Camaii et al., 2017) که به‌عنوان عوامل ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد اکسیدان و ضد التهاب (Dhayanithi et al., 2013) عمل می‌کنند احتمالاً می‌تواند گزینه‌ی مناسبی به‌عنوان یک محرک سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش مقاومت به استرس‌ها باشد. در مطالعه‌ی حاضر میگوهای که تحت استرس دمایی قرار گرفتند میزان هموسیت کل در آن‌ها به‌شدت کاهش یافت. میزان هموسیت کل در تیمار ۵ درصد به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و سایر تیمارهای تغذیه شده با پودر گیاه حرا بود که نشان دهنده اثر مثبت این گیاه در برابر استرس است. تعداد هموسیت‌ها در گونه‌های مختلف سخت‌پوستان با توجه به ویژگی‌های فردی موجود، نحوه تغذیه و شرایط مختلفی که سخت‌پوستان در آن قرار دارند، متفاوت خواهد بود. مقدار کل هموسیت‌ها یکی از مهم‌ترین پارامترهای مورد استفاده در ارزیابی وضعیت سلامتی سخت‌پوستان می‌باشد (Chen, 2001). استرس‌ها بر روی تعداد کل هموسیت‌ها اثر می‌گذارند. بنابراین شمارش هموسیت‌های کل ممکن است یک شاخص مناسب برای فعالیت سیستم ایمنی ناشی از استرس باشد. دمای آب، احتمالاً مهم‌ترین متغیر محیطی است زیرا به‌طور مستقیم بر متابولیسم، مصرف اکسیژن، رشد، لقاح و زنده ماندن تأثیر می‌گذارد. دما بر روی سایر پارامترهای محیطی مانند شوری و اکسیژن آب اثر مستقیم دارد (Le Moullac et al., 1998). کاهش تعداد هموسیت کل در دمای پایین در مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده در سایر سخت‌پوستان مطابقت دارد. Gomez-Jimenez و همکاران (۲۰۰۰) عنوان کردند که در لابستر *Panulirus interruptus* پرورش داده شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، فعالیت هموسیت کل و فنول اکسیداز به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از لابسترهایی بوده که در دمای ۱۴ و ۱۹ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند. میزان THC در *Pacifastacus leniusculus* که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بوده نسبت به دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت (Jiravanichpaisal et al., 2004). در *Penaeus stylirostri* میگوهای که در معرض دمای پایین بودند، THC به میزان قابل توجهی (۰.۴٪) کاهش یافت (Le Moullac and Haffner, 2000). بر اساس مطالعات Qiu و همکاران (۲۰۱۱) و Matozzo و همکاران (۲۰۱۱) میگوهای که تحت استرس دمایی پایین قرار گرفتند (۱۲ درجه سانتی‌گراد) میزان THC به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

بر اساس مطالعات Avenido و Serrano (۲۰۱۲) افزودن حرا (*Sonneratia caseolaris*) در جیره‌ی میگوی ببری سیاه موجب افزایش هموسیت کل و ایمنی در آن‌ها شده و دلیل آن را حضور فلاونوئید، گلیکوزیدها و استروئیدهای موجود در حرای *S. casilaris* دانستند و هم‌چنین عنوان کردند ترکیب فنولیک مانند اسیدگالیک و دو فنالوئید لوتئین و لوتئین-O-۷ گلاگوسید مواد فعال زیستی در این حرا هستند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. Sudheer و همکاران (۲۰۱۱) عنوان کردند که استفاده از گیاه *Ceriops tagal* در جیره غذایی میگوی ببری سیاه موجب افزایش ایمنی در آن‌ها گردید. عصاره برگ حرای *Rhizophora apiculata* در دوزهای ۵ و ۱۰ درصد در دلقک ماهی *Amphiprioninae* (Dhayanithi et al., 2013)، عصاره‌ی برگ *A. marina* در جیره ماهیان زینتی و *Amphiprion sebae* موجب افزایش لکوسیت‌ها در خون ماهیان شد (Dhayanithi et al., 2015). مطالعات مختلف نشان داد که عصاره‌های گیاهی می‌توانند اثر مثبت روی هموسیت کل در سخت‌پوستان و لکوسیت در ماهی‌ها داشته باشند. به‌عنوان مثال افزودن ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره جلبک *Sargassum glaucescens* موجب افزایش THC و فاگوسیتوز در میگوهای سفید هندی شد (Ghaednia et al., 2012). بر اساس مطالعه‌ی Saraswati (۲۰۱۳) پلی‌ساکارید موجود در جلبک موجب افزایش THC در *L. vanamei* شده است، Su و Chen (۲۰۰۸) ساپونین موجود در گیاه ساپوناریا را عامل مؤثر افزایش THC در *L. vanamei* عنوان کردند. هم‌چنین ماده مؤثره آلیسین در سیر (Nya and Austin, 2009)، آنتاراکوئینون در گیاه ریواس (Liu et al., 2011) و کارتنوئید موجود در آستازانتین (Farhanghi et al., 2013) موجب افزایش THC در میگو و لکوسیت در ماهی شد. هم راستا با این مطالعه استفاده از عصاره‌ی

سیر موجب افزایش مقاومت در برابر استرس شوری و pH در میگوی *L. vanamei* شد که به دلیل وجود آلیسین و ویتامین A و C در آنها عنوان گردید (Gholaghaie et al., 2016). Farhanghi و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که میگوی *L. vanamei* تغذیه شده با جیره حاوی آستازانتین در سطح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره نسبت به تیمار شاهد THC بالاتری داشتند و دلیل آن را آنتی‌اکسیدان موجود در آستازانتین عنوان کردند که موجب افزایش ایمنی و بقا شده است. تنش‌های محیطی می‌توانند فعالیت میتوزی بافت خون‌ساز را تنظیم و باعث کاهش چرخش هموسیت‌ها (Hemocyte turnover) شوند. همچنین در اثر تنش ایجاد شده در میگوی پاسفید غربی، با کاهش دما واکنش‌های اکسیژنی غیر عادی در مسیر متابولیسم رخ می‌دهد که باعث تشکیل بیش از حد رادیکال‌های آزاد می‌شود. سلول‌های سیستم ایمنی نسبت به تنش اکسیداتیو و آسیب غشایی به وسیله رادیکال‌های آزاد بسیار حساس‌اند زیرا آن‌ها بشدت به ارتباطات سلول به سلول از طریق رسپتورهای دیواره سلولی وابسته‌اند (Hughes, 1999) و موجب کاهش شدید هموسیت‌ها در همولف میگوی *L. vanamei* می‌شوند. همچنین تنش‌های محیطی بویژه افزایش دما منجر به سنتز Hsps که معروف به پروتئین‌های شوک حرارتی هستند می‌شوند و افزایش آن در حفاظت سلول در برابر استرس مفید بشمار می‌رود (Bukau and Horwich, 1998).

همانطور که گفته شد گیاه حرا حاوی ترکیبات شیمیایی و فعال زیستی مانند کارتنوئیدها و فلاونوئیدها است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند و احتمالاً این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با کاهش و خنثی‌سازی اثرات ناشی از رادیکال‌های آزاد، متوقف کردن تولید آن‌ها و یا تبدیل به ترکیباتی با فعالیت کمتر از پایداری طولانی آن‌ها جلوگیری کرده و از تغییرات میزان هموسیت‌ها در برابر تنش می‌کاهد. در مواجهه با استرس دمایی نیز میزان هموسیت‌های نیمه‌گرانولار به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود و همچنین در هموسیت‌های گرانولار و هیالین تیمار ۵ درصد و شاهد بیش‌ترین درصد را داشتند. با توجه به درصد هموسیت‌های نیمه‌گرانولار در تیمارهای تغذیه شده با گیاه حرا و همچنین به میزان کمتر در هموسیت‌های هیالینه و گرانولار نسبت به تیمار شاهد احتمال می‌رود میگوهای تغذیه شده با جیره حاوی پودر گیاه حرا می‌توانند از کاهش درصد هموسیت‌های نیمه‌گرانولار جلوگیری کنند. دمای پایین می‌تواند بر روی فعالیت فنول‌اکسیداز تأثیر منفی بگذارد که هموسیت‌های نیمه‌گرانولار نقش مهمی در فعالیت آن‌ها دارند و این افزایش نسبت به تیمار شاهد نشان دهنده‌ی افزایش ایمنی و به تبع آن مقاومت در برابر استرس و کاهش تأثیرات منفی آن شده است که احتمالاً بدلیل حضور ترکیبات شیمیایی و زیست‌فعال حرا است که به‌عنوان عوامل ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد اکسیدان و ضد التهاب به‌شمار می‌روند (Dhayanithi et al., 2013). این ترکیبات شامل فلاونوئید، گلوکوزیدهای ایریدوئید، گلوکزیدهای فنیل پروپانوئید، انواع فیتوالکسین از جمله آلکالوئید و کینون، اسیدهای کربوکسیلیک از جمله بتائین، کولین، تانن، استروئیدها، هیدروکربن، الکل، استرول، اسیدهای چرب، ساپونین و تری‌ترین‌ها (لوپنول) می‌باشند (Camaii et al., 2017). به‌عنوان مثال فلاونوئیدها خاصیت ضد اکسیدانی بالایی دارند که نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولیدی ناشی از فعالیت‌های سلول‌ها و استرس‌های محیطی وارد بر آنها ایفا می‌کنند (Farhanghi et al., 2013). در استرس دمایی پایین کاهش فعالیت فنول‌اکسیداز در *M. rosenbergii* مشاهده شد (Cheng and Chen, 2000). همچنین در *L. panulirus interruptus* تحت استرس دمایی فعالیت فنول‌اکسیداز کاهش یافت (Gomez-jimenez et al., 2000)، در استرس دمایی بالا نیز فعالیت فنول‌اکسیداز و فاگوسیتوز در میگوی *L. vanamei* کاهش یافت (Cheng et al., 2005). در مطالعه‌ی Li و همکاران (۲۰۱۰)، استرس شوری موجب کاهش هموسیت هیالینه و نیمه‌گرانولار و در نتیجه کاهش فعالیت فنول‌اکسیداز در میگوی *L. vanamei* شد. همچنین میزان هموسیت هیالین، نیمه‌گرانولار و گرانولار در میگوی *L. vanamei* که تحت استرس گرسنگی قرار گرفت کاهش یافت (Lin et al., 2012).

تحمل استرس دمایی و درصد میزان بازماندگی در میگوهای تغذیه شده با پودر برگ گیاه حرا نسبت به تیمار شاهد افزایش قابل توجهی پیدا کرد. در همین راستا Darachai و همکاران (۱۹۹۸) عنوان کردند که میزان بازماندگی در میگوی ببری سیاه تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی جلبک دریایی در مواجهه با استرس شوری نسبت به میگوهای تغذیه شده با رژیم غذایی فاقد جلبک دریایی بالاتر بود. در مطالعه حاضر نیز میگوهای تغذیه شده با پودر برگ گیاه حرا از مقاومت و بازماندگی بالاتری در مواجهه با استرس دمایی برخوردار بودند که ممکن است این حالت ناشی از اثرات تحریک‌کنندگی این گیاه بر سیستم دفاعی میگوها باشد. مطالعات انجام شده توسط Darachai و همکاران (۱۹۹۸) بر روی میزان تجمع آستازانتین و بتاکاروتن در

میگوی ببری ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) نشان داد که همبستگی مثبتی میان انباشته شدن رنگدانه در بدن و نرخ بازماندگی در میگوها وجود داشت. همچنین Avenido و Serrano (۲۰۱۲) عنوان کردند میگوهای ببری سیاه تغذیه شده با رژیم غذایی حاوی عصاره برگ حرا *S. caseolaris* در مقایسه با میگوهای تغذیه نشده با عصاره‌ی برگ حرا از بازماندگی بیش‌تری برخوردار بودند (Avenido and Serrano, 2012b). این افزایش بازماندگی ممکن است ناشی از وجود خواص ضدباکتری گیاه حرا (Dhayanithi et al., 2013) و اثرات تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی (Avenido and Serrano, 2012a) باشد. به‌عنوان مثال لینالول نوعی ترکیب مونوترپنی بوده که در گیاه حرا موجود است و در طب سنتی از آن استفاده می‌شود و خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل ملاحظه‌ای دارد (Pattnaik et al., 1997) که می‌تواند در بقای میگوها مؤثر باشد. اثبات شده که برگ حرای *Aegiceras corniculatum* حاوی فلاونوئیدهای غنی شده است و خاصیت ضدالتهابی و ضداکسیدان دارد (Gurudeeban et al., 2012). Ikhwanuddin و همکاران (۲۰۱۴) میزان زنده ماندن میگوها را به علت تانن موجود در برگ حرا و مواد ضد قارچی آن، بیان کرد. یکی از خواص حرا داشتن فنل و کاروتنوئیدها می‌باشد که خاصیت ضداکسیدانی دارند (Bandaranayake, 2002) که در بقای میگوها در مواقع استرس نقش مهمی دارند. در مواجهه با استرس‌ها میزان گلوکز همولنف میگوها افزایش می‌یابد که در سخت‌پوستان به‌عنوان یک فاکتور مثبت در افزایش ایمنی عمل می‌کند. میزان گلوکز میگوها تحت استرس دمایی در تیمارهای تغذیه شده از پودر برگ حرا دارای بیشترین مقدار بوده است (Es-haghi Nimvari, 2018). همچنین با توجه به اینکه میزان هموسیت کل و درصد هموسیت‌های نیمه‌گرانولار در تیمارهای تغذیه شده با پودر برگ حرا نسبت به تیمار شاهد بیشتر بوده است می‌تواند موجب تحریک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در میگوهای تحت تیمار شده باشد و در نتیجه بقای بیش‌تری در تیمارهای تغذیه شده با گیاه حرا مشاهده شد.

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان دهنده‌ی اثرات مثبت تغذیه‌ای پودر برگ حرا می‌باشد که موجب تحریک و بهبود سیستم ایمنی و افزایش بازماندگی در میگوی پاسفید غربی تحت استرس دمایی شد. به‌نظر می‌رسد می‌توان از پودر برگ حرا به‌عنوان مکمل غذایی در جیره غذایی آبزیان استفاده نمود بویژه درصدهای ۵ و ۱۰ درصد، البته انجام تحقیقات جامع‌تر در این زمینه پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مدیر محترم شرکت هرمز دام جناب آقای مهندس مرادی، از آقای عباسی به‌علت در اختیار گذاشتن اقلام جیره، از پرسنل زحمت‌کش کارگاه آموزش و بازسازی ذخایر آبزیان کلاهی به ویژه جناب آقای مهندس سیرپور، مهندس درویشی، آقای اسلامی و همچنین از آقایان مهندس نیرومند و مهندس اسدی و خانم مهندس کبری بابانژاد آبکنار در دانشگاه هرمزگان تشکر و قدردانی داشته باشند.

منابع

- Avenido, P., Serrano, A.E.J. 2012b. Effects of the apple mangrove (*Sonneratia caseolaris*) on growth, nutrient utilization and digestive enzyme activities of the Black tiger shrimp *Penaeus monodon* postlarvae. *European Journal of Experimental Biology*. 2(5): 1603-1608.
- Avenido, P., Serrano, A.E.J. 2012a. Effects of the apple mangrove (*Sonneratia caseolaris*) on antimicrobial, immune stimulatory and histological responses in black tiger shrimp postlarvae fed at varying feeding frequency. *AAFL Bioflux*. 5(3):112-123.
- Bandaranayake, W.M. 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology and Management*. 10 :421-452.
- Bukau, B., Horwich, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92(3): 351-366.
- Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C., Kumar, V. 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. *Journal of Marine Science: Research and Development*. 3(3): 1-11.
- Camaii, I., Fathi Moghaddam, H., Mard, A., Moghaddam Niya, D. 2017. study Anti diabetic effect of Aqueous extract and Aqueous ethanolic of mangrove fruit in *streptozotocin-induced* diabetic rats. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity*. 27(1): 9-16. (in Persian)

- Cheng, W., Chen, J.C. 2000. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*. 10: 387-391.
- Cheng, W., Chen, J.C. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the hemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*. 11: 53-63.
- Cheng, W., Wang, L.U., Chen, J.C. 2005. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*. 250(3-4): 592-601.
- Darachai, J., Piyatiratitivorakul, S., Kittakoop, P., Nitithamyong, C., Menasveta, P. 1998. Effects of astaxanthin on larval growth and survival of the Giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Advances in Shrimp Biotechnology. Proc. Special Session on Shrimp Biotechnology, 5th Asian Fisheries Forum, Thailand*. pp. 117-121.
- Dhayanithi, N.B., kumar, T.T.A., Balasubramanian, T., Tissera, K. 2013. A study on the effect of using mangrove leaf extracts as a feed additive in the progress of bacterial infections in marine ornamental fish. *Journal of Coastal Life Medicine*. 1(3): 217-224.
- Dhayanithi, N.B., Kumar, T.T.A., Arockiaraj, J., Balasundaram, C., Harikrishnan, R. 2015. Dietary supplementation of *Avicennia marina* extract on immune protection and disease resistance in *Amphiprion sebae* against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 45(1): 52-58.
- Es-haghi Nimvari, M. 2018. The effect of mangrove meal (*Avicennia marina*) on immunological and biochemical indices, and resistance to thermal and salinity stress in Whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*). M.Sc. Thesis. Fisheries Aquaculture. Hormozgan University. 119 p. (in Persian)
- FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 209 p.
- Farhanghi, M., Ahmadi, S., Rafiee, Gh., Ghaedenia, B., Taghavi, D. 2013. Effect of Different Levels of Astaxanthin Pigments in Raw Food on Some Non-Specific Biochemical and Non-Specific Immunostimulations of Young Species of Shrimp (*L. vannamei*) in Exposure to Severe Oxygen Degradation. *Journal of Marine Science and Technology*. 12 (2): 103- 114. (in Persian)
- Gatlin, D.M. 2007. Expanding of sustainable plant production in aquafeeds. a reveiw *Aquaculture Research*. 38: 551-579.
- Gatune, C., Vanreusel, A., Cnudde, C., Ruwa, R., Bossier, P.M. 2012. De troch decomposing mangrove litter supports a microbial biofilm with potential nutritive value to penaeid shrimp post larvae. 426: 28-38.
- Ghaednia, B., Mirbakhsh, M., Mehrabi, R. 2012. Effect of hot water extraction of *Sargassum glaucescens* algae in prevention of White Spot Disease in *Fenneropenaeus indicus*. *Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*. 94 :1-10. (in Persian)
- Gholaghaie, M., Adel, M., Hafezieh, M. 2016. The evaluation of dietary garlic powder on growth performance, survival rate and body composition of *Litopenaeus vannamei* cultured by Caspian Sea water. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 25 (2): 143-151.
- Gomez-Jimenez, S., Uglow, R.F., Gollas-Galvan, T. 2000. The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Fish Shellfish Immunol*. 10: 631- 635.
- Gurudeeban, S., Satyavani, K., Ramanathan, T., Balasubramanian, T. 2012. Antibiabetic effect of a black mangrove species *Aegiceras corniculatum* in alloxan induced diabetic rat. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 3: 52-56.
- Hagian, M., Sourinejad, I., Dashtian Nasab, A., Naji, A. 2017. Effect of dietary supplementation of enriched *Artemia* with ethanolic leaf extract of grey mangrove *Avicennia marina* on growth performance, survival and stress resistance in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) postlarvae. *Aquatic Physiology and Biotechnology*. 5(3): 75-94. (in Persian)
- Hosseinifar, S. H., Zare, P., Merrifield, D.L. 2010. The effects of inulin on growth factors and survival of the Indian white shrimp larvae and post-larvae (*Fenneropenaeus indicus*). *Aquaculture Research*. 41(9): 348-352.
- Huang, X.L., Xia, M.H., Jin, M., Wang, T., Zhou, Q.C. 2014. Dietary thiamin could improve growth performance, feed utilization and non-specific immune response for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 21: 364-372.
- Hughes, D.A. 1999. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proceedings of the Nutrition Society*. 58: 79-84.

- Ikhwanuddin, M., Moh, J.H., Hidayah, M., Noor-Hidayati, A.B., Aina-Lyana, N., Nor Juneta, A.S. 2014. Effect of Indian almond, *Terminalia catappa* leaves water extract on the survival rate and growth performance of black tiger. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AAFL Bioflux)*. 7(2): 85-93.
- Immanuel, G., Sivagnamavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnam, S., Palavesam, A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *P. monodon* (Fab). *Fish and Shellfish Immunology*. 32(3): 551-564.
- Jiang, G., Yu, R., Zhou, M. 2004. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 241(1-4): 61-75.
- Jiravanichpaisal, P., Soderhall, K., Soderhall, I. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish Shellfish Immunol*. 17: 265- 275.
- Kumar Bairwa, M., Kumar Jakhar, J., Satyanarayana, Y., Devivaraprasad Reddy, A. 2012. Animal and plant originated immuno stimulants used in aquaculture. *Journal of Natural Product and Plant Resources*. 2(3): 397-400.
- Le Moullac, G., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture*. 191: 121-131.
- Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C., Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish Shellfish Immunology*. 8: 621-629.
- Li, C.C., Yeh, S.T., Chen, J.C. 2010. Innate immunity of the White shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology*. 28(1): 121-127.
- Lin, Y.C., Chen, J.C., Man, S.N.C., Morni, W.Z.W., Suhaili, A.S.N., Cheng, S.Y., Hsu, C.H. 2012. Modulation of innate immunity and gene expressions in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term starvation and re-feeding. *Results in Immunology*. 2: 148-156.
- Liu, X.L., Xi, Q.Y., Yang, L., Li, H.Y., Jiang, Q.Y., Shu, G., Wang, S.B., Gao, P., Zhu, X.T., Zhang, Y.L. 2011. The effect of dietary (*Panax ginseng*) polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, (*Litopenaeus vannamei*). *Fish and Shellfish Immunology*. 30(2): 495-500.
- Luo, S.W., Cai, L., Liu, Y., Wang, W.N. 2014. Functional analysis of a dietary recombinant Fatty acid binding protein 10 (FABP10) on the *Epinephelus coioides* in response to acute low temperature challenge. *Fish and Shellfish Immunology*. 36(2): 475-484.
- Matozzo, V., Gallo, C., Marin, M.G. 2011. Effects of temperature on cellular and biochemical parameters in the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *Marine Environmental Research*. 71(5): 351-356.
- Nya, E.J., Austin, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control (*Aeromonas hydrophila*) infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*. 32: 963-970.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*. 89(358): 39-46.
- Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*. 214: 19-33.
- Qiu, J., Wang, W.N., Wang, L.J., Liu, Y.F., Wang, A.L. 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *L. vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 154(1): 36-41.
- Roijackers, R., BT-Nga, T.T., Nghia. 2006. The effect of leaf analysis *apiculata Rhizophora* brine shrimp *Penaeus monodon* *Aquacult INT*. 14: 467-477.
- Saraswati, E., Prajitno, A., Yanuhar, U., Abadi, A.L. 2013. Administration of hot water extract diatomae *Caetoceros ceratosporum* via injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei* against infectious myonecrosis virus. *Aquatic Science and Technology*. 1(2): 95-107.
- Shelar, P., Reddy, S.v.k., Shelar, S.G.S., Reddy, G.V.S. 2012. Medicinal value of mangroves and its antimicrobial properties - A review. *Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 6: 26-37.

- Soleimani, Z., Mirazi, N. 2015. The Effect of *Avicennia Marina* hydroethanolic Leaf Extract on Testes Tissue and Spermatogenesis in Male Rats Induced with Carbon Tetrachloride. *Armaghane-danesh*. 20(8): 677-88.
- Soltani, M. 2008. Immunology of fish and crustaceans. 1st edition. University of Tehran Press. 264 p. (in Persian)
- Song, L., Yu, I., Lien, W., Huang, C. 2003. Haemolymph parameters of *Litopenaeus vannamei* infected with Taura syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 14: 317-331.
- Su, B.K., Chen, J.C. 2008. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 24: 74-81.
- Sudheer, N.S., Philip, R., Singh, I.B. 2011. In vivo screening of mangrove plants for anti WSSV activity in *Penaeus monodon*, and evaluation of *Cerriops tagal* as a potential source of antiviral molecules. *Aquaculture*. 311(1-4): 36-41.
- Yang, C., Chen, N., Lu, L., Chen, S., Lai, C. 2014. Effect of mushroom *Beta Glucan* on immune and haemocyte response in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Aquaculture Research Development*. 5(6): 275.
- Zhou, J., Wang, L., Xin, Y., Wang, W.N., He, W.Y., Wang, A.L., Liu, Y. 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in White shrimp, *L. vannamei*. *Journal of Thermal Biology*. 35(6): 284-289.