University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 1, 2023, pages: 27-41
DOI: 10.22124/janb.2023.24268.1201

Effects of dietary *Moringa oleifera* leaf powder and ethanolic extract on expression function of immune genes of *Litopenaeus vannamei*

Seyedeh Yalda Baniesmaeili[1], Arash Akbarzadeh[1]*, Gholamhossein Riazi[2], Farzin Abdollahi[3], Mohammad Niroomand[1]

1- Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Hormozgan, Iran
2- Institute Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran
3- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Hormozgan, Iran

Received 01 December 2022 Revised 18 March 2023 Accepted 30 March 2023

KEYWORDS

Moringa oleifera
Gene expression
Shrimp
Immune system

ABSTRACT

Nowadays, given the numerous disease problems that have arisen in shrimp farms, the utilization of nutritional supplements to strengthen the immune response and controlling the common diseases in dense shrimp farming have been highly regarded. So, the present study aimed to investigate the effect of basic diet formulated with different levels of *Moringa oleifera* leaf powder (25, 50 and 100g/kg) and ethanolic extract (0.25, 0.5 and 1g/kg) in seven treatments each with three replicates on the expression of immune genes in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. After 8 weeks, the mRNA expression of four immune genes, including alpha-2-macroglobulin (α2M), Lipopolysaccharide and B1,3-glucan binding protein (LGBP), Peroxinectin (PX) and integrinß, were measured in the hepatopancreas using Real-time PCR technique. The results showed a statistically significant differences in the expression levels of the α2M, LGBP, PX genes in all treatments ($p<0.05$). The expression level of α2M in treatments of 0.25 and 0.5 g/kg extracts and 25 g/kg Moringa leaf powder were significantly higher than that of the other treatments ($p<0.05$). The highest levels of LGBP expression were observed in 0.5 and 1g/kg Moringa leaf extract and the highest level of PX gene expression was observed in 0.5 and 1g/kg Moringa leaf extract and 25g/kg Moringa leaf powder treatments, which was significantly higher than other treatments and the control treatment ($p<0.05$). In conclusion, the results of this study showed the positive effects of using 0.5 and 1 g/kg Moringa leaf extract and 25 g/kg leaf powder on the functioning of the immune system in *L. vannamei*.

*Corresponding author: akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

CC BY NC

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال نهم، شماره یکم، فروردین ۱۴۰۲، صفحات ۴۱-۲۷

DOI: 10.22124/janb.2023.24268.1201

"مقاله پژوهشی"

تأثیر پودر و عصاره الکلی برگ مورینگا *Moringa oleifera* در جیره غذایی بر عملکرد بیان ژن‌های ایمنی میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

سیده یلدا بنی اسماعیلی[۱]، آرش اکبرزاده[۱*]، غلامحسین ریاضی[۲]، فرزین عبدالهی[۳]، محمد نیرومند[۱]

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، هرمزگان

۲- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، تهران، تهران

۳- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، هرمزگان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۰

کلمات کلیدی

Moringa oleifera

بیان ژن

میگو

دستگاه ایمنی

چکیده

امروزه با توجه به مشکلات متعددی که در زمینه بروز بیماری در مزارع پرورش میگو به‌وجود آمده است، به استفاده از مکمل‌های غذایی تقویت کننده پاسخ ایمنی و کنترل کننده بیماری‌های متداول در پرورش متراکم میگو بسیار توجه شده است. در این راستا در پژوهش حاضر، تأثیر فرمولاسیون جیره پایه با سطوح مختلف تیمارهای پودر برگ مورینگا *Moringa oleifera* (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ g/kg)، عصاره (۰/۲۵، ۰/۵و ۱ g/kg) و گروه شاهد بدون افزودن مورینگا بر بیان ژن‌های ایمنی میگوی سفید غربی *Litopenaeus vannamei* در قالب هفت تیمار و هر تیمار شامل سه تکرار، بررسی شد. پس از ۸ هفته تغذیه با درصدهای مختلف پودر و عصاره برگ مورینگا، بیان ۴ ژن ایمنی شامل a2macroglobulin (a2-M)، Lipopolysaccharide and B1,3- glucan binding protein (LGBP)، Peroxinectin (PX) و integrinß با روش Real-time PCR بررسی شد. نتایج اختلاف معنی دار آماری را در میزان بیان ژن های a2-M، LGBP، PX در تمام تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). میزان بیان ژن a2-M در تیمارهای عصاره ۰/۲۵و ۰/۵ g/kg و تیمار پودر ۲۵ g/kg برگ مورینگا به طور معنی‌دار بیش از دیگر تیمارها بود (p<۰/۰۵). بیشترین مقدار بیان ژن LGBP مربوط به تیمار عصاره ۰/۵ و ۱ g/kg برگ مورینگا و بیشترین میزان بیان ژن PX در تیمار عصاره ۰/۵ و ۱ g/kg و تیمار پودر ۲۵ g/kg برگ مورینگا بود که به طور معنی‌دار بیش از دیگر تیمارها و گروه شاهد مشاهده شد (p<۰/۰۵). در مجموع نتایج این تحقیق اثرات مثبت استفاده از ۰/۵ و ۱ g/kg عصاره و ۲۵ g/kg پودر برگ گیاه مورینگا بر عمکرد دستگاه ایمنی در میگوی سفید غربی را نشان داد.

نویسنده مسئول: akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

مقدمه

کل تولیدات جهانی میگوی دریایی پرورشی در ۱۰ سال گذشته ۸۶٪ افزایش یافته و تولید عمده بر اساس دو گونه میگوی سفید غربی با ۸۳/۱٪ تولید و میگوی ببری با ۱۱/۸٪ است (Emerenciano et al. 2022). برای همگام شدن با این رشد، صنعت آبزی پروری باید با استفاده از راهبردهای تولید پایدار گسترش یابد (FAO, 2012). دستگاه ایمنی اکتسابی میگو ضعیف، و از نظر تکاملی فاقد ظرفیت کافی برای واکسیناسیون است، زیرا مولکول‌های ایمونوگلوبولین در این حیولنات وجود ندارد (Satoh et al. 2008). لذا میگو برای مقابله با عوامل بیماری‌زا، وابسته به دستگاه ایمنی ذاتی خود است (Hoffmann et al. 1999). به همین دلیل، سلامت میگو و بالا بردن سطح ایمنی آن، نیاز اولیه در این صنعت است. استفاده از افزودنی‌های طبیعی در رژیم غذایی آنها به عنوان محرک ایمنی، ضداکسایش و مواد ضد ویروسی ممکن است بهترین راه حل باشد. امروزه کاربرد محرک‌های رشد طبیعی که باعث تحریک رشد و مقاومت در ایمنی می‌شوند، در آبزی‌پروری در حال افزایش است (Kohshahi et al. 2019). ترکیبات زیست‌فعال و شیمیایی موجود در گیاهان اثرات مثبتی در دستگاه ایمنی ذاتی و اکتسابی ماهی و سخت‌پوستان می‌گذارند. این ترکیبات می‌توانند به عنوان محرک رشد عمل کنند، دستگاه ایمنی را تحریک کنند و همچنین، به عنوان یک ضد میکروب با طیف گسترده عمل کنند (Harikrishnan et al. 2011).

یکی از گیاهان مهمی که در طی سالیان متمادی در آبزی‌پروری شناخته شده است، گیاه مورینگا، *Moringa oleifera* متعلق به خانواده Moringaceae است (Ramachandran et al. 1980). پراستفاده‌ترین قسمت این درخت برگ‌های آن است که دارای تعداد زیادی ترکیبات زیست فعال از جمله پلی‌فنول‌ها (اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها) و کاروتنوئیدهاست (Adedapo et al. 2015). برگ های این درخت سرشار از کاروتنوئیدها، ویتامین A و C، پتاسیم و پروتئین هستند (Asare et al. 2012). برگ این گیاه، منبعی غنی از اسیدهای چرب اشباع نشده امگا ۳ و امگا ۶ است که به اسید چرب غیراشباع (PUFAs)، به شکل اسید لینولنیک و اسید لینولئیک شناخته شده است (Saini et al. 2016).

مطالعات متعددی فعالیت‌های مفید گیاه مورینگا را در بدن حیوانات آبزی مشخص کرده‌اند (Leone et al. 2015; Tekle and Sahu, 2015; Puycha et al. 2017; David-Oku et al. 2018; Shourbela et al. 2020). مطالعات گذشته نشان داده استفاده از ۰/۵٪ عصاره برگ گیاه مورینگا می‌تواند اثرات مثبتی بر عملکرد رشد، فیزیولوژیک و ایمنی بدن میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) بگذارد و همچنین، از استرس حاد استرس آمونیاکی بکاهد (Kaleo et al. 2019). در یک مقاله مروری کشت، ژنتیک، اتو فارماکولوژی، فیتوشیمی و خواص دارویی برگ گیاه مورینگا بررسی، و مشخص شد که مورینگا، گیاهی مناسب برای استفاده در ترکیبات زیست‌فعال است (Leone et al. 2015). در تحقیقی که به بررسی عملکرد رشد و تجزیه و تحلیل بیان ژن شاخص رشد و لیپید ماهی تیلاپیای نیل، *Oreochromis niloticus* تک جنسیتی تغذیه‌شده با پودر برگ مورینگا پرداختند، مشاهده شد که گنجاندن رژیم غذایی ۵٪ پودر برگ مورینگا به طور قابل توجهی سبب بهبود عملکرد رشد، وزن و ضریب تبدیل غذایی می‌شود (El-Kassas et al. 2020). Ahmed و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقی جامع قابلیت استفاده از گیاه مورینگا به عنوان یک مکمل غذایی را در جیره غذایی ماهی تیلاپیای نیل بررسی، و نشان دادند که افزودن گیاه مورینگا تا ۱۵٪ به جیره غذایی می‌تواند شاخص‌های ایمنی و رشد را بهبود بخشد. همچنین، مطالعه دیگری نشان داد که استفاده از عصاره آبی برگ گیاه مورینگا موجب بهبود عملکرد دستگاه ایمنی، رشد و مقاومت به عفونت *Vibrio alginolyticus* در میگوی سفید غربی شد (Abidin et al. 2022).

در سخت پوستان و به‌خصوص در میگوها گروهی از ژن‌ها به‌عنوان بایومارکر ایمنی به‌خوبی شناخته شده‌اند. برای مثال، ژن‌های integrin β، α2 peroxinectin (PX)، macroglobulin (α2-M) و lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) از جمله ژن‌های شناخته شده‌ای هستند که به عنوان بایومارکر ایمنی در بسیاری از مطالعات مرتبط با ایمنی در

میگوها استفاده شده‌اند (Lin et al. 2012 a,b; Wang et al. 2007). پروتئین α2M با دیگر پروتئین‌ها ترکیب می‌شود و اثر سمی عوامل بیماری‌زا را خنثی می‌کند (Le Moullac et al. 1997). LGBP قادر به تشخیص LPS و BG دیواره یاخته‌ای باکتری‌ها بوده و به آنها متصل می‌شود. تشکیل این ترکیب باعث فعال شدن دستگاه پروفنول اکسیداز میگو و به دنبال آن PO، بیگانه‌خواری (فاگوسیتوز)، انفجار تنفسی و در نهایت، دفاع ضداکسایشی می‌شود (Kim et al. 2000). زمانی که ذرات خارجی وارد بدن میگو می‌شوند، دستگاه پروفنول اکسیداز فعال شده و همزمان با آن peroxinectin به خارج از هموسیت‌ها (یاخته‌های خونی) ترشح شده و در خارج از یاخته فعال می‌شود. سپس از این طریق، یاخته های سمی و بزرگ دگرانوله شده، حالت چسبنده پیدا کرده، به شدت به هدف چسپیده، در سطح آن پخش شده و یک پوشش چند لایه یاخته‌ای را دور مهاجم تشکیل دهند (Johansson et al. 1995). در نهایت از نقش‌های integrin ß در میگوها می‌توان به فاگوسیتوز، تشکیل ندول و کپسول (Zhuang et al. 2008)، چسبندگی، انتقال سیگنال های انفجار تنفسی، بقاء، تکثیر یاخته‌ای و دگرانوله شدن هموسیت‌ها اشاره کرد (Lin et al. 2013).

با توجه به خواص ایمنی زایی شناخته شده گیاه مورینگا و همچنین اهمیت تقویت دستگاه ایمنی میگو، در تحقیق حاضر اثر سطوح مختلف پودر و عصاره الکلی برگ گیاه مورینگا بر عملکرد دستگاه ایمنی میگوی سفید غربی بررسی شد. به این منظور، بیان ژن‌های شاخص دستگاه امینی که به‌عنوان بایومارکر عملکرد دستگاه ایمنی شناخته شده‌اند، شامل α2M، LGBP ، PX وß integrin در پاسخ به استفاده از پودر و عصاره الکلی برگ گیاه مورینگا در جیره غذایی میگو بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جیره

برگ سبز گیاه مورینگا بعد از شستشو، در دمای اتاق، خشک و سپس آسیاب شد. عصاره‌گیری با افزودن نسبت ۱ به ۱۰ متانول ۷۰٪ به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق انجام شد. در طی این مدت محلول به‌طور مرتب هم زده شد. سپس، محلول صاف شده، پس از رسوب‌گیری با دستگاه روتاری عصاره‌گیری، و عصاره حاصل در ظرف‌های شیشه‌ای با حجم مناسب قرار گرفت و سپس در زیر هود و در دمای اتاق تغلیظ و خشک شد و در زمان استفاده در غلظت‌های مشخص در آب حل، و به جیره افشانه شد (Mariita et al. 2011).

در این تحقیق، هفت جیره غذایی شامل سطوح مختلف صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ گرم در کیلوگرم پودر برگ مورینگا و ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ گرم در کیلوگرم عصاره برگ مورینگا تهیه شد. جیره های شاهد و حاوی سطوح مختلف پودر برگ مورینگا با استفاده از نرم‌افزار Lindo1/6 (USA) تنظیم شد (جدول ۱). برای ساخت جیره‌ها، مواد اولیه، از جمله پودر برگ مورینگا به مقدار مورد نیاز توزین شده و به مدت ۲۰ دقیقه در میکسر (مخلوط کن) به‌خوبی هم زده شدند و سپس، آب مقطر برای تهیه یک خمیر یکنواخت، به مخلوط اضافه شد. در جیره‌های حاوی عصاره برگ مورینگا این عصاره در آب مقطر حل، و به جیره اضافه شد. سپس، این مواد از چرخ گوشت با چشمه ۳ میلی‌متر عبور داده شدند و جیره‌های غذایی به صورت جداگلنه، روی پلاستیک‌های تمیز، به مدت ۴۸ ساعت در معرض باد دستگاه تهویه (فن) قرار گرفتند. در نهایت، پلت‌های غذایی در کیسه‌های زیپ‌دار نایلونی بسته‌بندی و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Arshadi et al. 2016).

جدول ۱ اجزای تشکیل دهنده جیره ها و سنجش تقریبی ترکیبات شیمیایی آنها

مواد خام	درصد اجزای غذایی در تیمارهای آزمایشی (گرم)						
	Control	MOLP 25	MOLP 50	MOLP 100	MOLE 0.25	MOLE 0.5	MOLE 1.0
پودر ماهی ساردین	۱۳	۱۳/۸	۱۴/۷	۱۶/۴	۱۳	۱۳	۱۳
پودر ماهی موتو	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
آرد سویا	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
آرد گندم	۲۰	۱۸/۶	۱۷	۱۴/۲	۱۹/۹	۱۹/۹	۱۹/۷
گلوتن گندم	۹/۶	۹/۶	۹/۶	۹/۶	۹/۶	۹/۶	۹/۶
گلوتن ذرت	۱۳/۴	۱۱/۷	۹/۹	۶/۴	۱۳/۲	۱۳/۱	۱۲/۷
بنتونیت	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
بایندر	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
پرمیکس	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
روغن ماهی	۴	۳/۹	۳/۹	۳/۶	۴	۴	۴
روغن سویا	۲	۲	۱/۹۳	۱/۸	۲	۲	۲
مورینگا	۰	۲/۵	۵	۱۰	۰/۲۵	۰/۵	۱
ترکیب شیمیایی جیره غذایی (٪)							
پروتئین	۴۲/۴۸	۴۰/۷۵	۴۳/۲۲	۴۲/۰۲	۴۳/۳۹	۴۳/۰۳	۴۲/۳۲
چربی	۸/۱۸	۹/۵۹	۸/۸	۸/۲۳	۸/۱۵	۸/۰۲	۸/۱۷
کربوهیدرات	۲۸/۱	۲۹/۸۷	۲۷/۶۱	۲۶/۰۶	۲۶/۶۴	۲۷/۴۳	۲۷/۱۹
خاکستر	۱۰/۶۶	۹/۷۱	۱۰/۰۳	۱۱/۶۷	۱۰/۱۴	۱۰/۴۹	۱۱/۱۲
رطوبت	۱۰/۵۸	۱۰/۰۸	۱۰/۳۴	۱۲/۰۲	۱۱/۶۸	۱۱/۰۳	۱۱/۲
ماده خشک	۸۹/۴۲	۸۹/۹۲	۸۹/۶۶	۸۷/۹۸	۸۸/۳۲	۸۸/۹۷	۸۸/۸
انرژی (kcal/kg)	۱/۹۵۸ ۸	۱۸۵۴/۲۶۹	۱۸۴۲/۴۸۴	۱۷۶۴/۹۸۹	۱۸۰۴/۱۳۷	۱۸۰۴/۰۹۴	۱۷۸۹/۱۳۵

۱. روغن ماهی و سویا به نسبت ۲ به ۱ استفاده شد. ۲. مخلوط آرد گندم به آرد سویا به نسبت ۷۰ به ۳۰ است که میزان پروتئین آن معادل پروتئین مورینگا یعنی تقریباً ۲۵/۱٪ برای تعادل جیره در نظر گرفته شد. ۳. پرمیکس (۲٪ کنسانتره خوراک میگو شرکت Creve Tec): پروتئین گندم، حداقل مقدار ویتامین ها: (اینوزیتول، بیوتین، اسید فولیک، اسید نیکوتینیک، اسید پانتوتنیک، ویتامین B_2 (ریبوفلاوین)، ویتامین B_1 (تیامین)، ویتامین B_6 (پیریدوکسین)، ویتامین B_{12} (سیانوکوبالامین)، ویتامین A1000، ویتامین D_3، ویتامین K، ویتامین C (اسید اسکوربیک)، کولین، مواد معدنی کمیاب آلی: (آهن، مس، منگنز، روی، سلنیوم، ید)، فسفات ها، تقویت کننده هضم، کلسترول.

شرایط آزمایش

این تحقیق با انتقال ۱۰۰۰ عدد میگوی وانامی از استخر نرسری مزرعه کشت و صنعت سایت تیاب جنوبی شهرستان میناب، به کارگاه آموزش و بازسازی ذخایر آبزیان کلاهی وابسته به اداره کل شیلات استان هرمزگان آغاز شد. پس از سپری شدن ۱۰روز سازگاری، ۴۰ عدد میگوی سالم با وزن اولیه ۰/۰۲ ± ۲/۶ گرم، درازای اولیه ۰/۰۱ ± ۶/۵ سانتی‌متر و درازای کاراپاس ۰/۰۱ ± ۲/۲ سانتی‌متر در ۲۱ مخزن گرد

پلی‌اتیلنی ۳۰۰ لیتری (با قطر ۸۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر) حاوی ۲۸۰ لیتر آب فیلتر شده دریا در قالب هفت تیمار و هر تیمار شامل سه تکرار به صورت کاملاً تصادفی ذخیره‌سازی شدند. در طی دوره آزمایش، یک روز در میان ۱۰٪ از آب مخازن قبل از غذادهی نوبت صبح سیفون می‌شد تا مدفوع و باقیمانده‌های غذایی از مخازن خارج شود. به طور میانگین آب مخازن در طی دوره پرورش دارای شوری ۰/۵ ± ۳۶/۵ ppt، pH ۷/۸-۸/۵، اکسیژن محلول ۰/۴ ± ۶/۸ میلی‌گرم بر لیتر و دمای ۲ ± ۳۱ درجه سانتی‌گراد بود. میگوها در طی ۸ هفته دوره پرورش روزانه به میزان تقریباً ۶٪ وزن بدن و در سه وعده غذادهی شدند.

در پایان آزمایش تغذیه به صورت تصادفی از ۵ میگوی موجود در هر تکرار هپاتوپانکراس گرفته و در کرایوتیوب ۲ µL قرار داده شد. نمونه ها به مخزن ازت منتقل و در نهایت، در فریزر ۸۰- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران (IBB) قرار داده شدند. سپس آزمایش‌ها بیان ژن طی مراحل زیر انجام شد:

برای استخراج RNA مقدار ۵۰ الی ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت هپاتوپانکراس ۵ نمونه میگو از هر تیمار را خارج کرده، پس از همگن کردن نمونه ها، از محلول RNX Plus 1.0 mL (SinaClon BioScience, Iran) طبق پروتکل استفاده شد. به منظور تعیین کمیت RNA های استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری و نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر (nm) که نشان دهنده خلوص RNA استخراج شده است و برای تعیین کیفیت RNA ها از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد. در نهایت، از DNaseI (SinaClon BioScience, Iran) برای حذف DNA موجود در نمونه ها استفاده شد. پس از حاصل شدن اطمینان از کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده، برای تولید cDNA از ۱۰۰۰ng/uL محلول RNA استخراج شده و کیت (Sinaclon First Strand cDNA Synthesis Kit) استفاده شد. cDNA های ساخته شده پس از تولید تا زمان انجام واکنش‌های PCR و Real-Time PCR در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. لازم به ذکر است که واکنش‌های PCR برای انتخاب بهترین جفت آغازگر برای انجام واکنش Real-time PCR انجام شد. برای بررسی بیان ژن‌های هدف و مرجع (ژن بتااکتین) از روش Real-Time PCR توسط دستگاه Qiagen 5PLEX Real-time PCR ساخت کشور آلمان با استفاده از ۰/۱ میکروگرم cDNA و غلظت ۱۰۰ نانومولار از پرایمرهای Forward و Reverse و کیت 2X Real-Time PCR Master Mix (For SYBR® Green I) شرکت BioFact, South Korea استفاده شد. توالی پرایمرها، درازای قطعات تکثیر شده با هر جفت پرایمر، دمای Annealing مربوط به هر جفت پرایمر در Real-time PCR و کد دسترسی پرایمرها در NCBI در جدول ۲ آورده شده است. برای کمی سازی داده های Real-time PCR از رابطه $۲^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001) استفاده شد که در آن $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{target} - \Delta Ct_{calibrator})$ و $\Delta Ct = Ct_{target\ gene} - Ct_{reference\ gene}$. در پایان هم $\log^2$ هر داده کمی گرفته شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

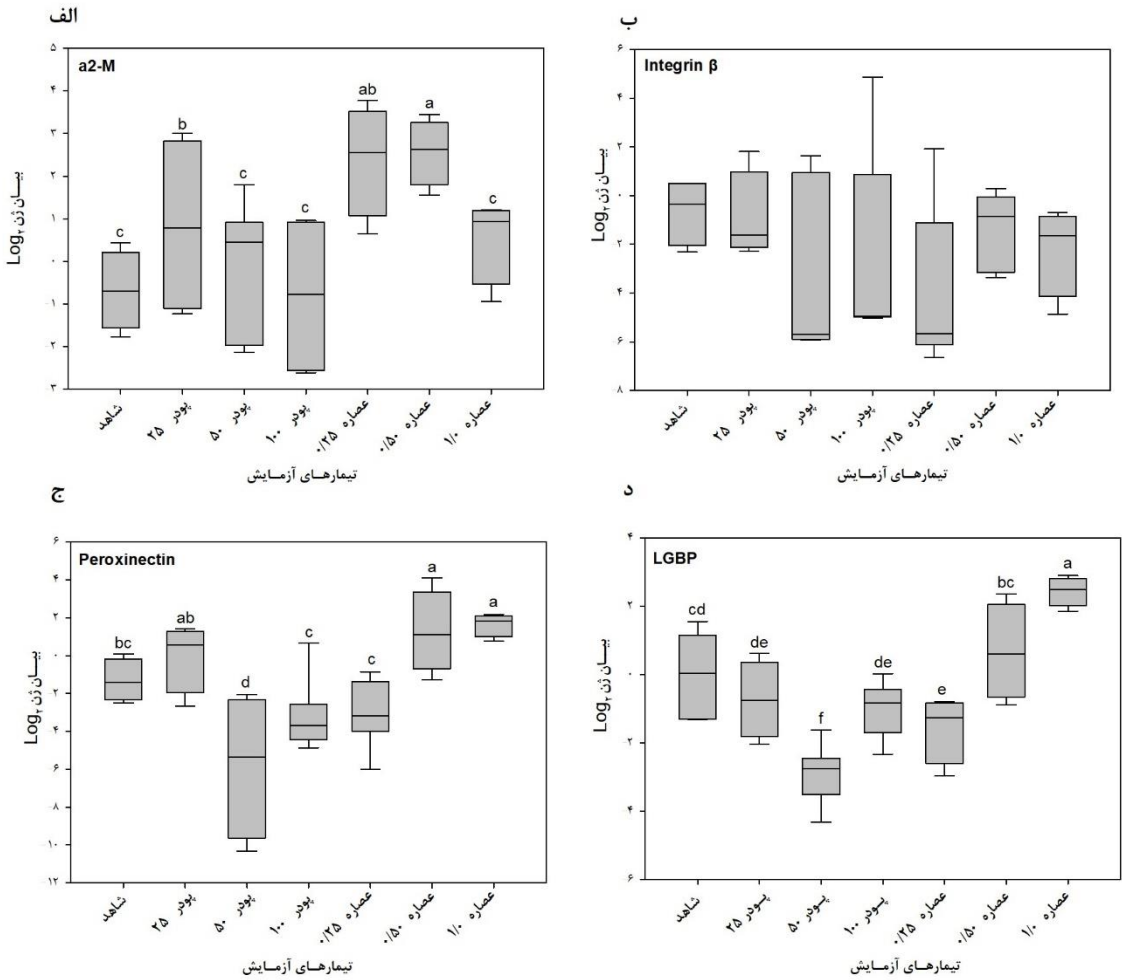
برای بررسی نرمال بودن داده‌های بیان ژن از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد و پس از آن، برای بررسی همگنی واریانس ها از آزمون لون استفاده شد. سپس از آزمون واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) و سپس تست Tukey در سطح اعتماد ۹۵٪ برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های نسبی بیان ژن استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS (Version 24) برای آزمون آماری استفاده شد و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندرد (S.E.) بیان شدند.

جدول ۲ توالی پرایمرهای ژن‌های مورد بررسی

ژن	درازای رشته (bp)	کد دسترسی NCBI	Annealing (ºC)	توالی
Integrin ß (Lin et al., 2012a)	۱۸۴	GQ889365.1	۵۸	F TTGGGCATCGTGTTCGGACTC R TGAAGGTGTTGGTCGCAGGTC
$Peroxinectin\ (PX)$ (Liu et al., 2004)	۱۴۷	KC708021.1	۶۰	F ATCCAGCAGCCAGGTATG R CAGACTCATCAGATCCATTCC
$(\alpha_2 - M)$ (Lin et al., 2012b)	۲۰۴	DQ988330.2	۵۸	F GCACGTAATCAAGATCCG R CCCATCTCATTAGCACAAAC
$LGBP$ (Cheng et al., 2005)	۱۱۵	KF911077.1	۵۸	R GTGGAAATCATCGGCGAAGGAG F CGGCAACCAGTACGGAGGAAC
$b - actin$ (Wang et al., 2007)	۱۴۲	AF300705.2	۶۰	F CCACGAGACCACCTACAAC R AGCGAGGGCAGTGATTTC

نتایج

میزان بیان ژن α2M در تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود (p<۰/۰۵). میزان بیان این ژن در تیمار عصاره ۰/۲۵ g/kg برگ مورینگا به‌طور معنی‌دار بیش از دیگر تیمارها بود (p<۰/۰۵). در میزان بیان ژن LGBP تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی وجود داشت (p<۰/۰۵). بیشترین مقدار بیان این ژن مربوط به تیمار عصاره ۰/۵ و ۱ g/kg برگ مورینگا مشاهده شد. در میزان بیان ژن PX تفاوت معنی‌دار آماری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شد (p<۰/۰۵). بیشترین میزان بیان این ژن در تیمار عصاره‌های ۰/۵ و ۱ g/kg برگ مورینگا به طور معنی دار بیش از دیگر تیمارها بود (p<۰/۰۵). در میزان بیان ژن integrinß تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه شاهد و دیگر تیمارها مشاهده نشد (p>۰/۰۵). نتایج بیان ژن در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱ بیان ژن‌های PX (الف)، 2Mα (ب)، Integrin ß (ج) و LGBP (د) در هپاتوپانکراس میگوی سفید غربی تغذیه شده با مقادیر مختلف پودر و عصاره برگ مورینگا. حروف غیرمشابه بالای هر ستون نشانه معنی‌دار بودن تفاوت بین هر تیمار است ($p<0.05$).

بحث

در مطالعات تحلیلی انجام شده توسط Falowo و همکاران (۲۰۱۸)، *M. oleifera* را بـه عنوان منبع مهمی از مواد مغذی ضـروری شـناسـایی کرده اند. این گیاه سـرشـار از پروتئین، اسیدهای آمینه ضروری، مواد معدنی و ویتامین ها همچنین مقدار نسبتاً کم مواد ضد تغذیه ای است. در مورد تأثیر گیاه مورینگا در جیره غذایی به عنوان محرک ایمنی *in vitro* و *in vivo* برای میگوی سـفید غربی تحقیقات کافی در دسترس نیست (Abidin et al. 2022). به همین دلیل، تعدادی از ژن‌های بایومارکر ایمنی در میگو در پاسـخ به افزودن پودر و عصـاره مورینگا اولیفرا مطالعه شـدند. نتایج این تحقیق نشـان داد که سـطوح ۲۵ g/kg پودر و ۱و ۰/۵ g/kg عصاره برگ باعث افزایش بیان ژن های LGBP، α2M و PR می‌شـوند که نشـاندهنده تأثیر مثبت مورینگا اولیفرا بر دستگاه ایمنی میگوی سفید غربی است.

ژن α2M یک پروتئین بازدارنده اسـت و مانع از انجام پروفنول اکسیداز شده و اثر بازدارنده دارد (Le Moullac et al. 1997). این پروتئین به میزان فراوان در مهره‌داران و بعضی از بی‌مهرگان وجود دارد. این ژن می تواند با پروتئین‌ها ترکیب شـده و اثر سـمی عوامل بیماری‌زا را خنثی کند. همچنین، نقش حیاتی در دسـتگاه دفاع ذاتی میزبان بازی می‌کند. در این تحقیق، میزان بیان این ژن درتیمار عصـاره

۰/۲۵ و ۰/۵ g/kg و تیمار ۲۵ g/kg پودر برگ مورینگا به طور معنی‌دار بیش از گروه شاهد و دیگر تیمارها بود. بنابراین، می‌توان بیان کرد که افزودن عصاره و پودر برگ مورینگا اولیفرا به جیره میگوی سفید غربی در شرایط عادی پرورش، به صورت مستقیم یا غیر مستقیم، با القای افزایش میزان بیان ژن α2M ، باعث تقویت دستگاه ایمنی ذاتی میگو می‌شود. در تحقیقات اولیه مشاهده شده است که هموسیانین میگوی سفید غربی (HMC) و α2M، دو تنظیم کننده کلیدی دستگاه فعال کننده پروفنول پراکسیداز در پلاسما هستند که ممکن است با یکدیگر تعامل داشته باشند، این تعامل می تواند در کنترل فعالیت PO نقش داشته باشد (Zhou et al. 2021). مطالعات بیشتر نشان داد که HMC می‌تواند به‌طور مستقیم با گیرنده α2M تعامل داشته باشد. علاوه بر این هر دو ژن HMC و α2M از الگوی بیان مشابهی در عفونت علیه *Vibrio parahaemolyticus* پیروی کردند، که نشان می‌دهد تعامل HMC و α2M ممکن است در پاسخ ایمنی نقش داشته باشد. α2M به عنوان یک بازدارنده پروتئیناز با طیف وسیع، فعالیت PO سرم را در شرایط آزمایشگاهی سرکوب می‌کند، در حالی که هموسیانین می‌تواند تا حدی این اثر مهاری را بازیابی کند (Zhou et al. 2021). در تحقیقی که توسط Abidin و همکاران (۲۰۲۲) انجام شد، یافته‌های آزمایش *in vivo* عصاره برگ مورینگا اولیفرا به افزایش پاسخ های ایمنی غیراختصاصی، مقاومت علیه *Vibrio alginolyticus* و رشد در میگوی سفید غربی نشان داد که فعالیت THC، PO، PR و بیان ژن مرتبط با ایمنی، از جمله a2-M، پروفنول اکسیداز II، penaeidin2، penaeidin3، فاکتور ضدلیپوپلی ساکارید، کراستین، لیزوزیم، سوپراکسید دیسموتاز، و پروتئین انعقادی، در گروه عصاره ۲/۵ و ۵ گرم در کیلوگرم برگ مورینگا اولیفرا بیش از گروه شاهد و عصاره ۱/۲۵ گرم در کیلوگرم در چندین بازه زمانی بود.

پروتئین اتصال دهنده β-1,3 گلوکان (LGBP) یک ژن کلیدی پاسخ ایمنی در میگو است (Ochoa-Meza et al. 2019). این ژن قادر به تشخیص LPS و BG دیواره یاخته‌ای باکتری‌ها بوده و با آنها ترکیب می‌شود. تشکیل این اتصال باعث فعال شدن دستگاه پروفنول اکسیداز میگو و به دنبال آن PO، فاگوسیتوز، انفجار تنفسی و در نهایت دفاع ضداکسایشی می‌شود (Kim et al. 2000). این ژن در هموسیت ها و هپاتوپانکراس میگوی سفید غربی شناسایی شده است (Cheng et al. 2005). در تحقیق حاضر بیشترین مقدار بیان این ژن مربوط به تیمارهای ۰/۵ و ۱ g/kg عصاره برگ مورینگا نسبت به گروه شاهد است. از طرفی، α2M با جلوگیری از پروفنول اکسیداز دقیقاً عکس LGBP عمل می‌کند. این احتمال وجود دارد که در حضور پودر مورینگا در جیره غذایی به عنوان یک ماده آنتی باکتریال قوی در هپاتوپانکراس، میگو را از بروز ژن LGBP در شرایط عادی پرورش بی نیاز می‌کند. همچنین، ثابت شده که در شرایط استرس و بیماری LGBP در میگوی مونودون باعث افزایش میزان پروفنول اکسیداز شده است (Tang et al. 2003). افزایش سطح بیان LGBP در میگوی وانامی با حضور مقدار کم نانوذرات نقره و همچنین در حضور بیش از حد یون آهن نیز مشاهده شده است، وضعیتی که به تکثیر ویروس کمک می کند (Ochoa-Meza et al. 2019). جیره حاوی *Bacillus subtilis* و جلبک *Shewanella* در میگوی سفید غربی در چالش با باکتری *Vibrio parahaemolyticus* سبب تنظیم دستگاه پروفنول اکسیداز و افزایش ژن LGBP در تیمار *Bacillus subtilis* و جلبک *Shewanella* در مقایسه با گروه *Vibrio* شد، که این حالت را می توان با محافظت میگوی *L. vannamei* از عفونت باکتریایی مرتبط دانست (Interaminense et al. 2019). در تحقیق Lee و همکاران (۲۰۲۰) برای ارزیابی بیان ژن موجود در هموسیت‌ها، میزان بیان ژن‌های LGBP، پروفنول اکسیداز II و فاکتور آنتی لیپوپلی ساکارید و همچنین ژن‌های مرتبط با مسیر سیگنال ایمنی ذاتی شبه گیرنده‌های ۱ و ۳ میگو پس از دریافت پکتین پوسته غلاف کاکائو به مدت ۱ روز به طور قابل توجهی افزایش یافت. با وجود این، در مطالعه دیگری، تفاوت معنی داری در بیان ژن LGBP در میگوهای وانامی تغذیه شده با سطوح مختلف پودر هسته خرما و گروه شاهد مشاهده نشد (Akbarzadeh et al. 2019). در تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۹)، میگوی *L. vannamei*

تغذیه شده با ۲ گرم در کیلوگرم جیره حاوی عصاره *Gracilaria tenuistipitata* افزایش بیان ژن های مرتبط با ایمنی را نشان داد و مقاومت میگوهای تیمار شده در مواجهه با *V. harveyi* نیز افزایش یافت. در میگوی سفید غربی القاء شده با *Lactobacillus plantarum* هیچ تفاوت معنی داری در میزان فاگوسیتوز، LGBP یا بیان ژن پروتئین سرین (serine) در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (Chiu et al. 2007). در میگوی سفید غربی، ژن های ایمنی پروفنول اکسیداز و LGBP به میزان زیادی در یاخته های گرانولار بیان شدند، در حالی که LGBP، crustin، لیزوزیم و P-3a در یاخته های سمی گرانولار و ترنس گولوتامیناز در یاخته های هیالین به میزان زیاد بیان شدند (Yang et al. 2015). در تحقیق Vogeleyو همکاران (۲۰۱۹) میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره های حاوی غذای تجاری به اضافه *B. subtilis* و غذای تجاری به اضافه *B. circulans*، فراسنجه‌های رشد و بیان ژن های ایمنی پروفنول اکسیداز، LGBP و HEM به طور قابل توجهی بالاتر بودند. در میگوی سفید غربی که به مدت ۳۰ روز با مکمل حاوی پودر و عصاره *Eleutherine bulbosa* (Mill) تغذیه شد، تفاوت معنی دار آماری به طور قابل‌توجهی در پاسخ‌های ایمنی تعداد کل هموسیت‌ها (THC)، فعالیت فنل اکسیداز (PO)، انفجارهای تنفسی (RBs)، بیان ژن پروفنول اکسیداز (proPO)، لیپوپلی ساکارید و پروتئین متصل شونده به گلوکان LGBP β-1,3 و تعداد کل باکتری‌ها (TBC) در گروه‌های شاهد مثبت در مقایسه با شاهد منفی مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). در آزمایشی دیگر، پس از چالش میگو با *V. parahaemolyticus*، میزان بیان ژن‌های THC، PO، RBs، proPO، LGBP، و PE افزایش یافت (Munaeni et al. 2020). همچنین، بیان ژن‌های ایمنی proPO، LGBP و PE میگوی سفید غربی دریافت کننده α-فلاندرن در تیمارهای ۸ و ۱۲ $\mu g\ g^{-1}$ به مدت ۷۲ ساعت پس از چالش با *V. alginolyticus* به طور قابل توجهی افزایش یافت (Wu et al. 2019). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، بیان ژن‌های ایمنی لیزوزیم، proPO، LGBP، Penaeidins-3α، کراستین و لکتین نوع C، فعالیت آنزیم‌های ایمنی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و آلکالین فسفاتاز و آنزیم‌های گوارشی تریپسین، لیپاز و α- آمیلاز هپاتوپانکراس میگوهای تغذیه شده با پروبیوتیک HC-2 *Lactobacillus pentosus* نسبت به میگوهای تغذیه شده با رژیم غذایی پایه به طور قابل توجهی بالاتر بود (Du et al. 2019).

بیشترین میزان بیان ژن Peroxinectin در تیمار ۰/۵و ۱ g/kg عصاره و تیمار ۲۵ g/kg پودر برگ مورینگا بود. افزودن مقادیر مختلف پودر و ۰/۲۵ g/kg عصاره برگ مورینگا به جیره میگوی سفید غربی از طریق افزایش بیان ژن پروکسی نکتین ممکن است باعث تقویت دستگاه ایمنی ذاتی میگو شده باشد. در تحقیق Akbarzadeh و همکاران (۲۰۱۹) تفاوت معنی دار آماری در بیان ژن Peroxinectin میگوهای وانامی تغذیه شده با سطوح مختلف پودر هسته خرما و گروه شاهد مشاهده نشد. با وجود این، بیان ژن Peroxinectin در میگوهای وانامی سالم در مقایسه با میگوهای آلوده به ویروس لکه سفید (WSSV) و ویروس نکروز هیپودرمال و خونساز عفونی (IHHNV) بیشتر بود (Yeh et al. 2009). میزان فعالیت فنول اکسیداز، سوپراکسیددیسموتاز، پروفنول اکسیداز و رونویسی ژن Peroxinectin و بازماندگی میگوهای سفید غربی تغذیه شده با *Lactobacillus plantarum* به مقدار $۱۰^{۱۰}$ CFU به مدت ۱۶۸ ساعت پس از مواجهه با *V. alginolyticus* به طور معنی دار افزایش یافت (Chiu et al. 2007). در تحقیق Yang و همکاران (۲۰۱۵) ژن ایمنی Peroxinectin به میزان زیاد در یاخته‌های گرانولار میگوی سفید غربی بیان شد. نتایج یافته‌های آزمایش *in vivo* افزودن عصاره برگ مورینگا به جیره میگوی سفید غربی در مطالعه Abidin و همکاران (۲۰۲۲)، افزایش پاسخ های ایمنی غیراختصاصی و بیان ژن Peroxinectin در تیماره های عصاره ۲/۵ و ۵ گرم در کیلوگرم برگ مورینگا در چندین بازه زمانی را نشان داد.

Integrin ß یکی از ارکان اصلی دستگاه ایمنی ذاتی میگو است. در زمان مواجه شدن یاخته با عفونت‌ها، این ژن به عنوان cell adhesion receptor عمل می‌کند (Zhang et al. 2012). این ژن در میگوی سفید غربی بیان شده

است (Lin et al. 2013). نقش های Integrin ß در میگوها عبارتند از فاگوسیتوز، تشکیل ندول و کپسول (Zhuang et al. 2008)، چسبندگی، انتقال سیگنال‌های انفجار تنفسی، بقا، تکثیریاخته‌ای و دگرانوله شدن هموسیت‌ها (Lin et al. 2013). چسبندگی یاخته‌ای به عنوان خط مقدم دفاع ضد عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند. مهم‌ترین وظیفه integrin ß در میگوها چسبندگی یاخته‌ای است و با چسبلندن میکروب‌ها، آنها را تخریب می‌کند (Okada et al. 2011). در تحقیق حاضر، تفاوت معنی‌دار آماری در میزان بیان ژن Integrin ß بین گروه شاهد و دیگر تیمارها مشاهده نشد. در تحقیقی بیان ژن Integrin ß به طور قابل توجهی پس از ۰/۵ الی ۵ روز گرسنگی در میگوی سفید غربی کاهش یافت، در حالی که بیان ژن های LGBP، PX، proPO I، proPO II، ppA، و α2M پس از ۰/۵ الی ۱ روز افزایش یافتند (Lin et al. 2012).

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از ۰/۵ و ۱ g/kg عصاره و ۲۵ g/kg پودر برگ گیاه *M. oleifera* بر روی دستگاه ایمنی میگوی سفید غربی تأثیر می‌گذارد و می‌توان آن را به‌عنوان یک مکمل مناسب برای بهبود دستگاه ایمنی این گونه مهم میگوی پرورشی در کشور پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه پرسنل مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران جهت همکاری همه جانبه شان در مدت اجرای این تحقیق ابراز می‌نمایند.

تاییدیه‌های اخلاقی

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان در مقاله

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی/حمایت‌ها

موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

Ahmed, H.S., Adel, M., Adel, E. 2014. Incorporation of *Moringa oleifera* leaf in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet and its effect on growth performance and immune status. Journal of Veterinary Science 1: 6-14.

Akbarzadeh, A., Niroomand, M., Abkenar, K.B., Nimvari, M.E., Karimi, K., Ghazvini, A., Jalali, S.A.H. 2019. Effect of dietary date seed meal as an alternative carbohydrate source on immune-related gene expression of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 86: 994-998.

Arshadi, M., Attard, T.M., Lukasik, R.M., Brncic, M., da Costa Lopes, A.M., Finell, M., Geladi, P., Gerschenson, L.N., Gogus, F., Herrero, M. 2016. Pre-

Abidin, Z., Huang, H.T., Liao, Z.H., Chen, B.Y., Wu, Y.S., Lin, Y.J., Nan, F.H. 2022. *Moringa oleifera* Leaves' Extract Enhances Nonspecific Immune Responses, Resistance against *Vibrio alginolyticus*, and Growth in White leg Shrimp (*Penaeus vannamei*). Animals 12: 42.

Adedapo, A.A., Falayi, O.O., Oyagbemi, A.A. 2015. Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology 26: 491-499.

treatment and extraction techniques for recovery of added value compounds from wastes throughout the agri-food chain. Green Chemistry 18: 6160-6204.

Asare, G.A., Gyan, B., Bugyei, K., Adjei, S., Mahama, R., Addo, P., Otu-Nyarko, L., Wiredu, E.K., Nyarko, A. 2012. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. Journal of Ethnopharmacology 139: 265-272.

Cheng, W., Liu, C.H., Tsai, C.H., Chen, J.C. 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 18: 297-310.

Chiu, C.H., Guu, Y.K., Liu, C.H., Pan, T.M., Cheng, W. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. Fish and Shellfish Immunology 23: 364-377.

David-Oku, E., Anani, E.E., Ntaji, O.E., Edide, R.O., Obiajunwa, J.I., Ene-Obong, H. 2018. Growth performance and nutritional impacts of *Moringa oleifera* leaf and shrimp meals supplemented diets on *Clarias gariepinus* (African catfish). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies 6: 23-30.

Du, Y., Wang, M., Wang, B., Liu, M ,.Jiang, K., Wang, L. 2019. The influence of surface proteins on the probiotic effects of *Lactobacillus pentosus* HC-2 in the *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas. Fish and Shellfish Immunology 92: 119-124.

El-Kassas, S., Abdo, S.E., Abosheashaa, W., Mohamed, R., Moustafa, E.M., Helal, M.A., El-Naggar, K. 2020. Growth performance, serum lipid profile, intestinal morphometry, and growth and lipid indicator gene expression analysis of mono-sex Nile tilapia fed *Moringa oleifera* leaf powder. Aquaculture Reports 18, 100422.

Emerenciano, M.G., Rombenso, A.N., Vieira, F.D.N., Martins, M.A., Coman, G.J., Truong, H.H., Noble, T.H., Simon, C.J. 2022. Intensification of penaeid shrimp culture: an applied review of advances in production systems, Nutrition and Breeding. Animals. 12: 236.

Falowo, A.B., Mukumbo, F.E., Idamokoro, E.M., Lorenzo, J.M., Afolayan, A.J., Muchenje, V. 2018. Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. Food Research International. 106: 317-334.

FAO, F. 2012. The state of world fisheries and aquaculture. Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S. 2011. Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. Aquaculture 317: 1-15.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway Jr, C.A., Ezekowitz, R. 1999. Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. Science 284: 1313-1318.

Interaminense, J.A., Vogeley, J.L., Gouveia, C.K., Portela, R.S., Oliveira, J.P., Silva, S.M., Coimbra, M.R.M., Peixoto, S.M., Soares, R.B., Buarque, D.S. 2019. Effects of dietary *Bacillus subtilis* and Shewanella algae in expression profile of immune-related genes from hemolymph of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology 86: 253-259.

Johansson, M. W., Lind, M. I., Holmblad, T., Thornqvist, P.-O. Soderhall, K. 1995. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. Biochemical and Biophysical Research Communications 216: 1079-1087.

Kaleo, I.V., Gao, Q., Liu, B., Sun, C., Zhou, Q., Zhang, H., Shan, F., Xiong, Z., Bo, L., Song, C. 2019. Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on growth performance, physiological and immune response, and related immune gene expression of *Macrobrachium rosenbergii* with *Vibrio anguillarum* and ammonia stress. Fish and Shellfish Immunology 89: 603-613.

Kim, Y.S., Ryu, J.H., Han, S.J., Choi, K.H., Nam, K.B., Jang, I.H., Lemaitre, B., Brey, P.T., Lee, W.J. 2000. Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β-1, 3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. Journal of Biological Chemistry 275: 32721-32727.

Kohshahi, A.J., Sourinejad, I., Sarkheil, M., Johari, S.A. 2019. Dietary cosupplementation with curcumin and different selenium sources (nanoparticulate, organic, and inorganic selenium): influence on growth performance, body composition, immune responses, and glutathione peroxidase activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry 45: 804-793.

Le Moullac, G., Klein, B., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α-amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 208: 107-125.

Lee, C.L., Chang, C.C., Kuo, H.W., Cheng, W. 2020. Pectin of cacao pod husk, an efficient immunostimulant for white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 107: 357-366.

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. 2015. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. International Journal of Molecular Sciences 16: 12791-12835.

Lin, Y.C., Chen, J.C., Li, C.C., Morni, W.Z., Suhaili, A.S., Kuo, Y.H., Chang, Y.H., Chen, L. Tsui, W.C., Chen, Y. Y., Huang, C. L. 2012b. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low salinity exposure. Fish and Shellfish Immunology 33: 324-31.

Lin, Y.C., Chen, J.C., Chen, Y.Y., Liu, C.H., Cheng, W., Hsu, C.H., Tsui, W.C. 2013. Characterization of white shrimp *Litopenaeus vannamei* integrin β and its role in immunomodulation by dsRNA-mediated gene silencing. Developmental and Comparative Immunology 40: 167-179.

Lin, Y.C., Chen, J.C., Man, S.N.C., Morni, W.Z.W., Suhaili, A.S.N., Cheng, S.-Y., Hsu, C.-H. 2012a. Modulation of innate immunity and gene expressions in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term starvation and re-feeding. Results in Immunology 2: 156-148.

Liu, C.H., Cheng, W., Kuo, C.M., Chen, J.C. 2004. Molecular cloning and characterisation of a cell adhesion molecule, peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology 17: 13-26.

Liu, P.C., Lin, P.W., Huang, C.L., Hsu, C.H., Chen, J.C. 2019. Long-term administration of diets containing *Gracilaria tenuistipitata* extract induce the expression of immune-related genes and increase the immune response and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Gene Reports. 15, 100378.

Mariita, R.M., Orodho, J.A., Okemo, P.O., Kirimuhuzya, C., Otieno, J.N., Magadula, J.J. 2011. Methanolic extracts of Aloe secundiflora Engl. inhibits in

vitro growth of tuberculosis and diarrhea-causing bacteria. Pharmacognosy Research 3: 95-99.

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 and Shellfish Immunology 102: 218-227.

Ochoa-Meza, A.R., Álvarez-Sánchez, A.R., Romo-Quiñonez, C.R., Barraza, A., Magallón-Barajas, F.J., Chávez-Sánchez, A., García-Ramos, J.C., Toledano-Magaña, Y., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A. 2019. Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. Fish and Shellfish Immunology 84: 1083-1089.

Okada, Y., Nishikawa, J., Semma, M., Ichikawa, A. 2011. Induction of integrin beta3 in PGE(2)-stimulated adhesion of mastocytoma P-815 cells to the Arg-Gly-Asp-enriched fragment of fibronectin. Biochemical Pharmacology 81: 866-72.

Puycha, K., Yuangsoi, B., Charoenwattanasak, S., Wongmaneeprateep, S., Niamphithak, P., Wiriyapattanasub, P. 2017. Effect of moringa (*Moringa oleifera*) leaf supplementation on growth performance and feed utilization of Bocourti's catfish (*Pangasius bocourti*). Agriculture and Natural Resources 51: 286-291.

Ramachandran, C., Peter, K., Gopalakrishnan, P. 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. Economic Botany 276-283.

Saini, R.K., Sivanesan, I., Keum, Y.-S. 2016. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 Biotecholog 6: 1-14.

Satoh, J., Nishizawa, T., Yoshimizu, M. 2008. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimp orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. Diseases of Aquatic Organisms 82: 89-96.

Shourbela, R., El-Hawarry, W., AM, A.E.L., Abo-Kora, S. 2020. Potentiality of *Moringa oleifera* aqueous extract as a growth modulator and antistress in acute hypoxic Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Iranian Journal of Fisheries Sciences 19: 67-84.

Tang, K.F., Durand, S.V., White, B.L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Lightner, D.V. 2003. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus-a preliminary study. Aquaculture 216: 19-29.

Tekle, E.W., Sahu, N. 2015. Immunomodulatry and growth responses of Nile Tilapia fingerlings to dietary extract of Moringa flower. International Journal of Science and Research 5: 285-296.

Vogeley, J.L., Interaminense, J.A., Buarque, D.S., da Silva, S.M.B.C., Coimbra, M.R.M., Peixoto, S.M., Soares, R.B. 2019. Growth and immune gene expression of *Litopenaeus vannamei* fed *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* supplemented diets and challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture International 27: 1451-1464.

Wang, H.C., Wang, H.C., Kou, G.H., Lo, C.F., Huang, W.P. 2007. Identification of icp11, the most highly expressed gene of shrimp white spot syndrome virus (WSSV). Diseases of Aquatic Organisms 74: 179-189.

Wu, C.C., Lin, C.L., Huang, C.Y., Hsieh, S., Liu, C.H., Hsieh, S.L. 2019. α-Phellandrene enhances the immune response and resistance against *Vibrio*

alginolyticus in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish and Shellfish Immunology 84: 1108-1114.

Yang, C.C., Lu, C.L., Chen, S., Liao, W.L., Chen, S.N. 2015. Immune gene expression for diverse haemocytes derived from pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei.* Fish and Shellfish Immunology 44: 265-271.

Yeh, S.P., Chen, Y.N., Hsieh, S.L., Cheng, W., Liu, C.H. 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. Fish and Shellfish Immunology 26: 582-588.

Zhang, Y., Wang, L., Wang, L., Wu, N., Zhou, Z., Song, L. 2012. An integrin from shrimp *Litopenaeus vannamei* mediated microbial agglutination and cell proliferation. Plos one. 7, e40615.

Zhou, H., Chen, X., Aweya, J.J., Zhao, Y., Yao, D., Zhang, Y. 2021. Interaction of *Penaeus vannamei* hemocyanin and α2-macroglobulin modulates the phenoloxidase activity. Molecular Immunology 138: 181-187.

Zhuang, S., Kelo, L., Nardi, J.B., Kanost, M.R. 2008. Multiple alpha subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the Manduca immune system. Developmental and Comparative Immunology 32: 365-379.