University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 10, No. 2, 2024, pages: 1-19
DOI: 10.22124/janb.2024.27893.1249

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of diet containing alfalfa (*Medicago sativa*) powder and leaf extract on hemolymph factors of western whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under low salinity stress

Kobra Babanejad-Abkenar, Arash Akbarzadeh*, Ahmad Noori, Mohammad Niroomand
Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Received 02 April 2024 Revised 09 June 2024 Accepted 17 June 2024

KEYWORDS

Medicago sativa
Salinity stress
Hemolymph
Hemocyte
Western whiteleg shrimp

ABSTRACT

Introduction: The western whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, is a euryhaline species, but fluctuated salinity can lead to stress. Hemolymph indices, such as total and differential hemocyte counts, are key indicators of immune status in shrimp. Using medicinal plants to feed farmed aquatic animals is a promising approach to enhance production performance and resilience to environmental stress. Alfalfa, *Medicago sativa* leaves are used in animal and human diets due to high protein content and nutritional value. This study evaluates the impact of alfalfa leaf powder (ALP) and extract (ALE) on the hemolymph indices of *L. vannamei* in low salinity stress conditions.

Materials and methods: Shrimp were fed in seven treatments with three replications, including control (without ALP and ALE), ALP (60, 120, and 180 g/kg), and ALE (6, 12, and 18 g/kg) for nine weeks. Then, the shrimp were subjected to salinity stress at five ppt for 48 hours. Survival rates were recorded at the end of the feeding and stress period, and total and differential hemocyte counts were measured.

Results: In non-stress conditions, the number of hemocytes in the control group was significantly lower compared to the other treatments. In the 5 ppt salinity, ALP180 and ALE18 showed significantly higher total hemocyte counts than the control group ($p<0.05$). In both salinity conditions, the control treatment had a significantly higher number of hyaline cells compared to other treatments. In the control and ALP180 treatments, the numbers of hyaline cells were higher in the normal salinity than in the five ppt ($p<0.05$). Moreover, in the normal salinity, the number of large granular cells was significantly lower in the control group than in the other treatments. In addition, in the control

group, large granular cells in the five ppt were significantly higher than the control group in normal salinity ($p<0.05$). The survival rate was significantly higher in treatments fed with ALP and ALE in normal salinity compared to the control. In 5 ppt salinity, survival rates were also significantly higher in the ALP180 and ALE18 compared to the control ($p<0.05$).

Discussion: Alfalfa leaves, rich in minerals like copper and iron and active compounds like flavonoids, contribute to increased hemocyte levels. Flavonoids interact with hemocyte cell receptors, promoting effective cell function. Hemocytes are crucial in crustaceans' defense against pathogens. A higher proportion of semi-granular cells in the western whiteleg shrimp indicate a stronger immune response. Additionally, xanthophyll and loliolide in alfalfa have germicidal properties and help to improve the survival rate.

Conclusion: This study demonstrates that alfalfa leaf powder and extract positively impact shrimp's survival and immune system function under low salinity stress.

*Corresponding author: akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران
تغذیه آبزیان
سال دهم، شماره دوم، تیر ۱۴۰۳، صفحات ۱۹-۱
DOI: 10.22124/janb.2024.27893.1249

"مقاله پژوهشی"

تأثیر جیره حاوی پودر و عصاره برگ گیاه یونجه (*Medicago sativa*) بر شاخص‌های همولنف میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با استرس شوری پایین

کبری بابانژاد آبکنار، آرش اکبرزاده*، احمد نوری، محمد نیرومند
گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۴ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۸

چکیده

در تحقیق حاضر تأثیر پودر و عصاره برگ گیاه یونجه (*Medicago sativa*) بر عملکرد شاخص‌های همولنف میگوی سفید غربی(*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با استرس شوری پایین ارزیابی شد. پس از ۸ هفته غذادهی با پودر (۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ g/kg) و عصاره (۶، ۱۲ و ۱۸ g/kg) برگ یونجه، تیمارها به مدت ۴۸ ساعت تحت استرس شوری ۵ ppt قرار گرفتند و سپس شاخص‌های همولنف با گروه شاهد (بدون پودر و عصاره برگ یونجه) مقایسه شدند. در شرایط بدون استرس، تعداد هموسیت‌های گروه شاهد به‌طور معنی‌دار کمتر از تیمارهای دیگر بود و در شرایط استرس ۵ ppt، تیمارهای پودر برگ ۱۸۰g/kgو عصاره برگ ۱۸ g/kg با اختلاف معنی‌دار دارای بیشترین مقدار هموسیت‌کل نسبت به گروه شاهد بودند ($p<0.05$). در هر دو سطح شوری تعداد یاخته‌های هیالین گروه شاهد با اختلاف معنی‌دار نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بود. همچنین در تیمارهای شاهد و پودر برگ یونجه ۱۸۰ g/kg تعداد این یاخته‌ها در شوری نرمال بیش از شوری ۵ ppt بود ($p<۰/۰۵$). تعداد یاخته‌های نیمه دانه دار در شوری‌های نرمال و استرس در تیمارهای پودر و عصاره برگ یونجه نسبت به گروه شاهد بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). تعداد یاخته‌های گرانولار بزرگ نیز در شوری نرمال در گروه شاهد با اختلاف معنی‌دار کمتر و در گروه شاهد در شوری ۵ ppt با اختلاف معنی‌دار از شوری نرمال بیشتر بود ($p<۰/۰۵$). در میزان بازماندگی، در شوری نرمال گروه شاهد نسبت به دیگر تیمارها با اختلاف معنی‌دار کمتر بود و در شرایط استرس شوری، تیمارهای پودر برگ یونجه ۱۸۰ g/kg و عصاره برگ یونجه ۱۸ g/kg با اختلاف معنی‌دار بیش از گروه شاهد بودند ($p<۰/۰۵$). در مجموع، نتایج این تحقیق اثرات مثبت استفاده از پودر و عصاره برگ گیاه یونجه بر بازماندگی و عملکرد دستگاه ایمنی میگو در مواجهه با استرس شوری پایین را نشان داد.

کلمات کلیدی
Medicago sativa
استرس شوری
همولنف
هموسیت
میگوی سفید غربی

نویسنده مسئول: akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

مقدمه

با رشد جمعیت، آبزی‌پروری نقش قابل توجهی در تقاضای جهانی برای تأمین غذا ایفا می‌کند، به‌طوری که تا سال ۲۰۳۰ غذای ۸ میلیون نفر وابسته به آن خواهد شد (Kumar et al. 2023). در این بین، پرورش میگو اهمیت مهمی در اقتصاد جهانی و امنیت غذایی دارد و منبع غنی از مواد مغذی مانند پروتئین، مواد معدنی، اسیدهای چرب غیراشباع ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA)[1] و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA)[2] را فراهم می‌کند که برای سلامت انسان ضروری هستند (Gao et al. 2022; Wikumpriya et al. 2023).

میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) یک گونه آبزی‌پروری مهم در سراسر جهان است که به دلیل مزایایی همچون قیمت بالا، حساسیت کم به بیماری و محبوبیت برای مصرف، یک کالای غذایی مهم و دارای سود اقتصادی به‌شمار می‌آید (Amiin et al. 2023) و به‌عنوان یک گونه غیر بومی در دنیا و ایران برای افزایش غذا در حال پرورش است (Peña-Navarro et al. 2020). تولید این میگو در سطح جهانی از طریق فعالیت‌های آبزی پروری به ۸۳٪ رسیده است (Wu et al. 2021) و پرورش آن در شوری کم روند رو به رشدی را در سراسر جهان نشان داده است (Chen et al. 2023).

استرس علت اصلی بسیاری از بیماری‌های میگو است. سلامت میگو تحت تأثیر عواملی مثل استرس محیطی که شامل کیفیت فراسنجه‌های آب (pH، شوری، دما و اکسیژن) است، قرار می‌گیرد (Sharma et al. 2009). نوسانات شوری یکی از با اهمیت‌ترین عوامل محیطی است که سوخت و ساز موجود زنده را مختل می‌کند و منجر به استرس جدی در سخت‌پوستان می‌شود (Thabet et al. 2017)، به‌طوری که از مهم‌ترین عوامل غیر زیستی مؤثر بر رشد، سوخت و ساز، ایمنی و بقای گونه‌های پنائیده در محیط‌های کشاورزی به حساب می‌آید (Rahi et al. 2021) و اگر مقدار آن نامساعد باشد، منجر به کاهش ایمنی، و موقعی که به مرحله حاد برسد منجر به مرگ میگو می‌شود (Lu-Qing et al. 2005). استرس شوری کم ممکن است به دستگاه ایمنی میگوهایی که در آب‌هایی با شوری کم زندگی می‌کنند، آسیب برساند و احتمال آلوده شدن آنها به باکتری‌های بیماری‌زا را افزایش دهد (Lin et al. 2012; Ramos-Carreño et al. 2014).

میگوی سفید غربی یوری هالین (Euryhaline) است و می‌تواند شوری بین ۰/۵ تا ۷۸ ppt را تحمل کند (Li et al. 2020)، ولی تغییرات شوری می‌تواند برای آن استرس‌زا باشد و آن‌را در معرض شرایط نامناسب، به خصوص عوامل آسیب‌رسان فرصت‌طلب قرار دهد و تعداد یاخته‌های هموسیت را کم کند (Perazzolo et al. 2002).

میگو مانند دیگر بی‌مهرگان دارای دستگاه ایمنی است که مبتنی بر پاسخ‌های ایمنی ذاتی یاخته ای و هومورال برای دفاع در برابر ریزموجودات مهاجم است (Li and Xiang, 2013). شمارش کل هموسیت (THC)[3] شاخص مهمی است که برای وضعیت ایمنی در میگوها استفاده می‌شود (Ernesto Ceseña et al. 2021). هرچه مقدار THC بالاتر باشد، پاسخ ایمنی قوی‌تر است و شانس ایجاد یاخته های بیگانه خوار در کنترل حملات ریزموجودات بیشتر می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد که محرک‌های ایمنی می‌توانند THC را افزایش دهند، زیرا باعث بلوغ سریع‌تر پیش‌سازهای خون‌ساز در بافت خون‌ساز و به دنبال آن آزاد شدن یاخته های جدید در دستگاه گردش خون برای حفظ کمیت و عملکرد هموسیت‌ها در میگو می‌شوند (Munaeni et al. 2020). اندازه‌گیری تعداد هموسیت‌های افتراقی (DHC)[4] نیز یکی از قابل اعتمادترین شاخص‌ها برای تعیین تأثیر رژیم‌های دستکاری شده بر ایمنی است (Coates et al. 2021). واکنش‌های ایمنی عمده در همولنف رخ می‌دهند که دارای سه نوع هموسیت است: یاخته‌های هیالین (دانه‌ای کوچک)، یاخته های نیمه‌گرانولار (نیمه‌دانه‌ای) و یاخته‌های گرانولار بزرگ

1- Eicosap Pentaenoic aAcid
2- Docosah Hexaenoic Acidacid
3- Total Hemocyte Count
4- Differential Haemocyte Count

(دانه‌ای بزرگ) که واسطه‌های اصلی در ایجاد پاسخ‌های یاخته ای و هومورال در سخت‌پوستان هستند (Roy, 2020). این یاخته‌ها در بافت‌های اطراف دستگاه گوارش و دیگر بافت‌ها و در همولنف نیز یافت می‌شوند و محصولات ضد میکروبی آن‌ها نقش دفاعی دارند و عمل بیگانه خواری و حذف ذرات خارجی و آلودگی‌ها را نیز انجام می‌دهند (Sung et al. 1996). یاخته‌های هیالین بیگانه‌خواری انجام می‌دهند (Johansson et al. 2000). یاخته‌های نیمه‌گرانولار در یک فرآیند سیتوتوکسیک در برابر عوامل بیماری‌زا ملانین تولید می‌کنند (Hauton, 2012). مرحله بعدی یاخته‌های گرانولار بزرگ هستند که حاوی پروتئازها، پپتیدهای ضدمیکروبی و عوامل چسبندگی یاخته‌ای هستند (Kulkarni et al. 2021).

خوراک نقش مهمی در توسعه و پایداری آبزی‌پروری دارد (Behera, 2022). استفاده از افزودنی‌های خوراکی دوستدار محیط‌زیست و محرک‌های ایمنی نه تنها با سلامت آبزیان مرتبط است، بلکه خطر اثرات مضر برای محیط‌زیست و مصرف‌کنندگان را نیز کاهش می‌دهد (Mohan et al. 2022). به‌کارگیری گیاهان دارویی با خاصیت ضداکسایشی در خوراک آبزیان پرورشی، یکی از روش‌های نوین در راستای بهبود عملکرد تولید و مقاوم‌سازی در برابر استرس‌های زیست‌محیطی است (Masoumi et al. 2023).

یونجه (*Medicago sativa*) یک محصول علوفه‌ای چند ساله با عملکرد زیست‌توده و غذایی با کیفیت بالاست که فیبر قابل هضم و پروتئین بالایی دارد (Yahaghi et al. 2019; Baha et al. 2021) و منبع انواعی از ویتامین‌ها، کاروتن، اسیدهای آمینه، آنزیم‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، اروتنوئیدها و توکوفرول‌هاست. تحقیقات انجام شده حاکی از کاربردهای آن مانند محافظت کننده عصبی، کاهش کلسترول خون، ضداکسایش، ضدزخم، ضدمیکروبی، کاهش چربی خون، تقویت کننده دستگاه ایمنی و گوارش، و همچنین مغذی برای بدن انسان در درمان تصلب شرایین، بیماری قلبی، سکته مغزی، سرطان و دیابت است (Bora and Sharma, 2011). برگ‌های یونجه یک ماده غذایی مهم به‌شمار می‌آیند و به‌دلیل ارزش غذایی و پروتئین بالا، به‌طور گسترده‌ای در غذای حیوانات و انسان استفاده می‌شوند (Zhang et al. 2017).

مطالعات متعددی نیز در مورد استفاده از یونجه در آبزی‌پروری انجام شده است. Vaitheeswaran و Ahamed Ali (۱۹۸۶) از عصاره یونجه در جیره میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) استفاده، و رشد و بقای بهتر را مشاهده کردند. استفاده از یونجه باعث افزایش وزن در خرچنگ پنجه قرمز استرالیا (*Cherax quadricarinatus*) شد (Metts et al. 2007). برگ یونجه در جیره باعث بهبود فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و همچنین افزایش فرآیند گوارش و بهبود جذب مواد غذایی از روده شد (Ali et al. 2024). همچنین اثرات سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی یونجه بر عملکرد رشد، تغذیه، فراسنجه‌های بیوشیمیایی لاشه و سرم خونی ماهی کپور معمولی نشان داد که تیمار ۴ درصد عصاره و ۹ درصد پودر یونجه بهترین و اقتصادی‌ترین تیمار برای به‌کارگیری در تغذیه این ماهی بوده است (Falamarzi et al. 2016). استفاده از یونجه به‌عنوان یک منبع کاروتنوئید طبیعی در تغذیه ماهی قرمز (*Carassius auratus*) نشان داد که می‌توان از آن به‌عنوان یک منبع کاروتنوئید طبیعی در رژیم غذایی استفاده کرد (Yanar et al. 2008).

تحقیق حاضر با هدف ارزیابی اثر سطوح مختلف پودر و عصاره برگ مکمل غذایی یونجه بر شاخص‌های ایمنی همولنف میگوی سفید غربی در مواجهه با استرس شوری پایین انجام شد. با این فرض که گیاه یونجه دارای خواص و متابولیت‌های ثانویه است و می‌تواند شاخص‌های ایمنی همولنف میگوی سفید غربی را در مواجهه با استرس شوری بهبود بخشد.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره

پس از تأیید اداره کشاورزی مبنی بر جنس یونجه مورد نظر، برگ‌های یونجه تازه از شهرستان حاجی‌آباد در استان هرمزگان جمع آوری شد. برگ‌های یونجه پس از شستشو در

دمای اتاق خشک و آسیاب شدند. برای تهیه عصاره، پودر برگ یونجه با الکل اتانول ۹۶٪ با نسبت حجمی ۱:۱۰ (وزن/حجم) مخلوط و در ارلن ریخته و با فویل آلومینیومی پوشانده شد. سپس به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه هات‌پلت در دمای اتاق قرار گرفته شد تا از مخلوط شدن کامل اطمینان حاصل شود. مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن و قیف شیشه‌ای فیلتر شد. مایع حاصل در دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته شد تا الکل آن تبخیر شود. وقتی عصاره غلیظ شد، تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با توجه به اینکه برای میگوی سفید غربی تحقیق خاصی در زمینه استفاده از عصاره و پودر برگ یونجه به طور اختصاصی نبوده، درصدهای پودر و عصاره با استناد به مقالات مربوط به ماهیان و نزدیک بودن درصدها تعیین شدند (Najafi et al. 2019). هفت جیره غذایی در سطوح پودر برگ یونجه (alfalfa leaf powder: ALP) (۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ گرم در کیلوگرم)، عصاره برگ یونجه (alfalfa leaf extract: ALE) (۶، ۱۲ و ۱۸ گرم در کیلوگرم) و کنترل صفر (بدون پودر و عصاره برگ یونجه) تنظیم شدند. با استفاده از نرم افزار جیره نویسی (Lindo ,Copyright 1999, release 6.1 USA) جیره‌های آزمایشی تعیین، و با جایگزینی سطوح مختلف پودر و عصاره برگ یونجه جیره‌ها تنظیم شدند (جدول ۱). مواد مورد نیاز جیره به صورت آسیاب شده از شرکت هرمز دام واقع در ایسین استان هرمزگان تهیه شد. پس از الک کردن مواد، در دستگاه همزن، اجزای خشک جیره با روغن ماهی، روغن سویا و آب مخلوط شده (برای جیره حاوی عصاره، عصاره رقیق شده با آب مقطر نیز به مواد جیره اضافه شده) و سپس با استفاده از دستگاه پلت‌ساز نیمه‌صنعتی (Maxim TYPE Y1000, China) در کارگاه تهیه غذای میگو واقع در تیاب شمالی استان هرمزگان، پلت‌ها با اندازه متناسب با دهان میگو (۳/۲ میلی‌متر) ساخته شدند (Van Wyk et al. 1999). پس از خشک شدن، جیره‌های غذایی را در کیسه‌های پلاستیکی ضخیم بسته‌بندی و شماره‌گذاری کرده و در دمای ۴°C نگهداری شدند.

جدول ۱ اجزا و ترکیب تقریبی جیره‌های آزمایشی جهت تغذیه میگوهای سفید غربی (*L. vannamei*)

Table 1 Ingredients and proximate composition of experimental diets for feeding of western whiteleg shrimp (*L. vannamei*)

Diets	Treatments						
Ingredients (g/kg)	Control	ALP60	ALP120	ALP180	ALE6	ALE12	ALE18
Sardine fish meal	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0
Moto fish meal	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0
Shrimp meal	44.0	44.0	44.0	44.0	44.0	44.0	44.0
Soybean meal	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0
Wheat meal	216.0	174.0	132.0	90.0	213.2	207.6	203.4
Wheat gluten	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0
Corn gluten	74.0	56.0	38.0	20.0	70.8	70.4	68.6
Bentonit	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Biender	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Premix	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Fish oil	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Soybean oil	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Alfalfa leaf	0.0	60.0	120.0	180.0	6.0	12.0	18.0
Chemical composition (g/kg)							
Crud protein	422.2	431.0	423.8	432.0	422.6	431.0	427.0

Crud lipid	115.4	120.3	122.0	117.1	114.0	113.0	116.9
Fiber	17.5	23.8	28.4	33.6	27.1	24.5	23.1
Ash	90.9	103.1	107.6	114.4	88.8	109.0	100.7
Moisture	110.3	113.00	109.3	112.0	111.5	112.5	110.8

[1]Permix (Daniran Shiraz Company): vitamin (A, D3, E, K3-Stab, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12, H2, C-Stay) inositol, L-carnitine, lysine, methionine, antioxidant, phosphate, betaine, multi-enzyme, iron, zinc, selenium, cobalt, copper, manganese and iodine.

شرایط آزمایش

انجام این پژوهش از آذر ۱۴۰۰ تا بهمن ۱۴۰۰ در کارگاه آموزش و بازسازی ذخایر آبزیان کلاهی وابسته به اداره کل شیلات استان هرمزگان انجام شد که در ۱۴۰ کیلومتری شهرستان بندرعباس و ۳۰ کیلومتری شهرستان میناب واقع است. میگوهای مورد نیاز برای پژوهش نیز از این مرکز تهیه شدند و برای آزمایش به مخازن فایبرگلاس گرد با گنجایش ۳۰۰ لیتر منتقل شدند. مخازن از قبل خوب شستشو و ضدعفونی شده و با ۲۰۰ لیتر آب فیلترشده دریا پر شدند. پس از یک هفته سازگاری و تغذیه میگوها با جیره غذایی پایه، زیست‌سنجی میگوها انجام شد. طراحی آزمایش و تیماربندی این تحقیق به‌طور تصادفی و روی میگوها با میانگین وزن ۱/۴۷g ± ۷/۵۸ انجام شد. تعداد ۱۰۵۰ قطعه میگو به‌طور تصادفی درون ۲۱ مخزن (هر مخزن ۵۰ قطعه میگو)، در قالب هفت تیمار (با سه تکرار) شامل پودر (۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ گرم در کیلوگرم)، عصاره (۶، ۱۲ و ۱۸ گرم در کیلوگرم) و کنترل (بدون پودر و عصاره) برگ یونجه قرار گرفتند. میگوها در طی ۶۰ روز پرورش، روزانه به میزان ۵٪ وزن بدن در سه نوبت و در ساعات ۸، ۱۴ و ۲۰ غذادهی شدند و هر روز، تعویض آب به میزان ۵۰٪ انجام شد. آب مخازن دارای دمای ۲ ± ۲۵ ℃، شوری ۰/۴۷ ± ۳۵ ppt، pH ۷/۵ و اکسیژن ۰/۵ ± ۸ mg/L بود. میگوهای هر یک از تیمارها به‌طور جداگانه در معرض استرس شوری پایین به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. پس از اتمام دوره تغذیه، از هر تیمار ۲۰ میگو با میانگین وزنی ۱/۹۱g ± ۱۱/۴۶ در دو تکرار که هر تکرار شامل ۱۰ میگو بود، برای استرس شوری ۵ppt استفاده شد. برای پایین آوردن شوری از آب شهر استفاده شد و سپس از کلر برای ضدعفونی و از تیوسولفات سدیم برای از بین بردن کامل کلر استفاده شد. بعد از آن آب به خوبی هوادهی شد. این آب شیرین به تدریج به مخازن هر تیمار اضافه شد و پس از تثبیت شوری آب که با شوری‌سنج سنجیده می‌شد، میگوها به مدت ۴۸ ساعت تحت این استرس قرار گرفتند (Akbarzadeh et al. 2019). در این مدت روزی یک‌بار به میگوها غذا داده شد تا به علت عدم تعویض آب، عدم میل به غذا و زیاد شدن بار آلی، آب دارای کیفیت خوبی باشد. میزان تلفات و بقای میگوهای مورد آزمایش در طی این مدت ثبت و درصد بازماندگی نیز با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

$$\text{Survival rate (\%)} = 100\times(S - D)/S$$

S: تعداد اولیه میگوهای مواجه شده با استرس در هر مخزن

D: تعداد میگوهای تلف شده در طول دوره مواجه با استرس در هر مخزن

همولنف‌گیری و اندازه‌گیری شمارش کل و افتراقی هموسیت

در پایان دوره تغذیه و پس از استرس شوری پایین، سه میگو از هر مخزن با روش توضیح داده شده توسط Niroomand و همکاران (۲۰۲۰) همولنف‌گیری شدند و در کمتر از ۲۴ ساعت از هر نمونه مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته شد توسط لام نئوبار و لامل سنگی، توسط میکروسکوپ مدل (Nikon, ECLIPSE E200) با بزرگ‌نمایی ۴۰X در آزمایشگاه شیلات دانشگاه هرمزگان شمارش‌کل همولنف انجام شد. برای شمارش افتراقی هموسیت که شامل یاخته‌های هیالین، نیمه‌گرانولار و گرانولار بزرگ است، از روش رنگ‌آمیزی می-گرانوالد گیمسا (May-Grünwald Giemsa) استفاده شد و با همان میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمایی ۱۰۰ X نیز شمارش

افتراقی هموسیت‌ها انجام شد (Baniesmaeili et al. 2022).

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov و برای بررسی همگنی واریانس‌ها از آزمون Levene استفاده شد. از نرم افزار SPSS 24 برای مقایسه بین میانگین‌ها و از آزمون واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) و تست Duncan در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار (SD) بیان شد.

نتایج

شمارش‌کل هموسیت‌های همولنف میگوهای سفید غربی که با جیره‌های حاوی سطوح مختلف پودر و عصاره برگ یونجه تغذیه شده بودند، در دو حالت نرمال و استرس شوری ppt ۵ سنجش شد که در جدول ۲ ارائه شده است. از لحاظ تعداد کل هموسیت‌ها، گروه شاهد با اختلاف معنی‌دار دارای کمترین میزان نسبت به دیگر تیمارها بود (p<۰/۰۵). در شوری ppt ۵، شمارش‌کل هموسیت‌ها در گروه شاهد با اختلاف معنی‌دار دارای کمترین میزان نسبت به تیمار پودر برگ یونجه g/kg ۱۸۰ و عصاره برگ یونجه g/kg ۱۸ بود (p<۰/۰۵) اما در شمارش‌کل هموسیت‌ها بین تیمارهای شوری نرمال و تیمارهای شوری ppt ۵ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵).

جدول ۲ شمارش‌کل هموسیت‌های میگوی سفید غربی(*L. vannamei*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر و عصاره برگ یونجه (*M. sativa*) در حالت نرمال و تحت استرس شوری پایین

Table 2 Total Hemocyte Count of western whiteleg shrimp (*L. vannamei*) fed with different levels of alfalfa leaf (*M. sativa*) powder and extract in normal state and under low salinity stress

Treatment	Normal salinity	Salinity 5 ppt
Control	$14883333.33 \pm 12808151.70^{Ab}$	$9883333.33 \pm 1910715.39^{Ab}$
ALP60	$40055555.55 \pm 14461164.46^{Aa}$	$23833333.33 \pm 21385353.24^{Aab}$
ALP120	$50566666.66 \pm 33702299.62^{Aa}$	$22166666.66 \pm 13051181.30^{Aab}$
ALP180	$62466666.66 \pm 36433638.30^{Aa}$	$43833333.33 \pm 25662878.50^{Aa}$
ALE6	$49155555.55 \pm 23223216.35^{Aa}$	$2933333.33 \pm 832666.39^{Aab}$
ALE12	$52611111.11 \pm 34585779.02^{Aa}$	$31000000.00 \pm 6557438.52^{Aab}$
ALE18	$56777777.77 \pm 17374750.19^{Aa}$	$46000000.00 \pm 10148891.56^{Aa}$

Two-way ANOVA was used to analyze the data.

Non-similar Latin lowercase letters above the numbers in each column indicate significant differences between treatments in each salinity ($p<0.05$) (mean ± SD).

Similar Latin capital letters above the numbers of each row indicate no significant differences between salinities in each treatment ($p>0.05$) (mean ± SD).

در شمارش افتراقی نتایج نشان داد که در هر دو شوری، تعداد هیالین‌های گروه شاهد دارای بیشترین میزان و با اختلاف معنی‌دار نسبت به دیگر تیمارها بود (p<۰/۰۵) و همچنین در مقایسه تعداد هیالین‌ها در تیمارهای دو شوری، هیالین‌های شوری نرمال دارای بیشترین مقدار و با اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمارهای شوری ppt ۵ بودند (p<۰/۰۵). تعداد یاخته‌های نیمه‌گرانولار گروه شاهد در شوری نرمال، دارای کمترین مقدار و با اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمارهای عصاره برگ و تیمار پودر برگ یونجه g/kg ۱۸۰ بود (p<۰/۰۵). در شوری ppt ۵، گروه شاهد دارای کمترین مقدار و با اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمارهای پودر برگ یونجه g/kg ۱۸۰ و عصاره برگ یونجه

g/kg ۱۸ بود (p<۰/۰۵). در مقایسه بین یاخته‌های نیمه‌گرانولار در تیمارهای شوری متفاوت، تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در شوری نرمال، مقدار گرانولار بزرگ گروه شاهد به طور معنی‌دار نسبت به تیمارهای دیگر کمتر بود (p<۰/۰۵)، اما در شوری ppt ۵ مقدار گرانولار بزرگ اختلاف معنی‌داری را در بین تیمارها نشان نداد (p>۰/۰۵). در بین تیمارهای شوری متفاوت فقط تعداد گرانولار بزرگ شوری ppt ۵ در تیمار کنترل با اختلاف معنی‌دار نسبت به شوری نرمال گروه شاهد بیشتر بود (p<۰/۰۵؛ جدول ۳).

جدول ۳ شمارش افتراقی هموسیت‌های میگوی سفید غربی(*L. vannamei*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر و عصاره برگ یونجه (*M. sativa*) در حالت نرمال و تحت استرس شوری پایین

Table 3 Differential haemocyte count of western whiteleg shrimp (*L. vannamei*) fed with different levels of alfalfa leaf (*M. sativa*) powder and extract in normal state and under low salinity stress

Treatment	Hyaline cell		Semi-granular cell		Granular cell	
	Normal salinity	Salinity 5 ppt	Salinity Normal	Salinity 5 ppt	Normal salinity	Salinity 5 ppt
Control	40.00 ± 5.65^{Aa}	26.0 ± 9.64^{Ba}	42.88 ± 7.00^{Ac}	42.00 ± 9.84^{Ab}	17.66 ± 5.97^{Bb}	32.00 ± 10.58^{Aa}
ALP60	11.66 ± 5.4^{Ab}	10.33 ± 5.50^{Ab}	50.44 ± 6.52^{Abc}	57.33 ± 13.65^{Aab}	37.88 ± 6.91^{Aa}	32.33 ± 8.32^{Aa}
ALP120	14.00 ± 5.31^{Ab}	7.33 ± 2.51^{Ab}	48.88 ± 7.23^{Abc}	48.66 ± 16.28^{Aab}	37.11 ± 10.93^{Aa}	44 ± 18.19^{Aa}
ALP180	12.33 ± 6.32^{Ab}	4.33 ± 3.21^{Bb}	55.22 ± 12.04^{Aab}	65.0 ± 8.66^{Aa}	32.66 ± 7.24^{Aa}	30.66 ± 5.5^{Aa}
ALE6	13.22 ± 7.54^{Ab}	9.33 ± 3.78^{Ab}	54.00 ± 7.34^{Ab}	53.33 ± 7.63^{Aab}	31.44 ± 9.87^{Aa}	37.33 ± 11.15^{Aa}
ALE12	4.77 ± 3.11^{Ab}	8.33 ± 6.02^{Ab}	63.44 ± 9.00^{Aa}	58.0 ± 8.18^{Aab}	32.77 ± 9.52^{Aa}	33.66 ± 6.65^{Aa}
ALE18	5.88 ± 2.57^{Ab}	3.00 ± 1.73^{Ab}	53.22 ± 10.50^{Ab}	64.00 ± 11.00^{Aa}	40.88 ± 10.45^{Aa}	33.33 ± 13.01^{Aa}

Two-way ANOVA was used to analyze the data.

Non-similar Latin lowercase letters above the numbers in each column indicate significant differences between treatments in each salinity ($p<0.05$; mean ± SD).

Non-similar Latin capital letters above the numbers of each row indicate significant differences between salinities in each treatment ($p<0.05$; mean ± SD).

در میزان بازماندگی در شوری نرمال، تیمارهای تغذیه با پودر و عصاره برگ یونجه با اختلاف معنی‌دار دارای بیشترین مقدار نسبت به گروه شاهد بودند ($p>0/05$). در شوری ۵ ppt نیز تیمار پودر برگ یونجه ۱۸۰ g/kg و عصاره برگ یونجه ۱۸ g/kg دارای بیشترین مقدار و با اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد بودند ($p<0/05$؛ جدول ۴).

جدول ۴ میزان بازماندگی میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) تغذیه شده با سطوح مختلف پودر و عصاره برگ یونجه (*M. sativa*) در حالت نرمال پرروش و تحت استرس شوری پایین

Table 4 Survival rate of western whiteleg shrimp (*L. vannamei*) fed with different levels of alfalfa leaf (*M. sativa*) powder and extract in normal state and under salinity stress

	Control	ALP60	ALP120	ALP180	ALE6	ALE12	ALE18
Normal salinity	90 ± 5.29^{b}	1.15^{a} $97.33 \pm$	96 ± 2^{a}	$\pm 1.15^{a}$ 99.33	$95.33 \pm$ 1.15^{a}	$94.66 \pm$ 3.05^{a}	95.33 ± 1.15^{a}
Salinity 5 ppt	70 ± 0.00^{b}	70 ± 10^{b}	75 ± 5^{ab}	85 ± 0.00^{a}	70 ± 0.00^{b}	70 ± 10^{b}	85 ± 5^{a}

Dissimilar letters in each row indicate significant differences between different treatments ($p<0.05$) (mean ± SD).

بحث

وجود استرس در میگو باعث مختل شدن دستگاه ایمنی و عملکرد سوخت و ساز آن شده و تأثیر به‌سزایی در ترکیب همولنف ایجاد می‌کند (Rosamma and Annies, 2007). استرس شوری تأثیر زیادی بر هموستاز یونی و فعالیت‌های فیزیولوژیک سخت‌پوستان در محیط‌های آبی دارد (Li et al. 2023) و باعث تجزیه یاخته‌ای و کاهش هموسیت‌ها می‌شود (Perazzolo et al. 2002). افزایش مقاومت بدن میگو را می‌توان از افزایش تعداد کل هموسیت‌ها و شمارش افتراقی هموسیت‌ها مشاهده کرد (Harlina et al. 2023). از گیاهان دارویی می‌توان در تغذیه آبزیان استفاده کرد چون به‌عنوان محرک دستگاه ایمنی عمل کرده و باعث فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی اختصاصی و یا غیر اختصاصی در آبزیان می‌شوند و مقاومت آنها را در مقابل عوامل استرس‌زای محیط پرورش افزایش می‌دهند (Ganguly et al. 2010). برگ گیاه یونجه دارای ترکیبات زیست فعال بالایی است و توان بالقوه آن را دارد که بتوان از آن به‌عنوان مکمل در آبزی پروری استفاده کرد؛ لذا در این تحقیق اثرات سطوح مختلف پودر و عصاره برگ گیاه یونجه بر عملکرد شاخص‌های ایمنی همولنف میگوی سفید غربی در مواجهه با استرس شوری ارزیابی شد. در مطالعه حاضر که از گیاه یونجه استفاده شد، افزایش قابل توجه تعداد THC در تمام گروه‌های مکمل را می‌توان با بیشینه آزادسازی مواد معدنی مانند مس و آهن مرتبط دانست (Reda et al. 2016) که این مواد در برگ یونجه وجود دارند (Rechulicz et al. 2014). فنل نیز در افزایش تعداد هموسیت‌ها نقش مهمی دارد. فلاونوئیدها ترکیبات مشتق شده از فنل هستند که THC را افزایش می‌دهند (Prayitno et al. 2022). همچنین فلاونوئیدها خاصیت ضداکسایشی بالایی دارند که نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولیدی ناشی از فعالیت‌های یاخته‌ها و استرس‌های محیطی وارد بر آن‌ها ایفا می‌کنند (Ak and Gülçin, 2008). این فنل و فلاونوئیدها در گیاه یونجه نیز وجود دارند (Karimi et al. 2013; Prayitno et al. 2022). افزایش THC یک پاسخ ایمنی است که به علت وجود ترکیبات در محرک‌ها اتفاق می‌افتد. هنگامی که این ترکیبات وارد غشای یاخته‌ای می‌شوند، یاخته‌های گیرنده هموسیت آنها را می‌شناسند و با افزایش تولید هموسیت پاسخ می‌دهند. هموسیت‌ها توسط یک جفت بافت فوق‌معدی که دقیقاً در قسمت بالایی معده جلویی قرار دارند، یکپارچه می‌شوند. این بافت‌ها به عنوان محل تولید هموسیانین عمل می‌کنند، بنابراین افزایش سطح هموسیانین به‌طور مستقیم با افزایش هموسیت‌ها متناسب است (Effendyet al. 2004). در این راستا، Avenido و Serruno (۲۰۱۲) از عصاره برگ حرا در جیره میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) استفاده و عنوان

کردند که هموسیت‌کل افزایش پیدا می‌کند. میگوهای سفید غربی تغذیه شده با غلظت mg/kg ۲۰۰ عصاره برگ گردوی ایرانی (*Juglans regia*)، ۰٫۵ عصاره برگ گواوا (*Psidium guajava*) و g/kg ۱۰ عصاره اتانولی (*Salvinia cucullata*) هموسیت بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند (Forouzani et al. 2021; Dewi et al. 2021; Santhosh et al. 2023). استفاده از زردچوبه در تغذیه میگوی سفید غربی باعث افزایش هموسیت‌کل در شرایط نرمال و استرس شوری ppt ۵ شد (Moghadam et al. 2022). Lin و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که تعداد هموسیت کل میگوهای سفید غربی در شوری پایین ppt ۲/۵ و ۵ نسبت به شوری ppt ۳۵ کمتر بوده است که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. در میگوی سفید غربی تغذیه شده با پودر و عصاره برگ مورینگا (*Moringa oleifera*) در شوری ۵ و ppt ۳۵، بیشترین مقدار هموسیت در شوری ppt ۳۵ مشاهده شد (Baniesmaeili et al. 2022). در مطالعه‌ای نیز از شوری صفر، ۲/۵ و ppt ۵ برای میگوی ببری سیاه استفاده کردند و شاهد کاهش هموسیت‌ها شدند که آن را استرس ناشی از شوری بیان کردند (Rahi et al. 2021). این نتایج با مطالعات دیگری که برای میگوی سفید غربی و سخت‌پوستان در شوری کم انجام شده نیز مطابقت دارد (Le Moullac and Haffiner, 2000; Wang and Chen, 2005) و علت را تغییر در فعالیت اندامک میتوکندری و در نهایت کاهش حجم هموسیت‌های در گردش، نسبت دادند. تعداد کل هموسیت‌ها به‌طور نامشخص، دائماً در حال تغییر است، برای اینکه میزان آن بر اساس تغییرات محیطی، استرس‌های شیمیایی و فیزیکوشیمیایی تغییر می‌کند (Hill et al. 1991). بنابراین بهتر است برای بررسی تأثیر پودر و عصاره برگ یونجه بر ایمنی، به بررسی درصد یاخته‌های هیالین، نیمه‌گرانولار و گرانولار بزرگ پرداخت.

در بین هموسیت‌ها، هیالین‌ها کوچکترین هستند که نسبت هسته به سیتوپلاسم در آنها بالاست و حداقل گرانولارها را دارند. مهم‌ترین فعالیت آنها بیگانه‌خواری است و قدرت چسبندگی بالایی دارند. اما در نیمه‌گرانولارها، نسبت هسته به سیتوپلاسم، حد واسط هیالین و گرانولار بزرگ است. آنها حاوی دانه‌های کمتر و سیتوپلاسم بیشتری هستند و علاوه بر بیگانه‌خواری ضعیفی که انجام می دهند، در تشکیل ندول، کپسول و انجام فنول اکسیداز، نقش مهمی در مسمومیت یاخته‌ای دارند. اما گرانولارهای بزرگ، دارای حجم زیاد، هسته کوچک و دانه‌های بزرگ‌تر هستند. آنها در تشکیل کپسول و ندول نقش محدودی دارند، در مسمومیت یاخته‌ای فعالند و مهم‌ترین نقش آنها در فنل اکسیداز است (Guzman et al. 1993; Yu and Song, 2000). یاخته‌های نیمه‌گرانولار، با میزان بالای پروتئین، آنزیم و دانه‌ها، از بقیه هموسیت‌ها ناپایدارتر و حساس‌ترند و زمانی که به وسیله ذرات خارجی تحریک شوند، به طور پی در پی دانه‌های خود را رها می‌کنند و به شدت باعث تحریک پارازیت‌ها می‌شوند (Sritunyalucksana and Soderhall, 2000; Jiravnichpaisal et al., 2006). در واقع بالاتر بودن نسبت نیمه‌گرانولارها، نشان‌دهنده بالاتر بودن سطح پاسخ ایمنی در میگوی سفید غربی است (Cerenius et al. 2010). در مجموع شمارش افتراقی هموسیت‌ها نشان داد که با توجه به بالاتر بودن تعداد گرانولارها، پودر و عصاره برگ یونجه پس از شصت روز غذادهی، باعث ارتقای سطح دستگاه ایمنی ذاتی میگو شده است. در تحقیقی میگوی سفید غربی تغذیه شده با پودر و عصاره برگ مورینگا *M. oleifera*، در شوری ۵ و ppt ۳۵، بیشترین تعداد یاخته های هیالین در شرایط شوری پایین مربوط به گروه شاهد، بیشترین میزان نیمه‌گرانولار در تیمارهای پودر و در تیمار عصاره برگ مورینگا g/kg ۰/۵ و همچنین بیشترین تعداد یاخته‌های گرانولار بزرگ در شرایط شوری نرمال در گروه شاهد دیده شد (Baniesmaeili et al. 2022). از عصاره زیره سیاه (*Nigella sativa*) در تغذیه میگوی سفید غربی استفاده شد و درصد هموسیت‌های نیمه‌گرانولار و گرانولار بزرگ در گروه تغذیه دارای بیشترین مقدار بود (Nur et al. 2022). همچنین عصاره آبی برگ مورینگا و *Panax notoginseng* باعث افزایش هموسیت‌های هیالین و نیمه‌گرانولار در میگوی سفید غربی شد (Chen et al. 2023). Masoomi و همکاران (۲۰۲۰) از نسبت‌های متفاوت پروتئین در جیره غذایی میگوی سفید غربی در شوری کم استفاده کرده و

تعداد هیالین در تیمار ۲۵٪ پروتئین در شوری صفر تا ppt ۳، دارای مقدار بیشتر و تعداد گرانولارها دارای مقدار کمتر نسبت به دیگر تیمارها بود.

در این تحقیق بقای بهتر در تیمارهای تغذیه را می‌توان به داشتن خاصیت ضد میکروبی، ضد قارچی و ضد اکسایشی یونجه و انواع متابولیت‌های ثانویه مثل ساپونین‌ها و فلاونوئید نسبت داد (Rafińska et al. 2017). زانتوفیل موجود در یونجه نیز سبب افزایش عملکرد ایمنی می‌شود که در مرگ و میر پایین نقش دارد (Kwiatkowska et al. 2017). در پودر و عصاره یونجه Loliolide وجود دارد (Hong et al. 2011; Falamarzi et al. 2016) که یک کاروتنوئید (به عنوان متابولیت β-کاروتن) است که خاصیت میکروب‌کشی دارد و میزان بقا را افزایش می‌دهد (Murata et al. 2019). هموسیت‌های سخت‌پوستان نقش مهمی در مکانیسم حفاظتی بدن در برابر عوامل بیماری‌زا مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و تک‌یاخته‌ای‌ها دارند (Rodriguez and Le Mollac, 2000). همچنین تحقیقات نشان داده است که تعداد کل هموسیت‌های میگو به روشی وابسته به زمان با کاهش شوری کاهش می‌یابد که می‌تواند باعث ضعیف شدن دستگاه ایمنی و کاهش مقاومت میگو در برابر عفونت‌ها شود (Esparza-Leal et al. 2019). در شوری نرمال، افزایش مقدار هموسیت کل و تعداد یاخته‌های نیمه‌گرانولار و گرانولار بزرگ در تیمارهای تغذیه شده با پودر و عصاره برگ یونجه می‌تواند بر روی بازماندگی تأثیر به‌سزایی بگذارد. در شوری پایین نیز با افزودن مقدار پودر و عصاره، بقای بهتر در میگوها مشاهده شد که می‌توان آن‌را به دلیل بالاتر بودن میزان ترکیبات مؤثره در جیره دانست که باعث افزایش ایمنی بیشتر و در نتیجه بقای بالاتر شد. در مقایسه بین شرایط نرمال پرورش و شرایط استرس، می‌توان عنوان کرد که استرس شوری پایین باعث پایین آمدن تعداد یاخته‌های هیالین و افزایش تعداد یاخته‌های گرانولار بزرگ شد و در تعداد یاخته‌های نیمه‌گرانولار تغییر معنی‌داری ایجاد نشد. برای توضیح دلیل این تغییرات، نیاز به انجام تحقیقات جدید در آینده است.

نتیجه گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که با توجه به تأثیر پودر و عصاره برگ گیاه یونجه بر هموسیت‌های همولنف، شاید بتوان از این گیاه در ارتقای سطح ایمنی میگوی سفید غربی در شوری نرمال و شوری پایین استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانواده‌های محترم برخورداری، درساره و دهقانی برای تهیه یونجه، از مهندس مرادی مدیریت محترم کارخانه خوراک هرمز دام برای تهیه جیره، از جناب مهندس درویشی، مهندس جمشید اسلامی (دانشجوی دکتری) و مهندس مجید اسلامی از کارگاه آموزش و بازسازی ذخایر آبزیان کلاهی جهت فراهم نمودن میگو و اجرای تحقیق، از دانشجوهای دکتری (مهندس مرتضی رئوفی و مهندس وحیده عبدی) و از دکتر اسدی مسئول آزمایشگاه شیلات دانشگاه هرمزگان ابراز می‌نمایند.

منابع

Ak, T., Gülçin, I. 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chemico-Biological Interactions 174: 27-37. doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.003.

Akbarzadeh, A., Pakravan, S., Karimi, K., Abkenar, K.B., Nimvari, M.E., Niroomand, M., Sobhani, S.A., Dorcheh, E.E. 2019. Utilization of date seed meal in the diet of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*): growth performance, body and fatty acid composition, biochemical parameters, and tolerance of salinity stress. Aquaculture International 27: 647-661. doi: 10.1007/s10499-019-00352-y.

Ali, B., Rawal, Y.K., Dhillon, O., Thayes, C., Sidharth Mittal, G. 2024. Dietary impact of Alfalfa on growth performance, biochemical profile, and resistance against *Aeromonas hydrophila* in fingerlings of

common carp. Fisheries Science 90: 453-465. doi: 10.1007/s12562-024-01757-2.

Amiin, M.K., Lahay, A.F., Putriani, R.B., Reza, M., Putri, S.M.E., Sumon, M.A.A., Jamal, M.T., Santanumurti, M.B. 2023. The role of probiotics in Vannamei shrimp aquaculture performance–A review. Veterinary World 16: 638. doi: 10.14202/vetworld.2023.638-649.

Avenido, P., Serrano Jr, A.E. 2012. Effects of the apple mangrove (*Sonneratia caseolaris*) on antimicrobial, immunostimulatory and histological responses in black tiger shrimp postlarvae fed at varying feeding frequency. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation 5: 112-123.

Baniesmaeili, Y., Akbazradeh, A., Riazi, G.H., Abdollahi, F., Niroomand, M. 2022. Effects of *Moringa oleifera* leaf powder and extract on the performance of hemolymph factors of *Litopenaeus vannamei* in the face of salinity stress. Fisheries Science and Technology 11: 357-367.

Behera, B.K. 2022. Nutritional Biotechnology to augment aquaculture production. In Advances in Fisheries Biotechnology Singapore 231-243. doi: 10.1007/978-981-16-3215-0_16.

Bora, K.S., Sharma, A. 2011. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. Pharmaceutical Biology 49: 211-220. doi:10.3109/13880209.2010.504732.

Cerenius, L., Jiravanichpaisal, P., Liu, H.P., Soderhall, I. 2010. Crustacean immunity. Invertebrate immunity 239-259. doi: 10.1007/978-1-4419-8059-5_13.

Chatzifotis, S., Esteban, A.G., Divanach, P. 2006. Fishmeal replacement by alfalfa protein concentrate in sharp snout sea bream *Diplodus puntazzo*. Fisheries Science 72: 1313-1315. doi: 10.1111/j.1444-2906.2006.01290.x.

Chen, Y., Zhou, L., Yu, Q., Li, E., Xie, J. 2023. Effects of sulfamethoxazole and florfenicol on growth, antioxidant capacity, immune responses and intestinal microbiota in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity. Antibiotics 12: 575. doi: 10.3390/antibiotics12030575.

Chen, Y.T., Kuo, C.L., Wu, C.C., Liu, C.H., Hsieh, S.L. 2023. Effects of *Panax notoginseng* water extract on immune responses and digestive enzymes in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Animals 13: 1131. doi: 10.3390/ani13071131.

Coates, C.J., Söderhäll, K. 2021. The stress–immunity axis in shellfish. Journal of Invertebrate Pathology 186: 107492. doi: 10.1016/j.jip.2020.107492.

Dewi, N.R., Huang, H.T., Wu, Y.S., Liao, Z.H., Lin, Y.J., Lee, P.T., Nan, F.H. 2021. Guava (*Psidium guajava*) leaf extract enhances immunity, growth, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 118: 1-10. doi: 10.1016/j.fsi.2021.08.017.

Effendy, S., Alexander, R., Akbar, T. 2004. Increased haemocytes of tiger prawn fry (*Penaeus monodon* F.) after soaking bread yeast extract (*Saccharomyces cerevisiae*) at different concentrations. Journal Sains Dan Teknologi 14: 46-53. doi: 10.54203/scil.2023.wvj4.

Ernesto Ceseña, C., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzman, G., Luna-Gonzalez, A., Campa-Cordova, A. 2021. Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. International Aquatic Research, 13: 1-16. doi: 10.22034/iar.2021.1904524.1066.

Eskin, M., Tamir, S. 2005. Dictionary of nutraceuticals and functional foods. CRC Press. Taylor and Francis Group, London, 768 p.

Esparza-Leal, H.M., Ponce-Palafox, J.T., Cervantes-Cervantes, C.M., Valenzuela-Quiñónez, W., Luna-González, A., López-Álvarez, E.S., Vázquez-Montoya, N., López-Espinoza, M., Gómez-Peraza, R.L. 2019. Effects of low salinity exposure on immunological, physiological and growth performance in *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research 50: 944-950. doi: 10.1111/are.13969.

Falamarzi, Z., Mousavi, S.M., Zakeri, M., Zanguee, N. 2016. Effects of different levels of meal and alcoholic extract of alfalfa (*Medicago sativa*) on growth performance, nutrition, carcass biochemical and some serum biochemical parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Fisheries 69: 235-251. doi: 10.22059/jfisheries.2016.59854.

Forouzani, S., Yahyavi, M., Mirbakhsh, M., Salarzadeh, A.R., Ghaednia, B. 2021. Effects of aqueous and acetone extracts of Persian walnut (*Juglans regia*) leaves on responses of immune system in farmed western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected to *Vibrio harveyi*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 20: 1291-1303. doi: //jifro.ir/article-1-4241-en.html.

Ganguly, S., Paul, I., Mukhopadhayay, S. K. 2010. Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture: a review. Israeli Journal of Aquaculture 62: 130-138.

Gao, G., Gao, L., Fu, Q., Li, X., Xu, J. 2022. Coculture of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and the macroalga *Ulva linza* enhances their growth rates and functional properties. Journal of Cleaner Production 349: 131407. doi: 10.1016/j.jclepro.2022.131407.

Guzmán, M.A., Ochoa, J., Vargas-Albores, F. 1993. Haemolytic activity in the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. Comparative Biochemistry and Physiology 106 A: 271-275. doi: 10.1016/0300-9629(93)90511-2.

Harlina, H., Rosmiati, R., Hamdillah, A., Syahrul, S., Isnansetyo, A. 2023. Increased non-specific immune activity of vaname shrimp *Litopenaeus vannamei* using a leaf flour mixture from *Ocimum basilicum* and *Piper betle* and their characteristic compounds. Research Square Platform LLC. doi: 10.21203/rs.3.rs-3350521/v1.

Hauton, C. 2012. The scope of the crustacean immune system for disease control. Journal of Invertebrate Pathology, 110: 251-260. doi: 10.1016/j.jip.2012.03.005.

Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Twumasi, P., Rowe, P.A., Bennett, S., Brewster, D., McMichael, A.J., Greenwood, B.M. 1991. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. Nature 352: 595-600. doi: 10.1038/352595a0.

Hong, Y.H., Wang, S.C., Hsu, C., Lin, B.F., Kuo, Y.H., Huang, C.J. 2011. Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 131-137. doi: 10.1021/jf102997p.

Huang, H.T., Lee, P.T., Liao, Z.H., Chen, H.Y., Nan, F.H. 2020. Effects of *Phyllanthus amarus* extract on nonspecific immune responses, growth, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology 107: 1-8. doi: 10.1016/j.fsi.2020.09.016

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology 211: 213-236.doi: 10.1016/j.imbio.2005.10.015.

Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191: 45-52. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00418-X.

Karimi, E., Oskoueian, E., Oskoueian, A., Omidvar, V., Hendra, R., Nazeran, H. 2013. Insight into the functional and medicinal properties of *Medicago sativa* (Alfalfa) leaves extract. Journal of Medicinal Plants Research 7: 290-297. doi: 10.5897/JMPR11.1663.

Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., Kokkattunivarthil Uthaman, S., Otta, S.K., Karunasagar, I., Kooloth Valappil, R. 2021. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. Reviews in Aquaculture 13: 431-459. doi: 10.1111/raq.12482.

Kumar, S., Verma, A.K., Singh, S.P. and Awasthi, A. 2023. Immunostimulants for shrimp aquaculture: paving pathway towards shrimp sustainability. Environmental Science and Pollution Research 30: 25325-25343. doi: 10.1007/s11356-021-18433-y.

Kwiatkowska, K., Kwiecień, M., Winiarska-Mieczan, A. 2017. Fast-growing chickens fed with lucerne protein-xanthophyll concentrate: growth performance, slaughter yield and bone quality. Journal of Animal and Feed Sciences 26: 131-140. doi: 10.22358/JAFS/70194/2017

Le Moullac, G., Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture 191: 121-131. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00422-1

Li, C., Li, N., Dong, T., Fu, Q., Cui, Y., Li, Y. 2020. Analysis of differential gene expression in *Litopenaeus vannamei* under high salinity stress. Aquaculture reports 18: 100423. doi: 10.1016/j.aqrep.2020.100423.

Li, F., Xiang, J. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. Developement and Comparative Immunology 39: 11-26. doi: 10.1016/j.dci.2012.03.016.

Li, Y., Ye, Y., Li, W., Liu, X., Zhao, Y., Jiang, Q., Che, X. 2023. Effects of salinity stress on histological changes, glucose metabolism index and transcriptomic profile in freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponense*. Animals 13: 2884. doi: 10.3390/ani13182884.

Lin, Y.C., Chen, J.C., Li, C.C., Morni, W.Z.W., Suhaili, A.S.N., Kuo, Y.H., Chang, Y.H., Chen, L.L., Tsui, W.C., Chen, Y.Y., Huang, C.L. 2012. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low salinity exposure. Fish & Shellfish Immunology 33: 324-331. doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.006.

Lu-Qing, P., Ling-Xu, J., Jing-Jing, M. 2005. Effects of salinity and pH on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Shellfish Research 24: 1223-1227. doi: 10.2983/0730-8000(2005)24[1223:EOSAPO]2.0.CO;2.

Masoomi, Z., Zakeri, M., Mousavi, S.M., Yavari, V. 2020. The effect of salinity and dietary protein on the hemolymph indices in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) juvenile. Journal of Marine Science and Technology 19: 1-11. doi: 10.22113/jmst.2018.117557.2114.

Masoumi, S.H., Adineh, H., Harsij, M., Jafariyan, H., Gholipour Kanani, H. 2023. Effects of garlic extract (*Allium sativum*) in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in the recirculating aquaculture system: growth performance, immune response and water quality. Fisheries Science and Technology 12: 322-334. doi:

//jfst.modares.ac.ir/article-6-70631-en.html.

Metts, L.S., Thompson, K.R., Xiong, Y., Kong, B., Webster, C.D., Brady, Y. 2007. Use of alfalfa hay, compared to feeding practical diets containing two protein levels, on growth, survival, body composition, and processing traits of Australian red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, grown in ponds. Journal of the World Aquaculture Society 38: 218-230. doi:10.1111/j.1749-7345.2007.00091.

Moghadam, H., Sourinejad, I., Johari, S.A. 2022. Dietary turmeric, curcumin and nanoencapsulated curcumin can differently fight against salinity stress in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Aquaculture Research 53: 3127-3139. doi: 10.1111/are.15825.

Mohan, K., Rajan, D.K., Muralisankar, T., Ganesan, A.R., Sathishkumar, P., Revathi, N. 2022. Use of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae meal in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry: A review of past and future needs. Aquaculture 553: 738095. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738095.

Munaeni, W., Yuhana, M., Setiawati, M., Wahyudi, A.T. 2020. Effect in white shrimp *Litopenaeus vannamei* of Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. Powder on immune genes expression and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* infection. Fish & Shellfish Immunology 102: 218-227. doi: 10.1016/j.fsi.2020.03.066.

Murata, M., Nakai, Y., Kawazu, K., Ishizaka, M., Kajiwara, H., Abe, H., Takeuchi, K., Ichinose, Y., Mitsuhara, I., Mochizuki, A., Seo, S. 2019. Loliolide, a carotenoid metabolite, is a potential endogenous inducer of herbivore resistance. Plant Physiology 179: 1822-1833. doi:10.1104/pp.18.00837.

Najafi, Z., Ouraji, H., Yeganeh, S., Keramat, A. 2019. The effect of alfalfa (*Medicago sativa*) alcoholic extract on growth performance, feed intake, body composition and blood biochemical parametersof rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Scientific Fisheries Journal 27: 1-9. doi: 10.22092/ISFJ. 2018.1022092.

Niroomand, M., Akbarzadeh, A., Ebrahimi, E., Sobhani, S.A., Sheikhahmadi, A. 2020. Effects of dietary black cumin seed meal on growth performance, blood biochemistry and fatty acid composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition 26: 1072-1082. doi: 10.1111/anu.13065.

Nur, I., Munaeni, W., Abidin, L.O.B. 2020. Assessment of antibacterial and immunostimulating activity of black cumin (*Nigella sativa*) extract against vibriosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The Thai Journal of Veterinary Medicine 50: 549-557. doi: 10.56808/2985-1130.3061.

Peña-Navarro, N., Castro-Vásquez, R., Vargas-Leitón, B., Dolz, G. 2020. Molecular detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* shrimps in Costa Rica. Aquaculture 30: 735190. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735190.

Perazzolo, L.M., Gargioni, R., Ogliari, P., Barracco, M.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfante penaeus* paulensis submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture 214: 19-33. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00137-0

Prayitno, S.B., Ardie, B.R., Novriadi, R., Herawati, V.E., Windarto, S. 2022. Effect of bioactive protein ingredients (motivtm) on total hemocyte and survival rate of Vannamei shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Indonesian Aquaculture Journal 17: 23-28. doi: 10.15578/iaj.17.1.2022.23-28.

Rafińska, K., Pomastowski, P., Wrona, O., Górecki, R., Buszewski, B. 2017. *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. Phytochemistry Letters 20: 520-539. doi: 10.1016/j.phytol.2016.12.006.

Rahi, M.L., Azad, K.N., Tabassum, M., Irin, H.H., Hossain, K.S., Aziz, D., Moshtaghi, A., Hurwood, D.A. 2021. Effects of salinity on physiological, biochemical and gene expression parameters of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*): Potential for farming in low-salinity environments. Biology 10: 1220. doi: 10.3390/biology10121220.

Ramos-Carreño, S., Valencia-Yáñez, R., Correa-Sandoval, F., Ruíz-García, N., Díaz-Herrera, F., Giffard-Mena, I. 2014. White spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to low and high salinity. Archives of Virology 159: 2213-2222. doi: 10.1007/s00705-014-2052-0.

Rechulicz, J., Ognik, K., Grela, E.R. 2014. The Effect of adding protein-xanthophylls concentrate (PX) from lucerne (*Medicago sativa*) on growth parameters and redox profile in muscles of carp, *Cyprinus carpio* (L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 14: 697-703. doi: 10.4194/1303-2712-v14_3_12.

Reda, R.M., Mahmoud, R., Selim, K.M., El-Araby, I.E. 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish & Shellfish Immunology 50: 255-262. doi: 10.1016/j.fsi.2016.01.040.

Rodrıguez, J., Le Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. Aquaculture 191: 109-119. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00421.

Rosamma, P., Annies, J. 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. Aquaculture 272: 87-97. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.047.

Roy, S., Bossier, P., Norouzitallab, P., Vanrompay, D. 2020. Trained immunity and perspectives for shrimp aquaculture. Reviews in Aquaculture 12: 2351-2370. doi: 10.1111/raq.12438.

Santhosh, P., Kamaraj, M., Saravanan, M., Nithya, T.G. 2023. Dietary supplementation of *Salvinia cucullata* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* to enhance the growth, nonspecific immune responses, and disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology 132: 108465. doi: 10.1016/j.fsi.2022.108465.

Sharma, S.R., Jayaprakash, S., Philipose, K. K., Radhakrishnan, E.V. 2009. Effect of salinity and pH on selected immune functions of the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837). Indian journal of fisheries 56: 183-187.

Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture 191: 53-69. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00411-7

Sung, H.H., Yang, Y.L., Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. Journal of Crustacean Biology 16: 278-284. doi: 10.1163/193724096X00063

Thabet, R., Ayadi, H., Koken, M., Leignel, V. 2017. Homeostatic responses of crustaceans to salinity changes. Hydrobiologia 799: 1-20. doi: 10.1007/s10750-017-3232-1.

Van Wyk, P., Davis-Hodgkins, M., Laramore, C.R., Main, K.L., Mountain, J., Scarpa, J. 1999. Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems. Ft.

Pierce, FL: Harbor Branch Oceanographic Institution, 220 p.

Vaitheeswaran, S., Ahamed Ali, S. 1986. Evaluation of certain substances as growth-promoting agents for the prawn *Penaeus indicus*. Indian Journal of Fisheries 33: 95-105.

Wang, L.U., Chen, J.C. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. Fish & Shellfish Immunology 18: 269-278. doi: 10.1016/j.fsi.2004.07.008.

Wikumpriya, G.C., Prabhatha, M.W.S., Lee, J., Kim, C.H. 2023. Epigenetic modulations for prevention of infectious diseases in shrimp aquaculture. Genes 14: 1682. doi: 10.3390/genes14091682.

Wu, S., Zhao, M., Gao, S., Xu, Y., Zhao, X., Liu, M., Liu, X. 2021. Change regularity of taste and the performance of endogenous proteases in shrimp (*Penaens vannamei*) head during autolysis. Foods 10: 1020. doi: 10.3390/foods10051020.

Yahaghi, Z., Shirvani, M., Nourbakhsh, F., Pueyo, J.J. 2019. Uptake and effects of lead and zinc on alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth: Role of plant growth promoting bacteria. South African Journal of Botany 124: 573-582. doi: 10.1016/j.sajb.2019.01.006

Yanar, M., Erçen, Z., Hunt, A.Ö., Büyükçapar, H.M. 2008. The use of alfalfa, *Medicago sativa* as a natural carotenoid source in diets of goldfish, *Carassius auratus*. Aquaculture 284: 196-200. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.050

Ye, Y., Zhu, B., Yun, J., Yang, Y., Tian, J., Xu, W., Du, X., Zhao, Y., Li, Y. 2024. Comparison of antioxidant capacity and immune response between low salinity tolerant hybrid and normal variety of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture International: 32: 1879-1894. doi: 10.1007/s10499-023-01248-8.

Yu, C.I., Song, Y.L. 2000. Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. Fish Pathology 35: 21-24. doi: 10.3147/jsfp.35.21.

Zhang, W., Grimi, N., Jaffrin, M.Y., Ding, L., Tang, B. 2017. A short review on the research progress in alfalfa leaf protein separation technology. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 92: 2894-2900. doi: 10.1002/jctb.5364.