

BOLETÍN

INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ

ISSN 0458-7766

VOLUMEN 34, Número 2



Julio - Diciembre 2019
Callao, Perú



PERÚ

Ministerio
de la Producción

IDENTIFICACIÓN DE GENES INMUNITARIOS EN *Penaeus vannamei* ESTIMULADOS CON *Ulva lactuca* E INFECTADOS CON EL VIRUS DEL SÍNDROME DE LAS MANCHAS BLANCAS

IDENTIFICATION OF IMMUNE GENES IN *Penaeus vannamei* STIMULATED WITH *Ulva lactuca* AND INFECTED WITH WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

Beder Ramírez

Mervin Guevara

Vanessa Montoya

María Serna

RESUMEN

RAMÍREZ B, GUEVARA M, MONTOYA V, SERNA M. 2019. Identificación de genes inmunitarios en *Penaeus vannamei* estimulados con *Ulva lactuca* e infectados con el virus del síndrome de las manchas blancas. *Bol Inst Mar Perú*. 34(2): 319-331.- El Virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB) es uno de los principales patógenos que afecta al cultivo de langostinos. Una estrategia eficaz para reducir el impacto de esta infección es fortalecer la respuesta inmunitaria en langostinos administrando compuestos inmunoestimulantes. En este trabajo se identificó los genes inmunitarios de *Penaeus vannamei* que son estimulados por la inclusión en su dieta de harina de *Ulva lactuca*. Durante 21 días se alimentaron ejemplares de 7,25 ±0,87 g y 11,33 ±0,89 g con alimento balanceado comercial y, suplementado con 8% y 15% de harina de *U. lactuca*. Los langostinos fueron expuestos, mediante *Per os*, al VSMB. Se evaluó la supervivencia por un periodo de 10 días post-infección. Además, en los ejemplares de 11,33 ±89 g se evaluó la expresión de genes inmunitarios a las 0 h y 72 h post-infección mediante PCR en tiempo real. La supervivencia en ambos grupos de edad varió entre 25% y 37,5% en langostinos alimentados con las dietas suplementadas, en cambio el grupo que recibió solo la dieta comercial varió entre 6,25% y 12,5%. Se identificaron 3 genes (Stylicin, Crustin, Mas) cuya expresión disminuye (Tukey, $P < 0,05$) en el grupo de langostinos infectados que fueron alimentados solo con balanceado, mientras que los langostinos alimentados con balanceado y harina de *U. lactuca* se mantienen en forma similar a ejemplares sanos. Estos resultados demuestran que *U. lactuca* presenta compuestos inmunoestimulantes que permiten mejorar la supervivencia de *P. vannamei* frente a la infección por el VSMB.

PALABRAS CLAVE: PCR en tiempo real, expresión de genes, inmunoestimulantes

ABSTRACT

RAMÍREZ B, GUEVARA M, MONTOYA V, SERNA M. 2019. Identification of immune genes in *Penaeus vannamei* stimulated with *Ulva lactuca* and infected with white spot syndrome virus. *Bol Inst Mar Peru*. 34(2): 319-331.- White Spot Syndrome Virus (WSSV) is one of the main pathogens affecting shrimp culture. An effective strategy to reduce the impact of this infection is to strengthen the immune response in shrimp by administering immunostimulant compounds. In this work, the immune genes of *Penaeus vannamei* that are stimulated by the inclusion of *Ulva lactuca* flour. During 21 days, specimens of 7.25 ±0.87 g and 11.33 ±0.89 g were fed with commercially balanced feed and supplemented with 8% and 15% of *U. lactuca* flour. The shrimps were exposed, through *Per os*, to the WSSV. Survival was evaluated for a period of 10 days post-infection. In addition, in specimens of 11.33 ±89 g, the gene expression at 0 h and 72 h post-infection was evaluated by real-time PCR. Survival in both age groups varied between 25% and 37.5% in shrimps fed with supplemented diets, whereas the group that received only the commercial diet varied between 6.25% and 12.5%. Three genes were identified (Stylicin, Crustin, Mas) whose expression decreases (Tukey, $P < 0.05$) in the group of infected shrimps that were fed only with balanced feed, while the shrimps fed with balanced feed and *U. lactuca* flour are maintained in a similar way to healthy specimens. These results demonstrate that *U. lactuca* presents immunostimulant compounds that allow improving the survival of *P. vannamei* against WSSV infection.

KEYWORDS: real-time PCR, gene expression, immunostimulants

1. INTRODUCCIÓN

El langostino blanco (*Penaeus vannamei* Boone, 1931) es una de las principales especies de crustáceos tropicales que se cultiva a nivel mundial. En Perú, su producción ha tenido una tendencia creciente durante los últimos años, pasando de 9.257 toneladas en 2006 a 22.183 toneladas en el año 2015 (PRODUCE, 2016). Este crecimiento se debe, principalmente, a una mayor disposición de áreas para la producción, así como a mejoras tecnológicas adoptadas que permiten incrementar los rendimientos productivos (DÍAZ, 2008).

1. INTRODUCTION

The whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei* Boone, 1931) is one of the main tropical crustacean species cultivated worldwide. In Peru, its production has increased from 9,257 tons in 2006 to 22,183 tons in 2015 (PRODUCE, 2016), mainly due to the greater availability of areas for production, as well as technological improvements that allow increasing productive yields (DÍAZ, 2008).

1 IMARPE, Laboratorio Costero de Tumbes, Zorritos, Perú, bramirez@imarpe.gob.pe

Estas mejoras también se han visto reflejadas en el aspecto sanitario con la reducción de la incidencia de la enfermedad causada por el virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB), que del 2000 al 2001 estuvo a punto de hacer colapsar la industria (QUISPE y BERGER, 2005). Sin embargo, frecuentemente aún aparecen brotes de la enfermedad en algunos campos de cultivo. Si bien, los brotes son controlados por las medidas de bioseguridad implementadas, todavía afectan a la rentabilidad del sistema productivo.

La infección recurrente por el VSMB es favorecida debido a la presencia de múltiples factores que dificultan la erradicación de la enfermedad. Se ha detectado que los langostinos silvestres de áreas naturales adyacentes a los campos de cultivo, son portadores asintomáticos del VSMB (ALFARO, GUEVARA y GONZALES, 2010). Además este virus tiene alta virulencia (CHANG, 1996) y capacidad de infectar un amplio rango de especies que pueden albergar y propagar la enfermedad (DE LA PEÑA *et al.*, 2007). Estos factores en condiciones de estrés ambientales generan el desarrollo de la enfermedad (JHA *et al.*, 2016).

Una estrategia para reducir el impacto de las infecciones con el VSMB que está dando buenos resultados es el potenciamiento de la respuesta inmune en langostinos mediante la inmunoestimulación (CITARASU *et al.*, 2006; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2008; TREJO-FLORES *et al.*, 2016). Así mismo, se ha señalado que una de las fuentes importantes de compuestos inmunoestimulantes son las algas marinas como *Ulva lactuca* que posee polisacáridos con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiviral e inmunomodulador (DECLARADOR *et al.*, 2014; YU-QUING *et al.*, 2016).

Al igual que otros invertebrados, en langostinos el sistema inmune depende exclusivamente de una respuesta innata para defenderse de patógenos invasores (SONG & LI, 2014). Esta respuesta involucra procesos de fagocitosis, nodulación, encapsulación y comunicación a nivel celular (LIU *et al.*, 2005; ZHANG, SHAO & HO, 2006) y procesos de coagulación de hemolinfa, sistema de prophenoloxidasas (proPO), péptidos antimicrobianos, (AMPs), sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), proteínas inhibitoras y factores tipo citoquinas a nivel humoral (LI & XIANG, 2012; QIAO *et al.*, 2015).

La regulación de todo este sistema inmunitario puede ser activado y modulado a nivel genético (WANG *et al.*, 2007) permitiendo su estudio mediante el análisis de la expresión de genes relacionados con

Such improvements also resulted in a decrease in the incidence of disease caused by the White Spot Syndrome Virus (WSSV), which from 2000 to 2001 nearly caused the industry to collapse (QUISPE & BERGER, 2005). On the other hand, outbreaks of the disease still frequently occur in some crop fields. While biosecurity measures are implemented to control outbreaks, they continue to undermine the profitability of the production system.

The presence of multiple factors hindering the eradication of the disease has contributed to recurrent WSSV infection. Wild prawns from natural areas adjacent to crop fields have been found to be asymptomatic carriers of WSSV (ALFARO, GUEVARA, & GONZALES, 2010). In addition, this virus is highly virulent (CHANG, 1996) and capable of infecting a wide range of species that can host and spread the disease (DE LA PEÑA *et al.*, 2007). These factors in conditions of environmental stress generate the development of the disease (JHA *et al.*, 2016).

Boosting the immune response in shrimp through immunostimulation is a promising strategy to reduce the impact of WSSV infections (CITARASU *et al.*, 2006; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2008; TREJO-FLORES *et al.*, 2016). Moreover, marine algae such as *Ulva lactuca*, which has polysaccharides with antioxidant, antimicrobial, antiviral, and immunomodulatory properties, are one of the important sources of immunostimulant compounds (DECLARADOR *et al.*, 2014; YU-QUING *et al.*, 2016).

In shrimps, the immune system depends exclusively on an innate response to defend against invading pathogens; this process is similar to that in other invertebrates (SONG & LI, 2014). This response involves processes of phagocytosis, nodulation, encapsulation, and communication at the cell level (LIU *et al.*, 2005; ZHANG, SHAO & HO, 2006) and processes of hemolymph coagulation, prophenoloxidasase system (proPO), antimicrobial peptides, (AMPs), inducible nitric oxide synthase (iNOS), inhibitory proteins, and cytokine-like factors at the humoral level (LI & XIANG, 2012; QIAO *et al.*, 2015).

Genetic regulation of this entire immune system can be activated and modulated (WANG *et al.*, 2007) thus enabling its study by analyzing the

el sistema inmunológico (Liu *et al.*, 2005). En este sentido la presente investigación buscó identificar los genes inmunitarios que pueden ser estimulados con una dieta que incluye harina de *U. lactuca* en su composición.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras de *Ulva lactuca*

Una muestra de aproximadamente 5 kg de *U. lactuca* fue recolectada en el noroeste de Perú, en la bahía de Puerto Pizarro, Región Tumbes (Fig. 1) durante el periodo de marea seca del mes de mayo. La muestra fue lavada con agua marina del mismo medio y transportada al Laboratorio para su procesamiento.

gene expression related to the immune system (Liu *et al.*, 2005). Therefore, this research was aimed at identifying the immune genes that can be stimulated with a diet that includes *U. lactuca* flour in its composition.

2. MATERIAL AND METHODS

Sampling of *Ulva lactuca*

During the dry tide period (May), a sample of approximately 5 kg of *U. lactuca* was collected in northwestern Peru, in the Puerto Pizarro Bay, Tumbes Region (Fig. 1). The sample was washed with seawater from the same source and transported to the laboratory for processing.



Figura 1.- Ubicación de la zona de recolección de *Ulva lactuca*

Figure 1. Location of the *Ulva lactuca* collection area

Preparación de dietas

Las dietas fueron elaboradas utilizando un alimento balanceado comercial para engorde de langostinos de 35% de proteína (Marca Balnova, Ecuador) suplementado con diferentes concentraciones (0, 5, 8, 10, 12 y 15%) de harina de la macroalga *Ulva lactuca* y ligante Pegabinf-uf (Marca Lander Vaker) en concentraciones de 0% y 0,25%. La macroalga fue secada por 4 días a temperatura ambiente bajo sombra y finalmente secada en una estufa a 80 °C por 24 horas. El alimento balanceado y la macroalga seca fueron molidos, por separado, en forma de harina y mezclados junto con el ligante de acuerdo a la concentración requerida. A la mezcla generada se agregó agua destilada [proporción 8 a 1 de volumen

Diet preparation

The diets were prepared by using a commercial balanced feed for fattening shrimps of 35% protein (Balnova brand, Ecuador) supplemented with different concentrations (0, 5, 8, 10, 12, and 15%) of *Ulva lactuca* flour and Pegabinf-uf binder (Lander Vaker brand) in concentrations of 0% and 0.25%. The macroalgae were dried for 4 days at room temperature under shade and finally dried in an oven at 80 °C for 24 hours. The balanced feed and dried macroalgae were ground separately into flour and mixed together with the binder according to the required concentration. Distilled water was added to the generated mixture [ratio 8 to 1 of water volume

de agua (mL) y peso de alimento (g)] a temperatura de ebullición y se mezcló hasta formar una pasta para luego ser peletizado con una jeringa de 50 mL (Fig. 2). Se evaluó su estabilidad en agua marina hasta por 24 horas y la palatabilidad de todas las dietas elaboradas, en langostinos de 7 ± 1 g. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron las dietas de 0%, 8% y 15% de suplementación de harina de *U. lactuca* para evaluar el efecto estimulador de genes inmunitarios en *P. vannamei*. Estas muestras seleccionadas, así como la harina de macroalga fueron analizadas para determinar su composición proximal y de ácidos grasos, con apoyo del Laboratorio de Análisis Instrumental de la sede central del IMARPE.

Cultivo e infección experimental con el VSMB

Se realizaron 2 ensayos de cultivo e infección experimental con langostinos (*P. vannamei*) sanos de $7,25 \pm 0,87$ g y $11,33 \pm 0,89$ g que fueron negativos por PCR anidada para el VSMB.

(mL) and feed weight (g)] at boiling temperature and mixed to form a paste to be pelletized with a 50 mL syringe (Fig. 2). Its stability in seawater for up to 24 hours and the palatability of all processed diets were evaluated in shrimps of 7 ± 1 g. According to the results obtained, diets of 0%, 8%, and 15% of *U. lactuca* flour supplementation were selected to evaluate the stimulating effect of immune genes in *P. vannamei*. These selected samples, as well as the macroalga flour, were analyzed to determine their proximal and fatty acid composition, with the support of the Instrumental Analysis Laboratory of the IMARPE headquarters.

Culture and experimental infection with WSSV

Two trials of culture and experimental infection with healthy shrimps (*P. vannamei*) of 7.25 ± 0.87 g and 11.33 ± 0.89 g were carried out, their results were negative for PCR nested for WSSV.

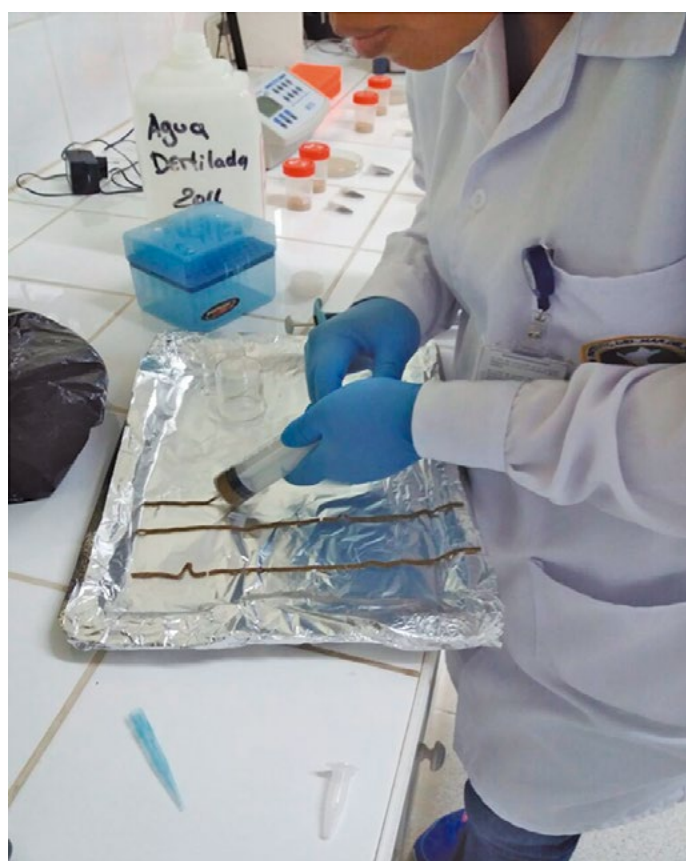


Figura 2.- Peletización de dietas suplementadas con harina de *U. lactuca* para *P. vannamei*

Figure 2. Pelletization of diets supplemented with *U. lactuca* flour for *P. vannamei*

En cada experimento se utilizaron 16 langostinos por tratamiento, los que fueron mantenidos por 21 días en peceras de vidrio (4 langostinos por pecera) con 45 L de agua marina a 33 g/L de salinidad, 25 ± 1 °C de temperatura y aireación constante. Antes de iniciar con la aplicación de los tratamientos los ejemplares fueron aclimatados durante una semana en condiciones de laboratorio.

Durante el periodo de cultivo experimental los langostinos fueron alimentados con las 3 dietas seleccionadas [0% (Tratamiento control), 8% (Tratamiento 1) y 15% (Tratamiento 2)]. Para la infección con el VSMB, en lugar de la dieta establecida se alimentó con 2 g de músculo homogenizado de langostinos positivos para el VSMB (donado por el Centro de Investigación y desarrollo de post-larvas de *Penaeus vannamei*- Marinasol). En los 2 ensayos realizados se evaluó el crecimiento de los langostinos y la supervivencia frente al VSMB. Mientras que los análisis de expresión de genes inmunitarios fue realizado con muestras obtenidas solo del ensayo con langostinos de $11,33 \pm 0,89$ g.

Extracción de ARN

El ARN fue extraído de hemocitos de una muestra de hemolinfa obtenida a las 0 y 72 horas utilizando el kit comercial *QIAmp RNA Mini Kit* (Marca Qiagen). Se recuperó 200 µL de hemolinfa del seno ventral con jeringas estériles de 1 mL provistas con 200 µL de solución anticoagulante Alsever que contiene 27 mM Citrato de Sodio (Marca Merck), 33 mM NaCl (Marca Merck), 115 mM glucosa (Marca Merck), 9 mM EDTA (Marca Applichem), pH 4,6 a 28 °C (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2008). La centrifugación de la hemolinfa fue a 800 g por 10 min a 4 °C (RUBIO-CASTRO *et al.*, 2016) se eliminó el sobrenadante y los hemocitos fueron re-suspendidos en 600 µL de una solución que contiene *buffer RLT Plus* del Kit de extracción de ARN y β -mercaptoetanol (Marca Applichem) al 0,1% para continuar con el proceso de extracción de ARN de acuerdo a las recomendaciones del fabricante del kit. La concentración y pureza del ARN total se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop (Marca, Thermo scientific).

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis del ADNc se realizó una mezcla inicial utilizando 2 µL del ARN extraído (25 ug/µL), 1 µL de dNTPs (10 mM, marca GeneOn), 1 µL de oligo dT₁₅ (0,5 ug/ µL, marca GeneOn), y 10,5 µL

In each experiment, a total of 16 shrimps per treatment were used, which were kept for 21 days in glass aquariums (4 shrimps per aquarium) with 45 L of seawater at 33 g/L of salinity, 25 ± 1 °C of temperature, and constant aeration. The specimens were acclimatized for one week under laboratory conditions before starting with the application of the treatments.

During the experimental culture period, the shrimps were fed with the 3 selected diets [0% (Control treatment), 8% (Treatment 1), and 15% (Treatment 2)]. For infection with WSSV, instead of the established diet, they were fed with 2 g of the homogenized shrimp's muscle positive to WSSV (donated by the *Penaeus vannamei*-Marinasol Post-Larvae Research and Development Center). Shrimp growth and survival against WSSV were evaluated in the 2 trials conducted. While the analysis of immune gene expression was performed with samples obtained only from the trial with shrimps of 11.33 ± 0.89 g.

RNA extraction

RNA was extracted from hemocytes belonging to a hemolymph sample obtained at 0 and 72 hours by using the commercial *QIAmp RNA Mini Kit* (Qiagen brand). A total of 200 µL of ventral sinus hemolymph was recovered with sterile 1 mL syringes provided with 200 µL of Alsever anticoagulant solution containing 27 mM Sodium Citrate (Merck brand), 33 mM NaCl (Merck brand), 115 mM glucose (Merck brand), 9 mM EDTA (Applichem brand), pH 4.6 at 28 °C (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2008). The hemolymph centrifugation was at 800 g for 10 min at 4 °C (RUBIO-CASTRO *et al.*, 2016) the supernatant was removed and the hemocytes were re-suspended in 600 µL of a solution containing RLT Plus buffer from the RNA and β -mercaptoethanol extraction kit (Applichem brand) at 0.1% to continue the RNA extraction process according to the kit manufacturer's recommendations. The concentration and purity of total RNA were determined by measuring absorbance at 260/280 nm in a Nanodrop spectrophotometer (Thermo scientific brand).

Complementary DNA Synthesis (cDNA)

For cDNA synthesis, an initial mixture was made using 2 µL of extracted RNA (25 ug/µL), 1 µL of dNTPs (10 mM, GeneOn brand), 1 µL of dT15 oligo (0.5 ug/ µL, GeneOn brand), and 10.5 µL of

de agua libre de nucleasa tratada con DEPC (Marca Ambion) y se incubó a 70 °C por 5 minutos. Después de este periodo se agregaron los reactivos del kit *RevertAid Reverse transcriptase* (Marca Thermo Scientific) constituidos por 4 µL de solución *buffer* (5X), 0,5 µL de inhibidor de ARNasa *Ribolock* (20 U) y 1 µL de transcriptasa reversa *RevertAid* (200U), se incubó a 42 °C por 60 min y se detuvo la reacción por calentamiento a 70 °C por 10 min. El ADNc sintetizado fue conservado a -20 °C hasta su uso en la PCR.

Análisis de expresión de genes por PCR en tiempo real

Los ensayos fueron desarrollados en el equipo *QuantStudio 5 real time PCR system* (Marca Thermo Fisher Scientific) en placas de 96 pocillos con un volumen de reacción final de 20 µL, conteniendo 10 µL de *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Marca Applied Biosystems), 1 µL de cada iniciador (Sentido y antisentido, a una concentración de 2,5 µM, Marca Biobasic Inc), 7 µL de agua libre de nucleasa (Marca Ambion) y 1 µL de ADNc.

Se realizó un análisis preliminar de la expresión de 25 genes relacionados con el sistema inmunitario de langostinos utilizando iniciadores específicos y normalizados contra la expresión del gen factor de elongación (*efa*) como gen de referencia. Estos análisis fueron realizados utilizando solo una muestra de cada tratamiento.

De este ensayo se seleccionaron 4 genes (*Stylicin*, *Crustin*, *IMD*, *Mas*) que mostraron diferencia del valor de ciclo umbral (C_T) entre las muestras de 0 horas y 72 post-infección y se realizó un segundo ensayo de PCR en tiempo real por triplicado para cada tratamiento. La expresión relativa de cada gen frente al gen de referencia *efa* fue determinado por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK *et al.*, 2001).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de crecimiento y de expresión relativa de los genes *Stylicin*, *Crustin*, *IMD* y *Mas*, fueron procesados con el programa estadístico SPSS 24.0 para determinar diferencias significativas entre cada tratamiento. Los análisis fueron realizados aplicando análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey con $P < 0,05$.

nuclease-free water treated with DEPC (Ambion brand) and incubated at 70 °C for 5 minutes. After this period, the reagents of the *RevertAid Reverse transcriptase kit* (Thermo Scientific brand) were added, consisting of 4 µL of buffer solution (5X), 0.5 µL of *Ribolock* RNAase inhibitor (20 U) and 1 µL of *RevertAid* reverse transcriptase (200U), incubated at 42 °C for 60 min and the reaction was stopped by heating at 70 °C for 10 min. The synthesized cDNA was stored at -20 °C until use in PCR.

Real-time PCR gene expression analysis

The trials were developed in the *QuantStudio 5* real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific brand) in 96-well plates with a final reaction volume of 20 µL, containing 10 µL of *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems brand), 1 µL of each initiator (Sense and antisense, at a concentration of 2.5 µM, Biobasic brand Inc), 7 µL of nuclease-free water (Ambion brand) and 1 µL of cDNA.

A preliminary analysis of the expression of 25 genes related to the shrimp immune system was performed by using specific and normalized initiators against the expression of the elongation factor gene (*efa*) as the reference gene. These analyses were performed using only one sample of each treatment.

A total of 4 genes (*Stylicin*, *Crustin*, *IMD*, *Mas*) were selected from this trial and they showed a difference in the cycle threshold value (CT) between the 0-hour and 72-hour post-infection samples, and a second real-time PCR test was performed in triplicate for each treatment. The relative expression of each gene versus the *efa* reference gene was determined by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (LIVAK *et al.*, 2001).

Statistical analysis

The growth and relative expression data of the *Stylicin*, *Crustin*, *IMD*, and *Mas* genes were processed with the SPSS 24.0 statistical software to determine significant differences between each treatment. Analyses were performed using analysis of variance -ANOVA- and the Tukey test ($P < 0.05$).

3. RESULTADOS

Las dietas formuladas que utilizaron 0,25% de ligante tuvieron estabilidad de 100%. En las dietas que no utilizaron ligante, se observó 100% de estabilidad en los tratamientos de 0%, 5% y 8% mientras que los tratamientos de 10%, 12% y 15% presentaron estabilidad aproximada de $85 \pm 5\%$. Los langostinos evaluados tuvieron un comportamiento de respuesta similar frente al alimento balanceado comercial (control) así como a todas las dietas formuladas, no viéndose afectada la palatabilidad del alimento mediante la suplementación con harina de *U. lactuca*.

Los análisis proximales de los insumos y las dietas preparadas mostraron que los componentes nutricionales (lípidos, carbohidratos y proteínas) de la harina de *U. lactuca* así como de las dietas formuladas son inferiores al alimento balanceado (Tabla 1).

El alimento balanceado mostró una composición de hasta 8 ácidos grasos, los que también estuvieron presentes en las dietas formuladas, pero en cantidad ligeramente inferior. De estos 8 ácidos grasos, 4 también estuvieron presentes en la harina de *U. lactuca* (Tabla 2).

3. RESULTS

Formulated diets using 0.25% binder had 100% stability. In the diets that did not use a binder, 100% stability was observed in the 0%, 5%, and 8% treatments while the 10%, 12%, and 15% treatments presented stability of approximately $85 \pm 5\%$. The evaluated shrimps had a similar response behavior to commercial balanced feed (control) as well as to all formulated diets, and the palatability of the feed was not affected by supplementation with *U. lactuca* flour.

Proximal analyses of inputs and prepared diets showed that the nutritional components (lipids, carbohydrates, and proteins) of *U. lactuca* flour, as well as formulated diets, are inferior to balanced feed (Table 1).

The balanced feed showed a composition of up to 8 fatty acids, which were also present in the formulated diets, but in a slightly lower amount. Only 4 of these 8 fatty acids were also present in *U. lactuca* flour (Table 2).

Tabla 1.- Composición proximal de las dietas utilizadas en cada tratamiento

Table 1. Proximal composition of diets used in each treatment

Código de Muestra Sample Code	Humedad Moisture (%)	Lípidos Lipids (%)	Cenizas Ashes (%)	Carbohidratos Carbohydrates (%)	Proteínas Proteins (%)
Ha-U	12,91 ± 0,00	0,84 ± 0,17	31,68 ± 2,03	15,97 ± 1,06	14,65 ± 0,81
AABB	9,86 ± 0,57	5,94 ± 0,19	7,83 ± 0,35	31,1 ± 1,91	27,29 ± 0,31
AABB + 8% Ha-U	10,66 ± 0,73	4,75 ± 0,27	11,70 ± 0,06	27,94 ± 0,85	24,15 ± 1,63
AABB + 15% Ha-U	10,62 ± 0,33	4,35 ± 0,14	11,89 ± 0,18	26,08 ± 1,11	23,99 ± 0,15

Tabla 2.- Composición de ácidos grasos de las dietas utilizadas en cada tratamiento

Table 2. Fatty acid composition of the diets used in each treatment

Ácidos grasos Fatty acids	Ha-U (mg/g)	AABB + 0% Ha-U (mg/g)	AABB + 8% Ha-U (mg/g)	AABB + 15% Ha-U (mg/g)
C 16:0	0,19 ± 0,08	9,44 ± 0,19	8,60 ± 0,53	7,66 ± 0,07
C 16:1n-7	0,03 ± 0,01	1,00 ± 0,00	0,83 ± 0,09	0,76 ± 0,02
C 18:0	ND	2,37 ± 0,03	2,09 ± 0,10	1,83 ± 0,04
C 18:1n-7	0,06 ± 0,02	0,78 ± 0,00	0,68 ± 0,06	0,62 ± 0,01
C 18:1n-9	0,02 ± 0,02	9,82 ± 0,04	7,91 ± 0,69	7,10 ± 0,04
C 18:2n-6	ND	17,59 ± 0,08	11,51 ± 1,87	10,62 ± 0,14
C 18:3n-3	ND	1,76 ± 0,01	1,05 ± 0,20	0,98 ± 0,02
C 22:6n-3 (DHA)	ND	1,01 ± 0,02	0,48 ± 0,11	0,45 ± 0,00

El cultivo experimental en ambos ensayos (langostinos de 7,25 y 11,33 gramos) mostró que el crecimiento es mayor con la dieta elaborada solo con alimento balanceado (0% de harina de *U. lactuca*), disminuyendo con el aumento de porcentaje de suplementación con harina de *U. lactuca* (Tabla 3).

En cambio el factor de conversión alimenticio (FCA) es menor en el grupo de langostinos alimentados con la dieta elaborada solo con alimento balanceado (0% de harina de *U. lactuca*) y es mayor en la medida que aumenta el porcentaje de suplementación con harina de *U. lactuca* (Tabla 3).

The experimental culture in both trials (shrimps of 7.25 and 11.33 grams) showed that the growth is greater with the diet elaborated only with balanced feed (0% of *U. lactuca* flour), decreasing with the increase in the percentage of supplementation with *U. lactuca* flour (Table 3).

On the other hand, the feed conversion factor (FCF) is lower in shrimps fed with the diet elaborated only with balanced feed (0% of *U. lactuca* flour) and is higher as the percentage of supplementation with *U. lactuca* flour increases (Table 3).

Tabla 3.- Crecimiento y FCA de *P. vannamei* de 21 días de cultivo experimental con las dietas elaboradas
 Table 3. Growth and FCF of *P. vannamei* after 21 days of experimental culture with processed diets

Tratamiento Treatment	Langostinos de 7,25 g Shrimps of 7.25 g		Langostinos de 11,33 g Shrimps of 11.33 g	
	Crecimiento Growth (g)	FCA FCF	Crecimiento Growth (g)	FCA FCF
AABB (T0)	2,75 ± 0,50	2,25 ± 0,49	2,50 ± 0,58	2,86 ± 0,67
AABB + 8% Ha-U (T1)	2,50 ± 0,58	2,50 ± 0,56	2,25 ± 0,50	3,20 ± 0,67
AABB + 15% Ha-U (T2)	2,00 ± 0,00	3,00 ± 0,18	1,50 ± 0,58	4,35 ± 1,17

En la prueba de desafío experimental con el VSMB se observó (Fig. 3) que los langostinos de 7,25 y 11,33 gramos presentan mayor supervivencia cuando son alimentados con dietas suplementadas con 8% y 15% de harina de *U. lactuca*.

El análisis mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) de los datos de CT obtenidos por PCR en tiempo real de las muestras antes del desafío con el VSMB (0 h), mostraron que los langostinos alimentados con balanceado suplementado con 15% de harina de *U.*

Greater survival was observed in the experimental challenge test with the WSSV (Fig. 3) when shrimps of 7.25 and 11.33 grams were fed with diets supplemented with 8% and 15% of *U. lactuca* flour.

The analysis by Tukey's test ($P < 0.05$) of the CT data obtained by real-time PCR of the samples before the challenge with the WSSV (0 h), showed that the shrimps fed with balanced supplemented feed with 15% of *U. lactuca* flour presents higher

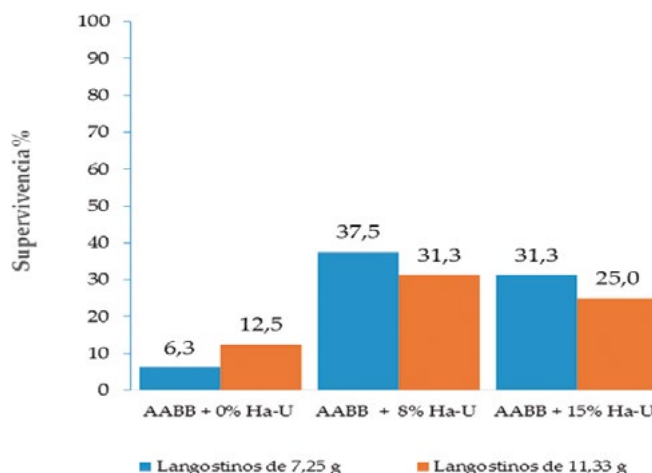


Figura 3.- Supervivencia de *P. vannamei* alimentados con las dietas elaboradas y desafiados con el Virus del síndrome de las manchas blancas

Figure 3. Survival of *P. vannamei* fed on elaborated diets and challenged with the White Spot Syndrome Virus

lactuca presenta mayor nivel de expresión del gen Stylicin en comparación con los otros tratamientos (Fig. 4A).

La expresión del gen Crustin no varió significativamente entre cada tratamiento (Fig. 4B), mientras que el gen IMD redujo su expresión frente al tratamiento con 0% de harina de *U. lactuca* (Fig. 4C). La expresión del gen Mas fue superior en el tratamiento que contenía 8% de harina de *U. lactuca* (Fig. 4D). 72 h post-infección con WSSV, la Stylicin, Crustin y Mas genes expression in shrimps that did not receive *U. lactuca* flour in their diet is lower as compared to those that received 8% and 15% of *U. lactuca* flour (Fig. 4A, B, D) while the IMD gene expression in the 3 treatments had no statistical difference (4C).

level of Stylicin gene expression when compared to the other treatments (Fig. 4A).

The Crustin gene expression did not vary significantly between treatments (Fig. 4B), while the IMD gene reduced its expression with the 0% *U. lactuca* flour treatment (Fig. 4C). The Mas gene expression was higher in the treatment containing 8% of *U. lactuca* flour (Fig. 4D). 72 h post-infection with WSSV, the Stylicin, Crustin, and Mas genes expression in shrimps that did not receive *U. lactuca* flour in their diet is lower as compared to those that received 8% and 15% of *U. lactuca* flour (Fig. 4A, B, D) while the IMD gene expression in the 3 treatments had no statistical difference (4C).

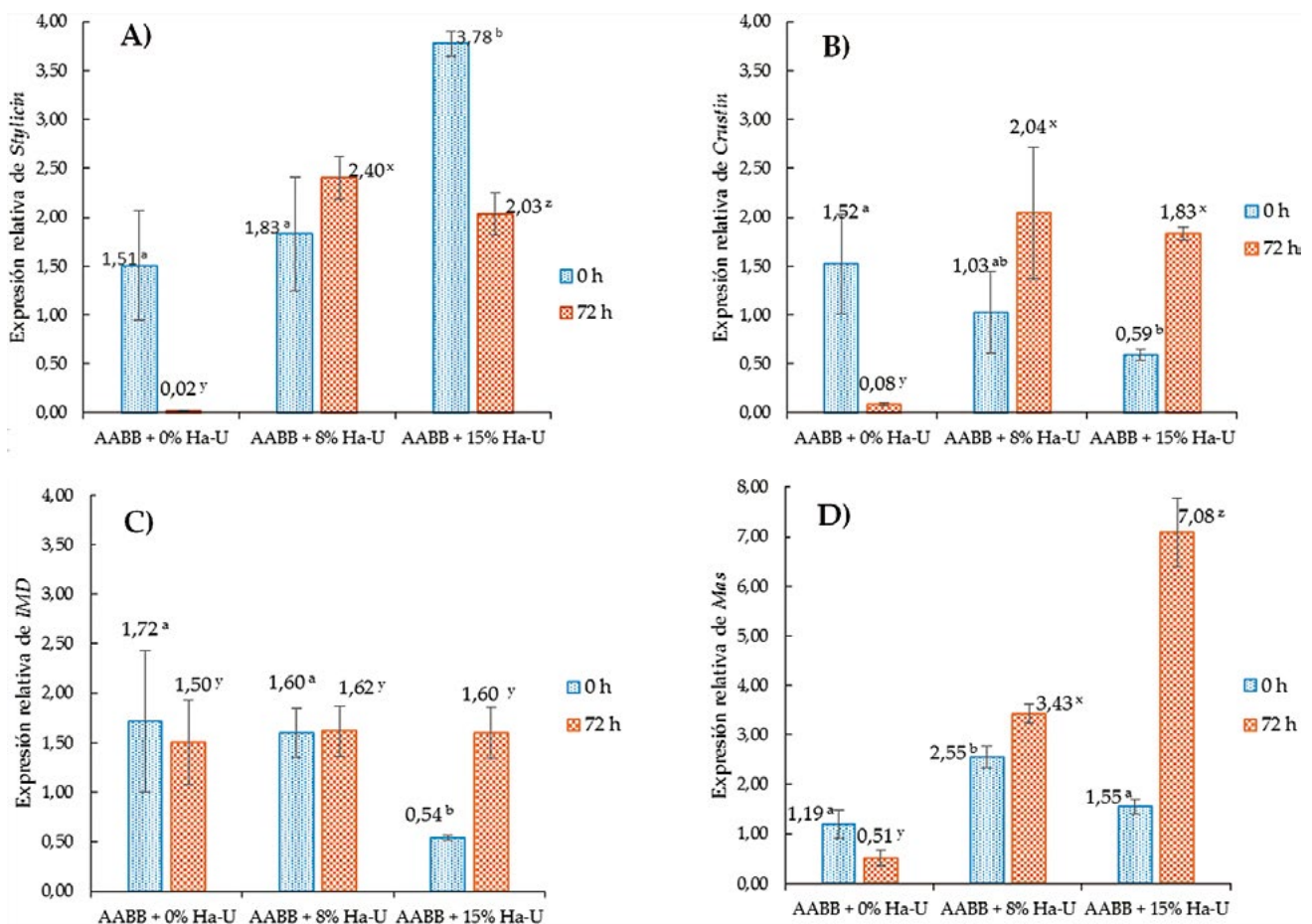


Figura 4.- Expresión relativa de genes inmunitarios en hemocitos de *P. vannamei* alimentados con diferentes dietas y desafiados con el VSMB. A) gen Stylicin. B) gen Crustin. C) gen IMD, D) gen Mas. AABB + 0% Ha-U, AABB + 8% Ha-U y AABB + 15% Ha-U: Tratamientos alimentados con balanceado suplementado con 0%, 8% y 15% de harina de *U. lactuca*. 0 h y 72 h: Muestras analizadas a las 0 horas y 72 horas del desafío con VSMB. Columna en barras muestra el promedio y la desviación estándar (n=3). Letras diferentes para cada serie (0 h y 72 h) indican diferencia significativa ($P < 0,005$) de acuerdo a la prueba de Tukey

Figure 4. Relative expression of immune genes in hemocytes of *P. vannamei* fed with different diets and challenged with WSSV. A) Stylicin gene. B) Crustin gene. C) IMD gene, D) Mas gene. AABB + 0% Ha-U, AABB + 8% Ha-U and AABB + 15% Ha-U: Treatments fed with supplemented balance feed with 0%, 8% and 15% of *U. lactuca* flour. 0 h and 72 h: Samples analyzed at 0 hours and 72 hours after the challenge with WSSV. Bar column shows mean and standard deviation (n = 3). Different letters for each series (0 h and 72 h) indicate significant difference ($P < 0.005$) according to the Tukey test

4. DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han demostrado que la administración de compuestos inmunoestimulantes en *Penaeus vannamei* es una estrategia efectiva para disminuir el impacto de las infecciones causadas por el Virus del síndrome de las manchas blancas (VSMB) (CITARASU *et al.*, 2006; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2008; DECLARADOR *et al.*, 2014; TREJO-FLORES *et al.*, 2016). Esto ha sido corroborado en el presente trabajo utilizando harina de *U. lactuca* como suplemento en la dieta alimenticia de *P. vannamei*.

Con estas dietas se logró mejorar la supervivencia (Fig. 3) y estimulación de la expresión de los genes inmunitarios Stylicin, Crustin y Mas (Fig. 4A, B, C) cuando los langostinos son desafiados experimentalmente con el VSMB. Los productos de los 2 primeros genes mencionados son péptidos antimicrobianos (AMP) ricos en cisteína (GONCALVES *et al.*, 2014)), mientras que el producto del gen Mas es una serina proteasa tipo mascarada (QIAO *et al.*, 2015).

Los AMPs son el mayor componente de la defensa inmune innata y tienen un efecto antimicrobial contra un amplio rango de microorganismos, incluidos bacterias, levaduras, hongos y virus envueltos (ROSA & BARRACO, 2010).

Diferentes investigaciones en *P. vannamei* han reportado que los cambios en la expresión de los AMPs, Stylicin y Crustin varían de acuerdo al tipo de patógeno, GONCALVES *et al.* (2014) encontraron que la expresión de estos AMPs disminuye cuando los langostinos son expuestos a una dosis letal del hongo *Fusarium solani* pero no muestra variación significativa cuando se expone a la dosis letal con el VMB.

Sin embargo, en nuestra investigación la expresión del ARNm de ambos AMPs disminuye notablemente a 72 h post-infección con el VMB en langostinos alimentados solo con balanceado comercial, pero se mantiene estable cuando se agrega harina de *U. lactuca* a la dieta.

La baja expresión de Crustin también ha sido observado por OKAMURA (2007) después de desafiar a *P. vannamei* con lipopolisacáridos (LPS). De igual manera esta disminución también se ha observado con la exposición a *Vibrio alginolyticus* (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2004). La disminución en los niveles de ARNm de Stylicin y Crustin en los langostinos que no recibieron harina de *U. lactuca* podría estar relacionada con el deterioro de la respuesta inmune de estos langostinos (reacciones celulares y humorales) y/o la producción de hemocitos y la maduración por los tejidos hematopoyéticos, tal

4. DISCUSSION

Research has shown that the administration of immunostimulant compounds in *Penaeus vannamei* is an effective strategy to decrease the impact of infections caused by the White Spot Syndrome Virus (WSSV) (CITARASU *et al.*, 2006; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2008; DECLARADOR *et al.*, 2014; TREJO-FLORES *et al.*, 2016). This has been corroborated in the present work by using *U. lactuca* flour as a supplement in the *P. vannamei* diet.

Survival (Fig. 3) and stimulation of the Stylicin, Crustin, and Mas immune genes expression (Fig. 4A, B, C) of shrimps experimentally challenged with WSSV were improved with these diets. The products of the first 2 mentioned genes are antimicrobial peptides (AMP) rich in cysteine (GONCALVES *et al.*, 2014), while the product of the Mas gene is a masked serine protease type (QIAO *et al.*, 2015).

AMPs are the main component of innate immune defense and have an antimicrobial effect against a wide range of microorganisms, including bacteria, yeasts, fungi, and enveloped viruses (ROSA & BARRACO, 2010).

Different researches on *P. vannamei* have reported that changes in the expression of AMPs, Stylicin, and Crustin vary according to the type of pathogen. GONCALVES *et al.* (2014) found that the expression of these AMPs decreases when shrimps are exposed to a lethal dose of the fungus *Fusarium solani* but does not show a significant variation when exposed to lethal dose with WSSV.

Nevertheless, in our investigation, the expression of the mRNA of both AMPs decreases notably to 72 h post-infection with WSSV in shrimps fed only with commercially balanced feed but remains stable when *U. lactuca* flour is added to the diet.

The low expression of Crustin has also been observed by OKAMURA (2007) after challenging *P. vannamei* with lipopolysaccharides (LPS). This decrease has also been observed with exposure to *Vibrio alginolyticus* (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2004). The decrease in Stylicin and Crustin mRNA levels in shrimps that did not receive *U. lactuca* flour could be related to the deterioration of

como lo sugiere GONCALVES *et al.*, (2014) para los AMPs en general, no obstante son favorecidos con la suplementación de *U. lactuca* en su dieta.

Las serinas proteasas tipo mascaradas (Mas) están relacionadas con el control de la melanización mediante la regulación de la cascada de activación de profenol-oxidasas (proPO) (QIAO *et al.*, 2015) y del sistema fenol-oxidasas (PO) (JEARAPHUNT *et al.*, 2015). En esta investigación se determinó que la expresión del gen Mas es mucho mayor en langostinos alimentados con una dieta suplementada con harina de *U. lactuca* en comparación con la dieta comercial (Fig. 4D).

Sin embargo, en langostinos más pequeños (1,5 ±0,2 g) y mantenidos a mayor temperatura (27-29 °C) QIAO *et al.*, (2015) observaron que los niveles de expresión en langostinos inyectados con el VSMB también incrementan su nivel de expresión luego de las 48 y 72 horas a pesar que en su experimento solo alimentaron con un balanceado comercial. El contraste de los resultados entre estos experimentos hace sugerir que la regulación positiva del gen Mas está ordenado por otros factores además de la incorporación de harina de *U. lactuca* en su dieta.

El favorecimiento de la respuesta inmunitaria de *P. vannamei* con la alimentación de dietas suplementadas con *U. lactuca* también se corrobora con el mayor nivel de supervivencia obtenida (de 25% a 37%) en los desafíos experimentales con el VSMB (Fig. 2) hasta 10 días después de la infección. Estos resultados fueron similares al 20% de supervivencia obtenido por DECLARADOR *et al.* (2014) cuando desafiaron con el VMB a langostinos (*P. monodon*) alimentados con una dieta que contenía *Ulvan* purificado (1 g/kg de alimento) en comparación al grupo control que tuvo 100% de mortalidad. Sin embargo, son inferiores al 77% de supervivencia reportado por TAKAHASHI *et al.* (1998) al administrar fucoidan semi-puro de la macroalga *Cladosiphon okamuranus* (60 a 100 mg/kg de alimento) en *Penaeus japonicus*.

En contraste a los resultados de estimulación de genes inmunitarios en *P. vannamei*, los rendimientos de crecimiento son inferiores a lo alcanzado por el tratamiento que utiliza solo balanceado comercial (Tabla 3). Resultados similares fueron reportados por RODRÍGUEZ-GONZALES *et al.* (2014) al utilizar un porcentaje de inclusión de harina de *U. lactuca* de 10% y 15% en dietas para juveniles de *P. vannamei* reduciendo notablemente su crecimiento, mientras que la inclusión de 5% no presentó diferencia significativa con la dieta comercial. Del mismo modo

their immune response (cellular and humoral reactions) and/or the production of hemocytes and maturation by hematopoietic tissues, as suggested by GONCALVES *et al.*, (2014) for AMPs in general, however they are favored with the supplementation of *U. lactuca* in their diet.

Masked protease serins (Mas) are related to the control of melanization by regulating the activation cascade of prophenoloxidase (proPO) (QIAO *et al.*, 2015) and the phenoloxidase system (PO) (JEARAPHUNT *et al.*, 2015). Herein, it was determined that the Mas gene expression is much higher in shrimps fed with a diet supplemented with *U. lactuca* flour in comparison with the commercial diet (Fig. 4D).

Nonetheless, in smaller shrimps (1.5 ±0.2 g) which were kept at a higher temperature (27-29 °C) QIAO *et al.*, (2015) observed that the expression levels in shrimps injected with WSSV also increased their expression level after 48 and 72 hours despite the fact that in their experiment they only were fed with a commercially balanced diet. The contrast of the results between these experiments suggests that the positive regulation of the Mas gene is ordered by other factors besides the incorporation of *U. lactuca* flour in their diet.

The favoring of the immune response of *P. vannamei* fed with diets supplemented with *U. lactuca* is also corroborated with the higher survival level obtained (from 25% to 37%) in the experimental challenges with WSSV (Fig. 2) until 10 days post-infection. These results were similar to the 20% survival obtained by DECLARADOR *et al.* (2014) when they challenged shrimps (*P. monodon*) that were fed with a diet containing purified *Ulvan* (1 g/kg of food) with WSSV versus the control group that had a mortality of 100%. Nevertheless, they are lower than the 77% survival reported by TAKAHASHI *et al.* (1998) when administering semi-pure fucoidan from the macroalgae *Cladosiphon okamuranus* (60 to 100 mg/kg of food) in *Penaeus japonicus*.

Unlike the results of immune gene stimulation in *P. vannamei*, growth yields are lower than those achieved by the treatment using only commercially balanced feed (Table 3). Similar results were reported by RODRÍGUEZ-GONZALES *et al.* (2014) when using an inclusion percentage of *U. lactuca* flour of 10% and 15% in diets for

SERRANO *et al.* (2015) reportan reducción significativa del crecimiento de *P. monodon* al utilizar 15% y 30% de harina de *U. lactuca* en la dieta.

El crecimiento inferior obtenido en los tratamientos que contenían *U. lactuca* se debería a la dilución que experimentan los nutrientes del alimento balanceado al incorporar directamente la harina de *U. lactuca* ya que ésta presenta una composición de nutrientes menor a la encontrada en el alimento balanceado (Tablas 1 y 2). Además, la harina de *U. lactuca* tiene un elevado nivel de cenizas ($31,68\% \pm 2,03$) incrementando su composición en la dietas, de acuerdo a YANG *et al.* (2009) un alto contenido de ceniza disminuye la digestibilidad del alimento.

Los resultados encontrados en este trabajo demuestran que *U. lactuca* presenta compuestos inmunoestimulantes que permiten mejorar la supervivencia de *P. vannamei* frente a la infección por el VSMB así como la expresión de los genes Stylicin, Crustin y Mas. Sin embargo, es necesario desarrollar nuevas estrategias para incorporar los compuestos inmunoestimulante purificados para no incrementar el contenido de cenizas propias de la harina de *U. lactuca* en la Sdieta de los langostinos el cual podría estar interfiriendo en el crecimiento de éstos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección General de Investigaciones Acuícolas del IMARPE por el financiamiento de este proyecto. Así mismo, al Laboratorio de Análisis Instrumental de la sede central del IMARPE por los análisis proximales realizados a las dietas y al Centro de Investigación y desarrollo de post-larvas de *Penaeus vannamei*-Marinasol por la donación de músculo de *P. vannamei* positivo al VSMB.

juveniles' *P. vannamei* significantly reducing their growth, while the inclusion of 5% did not present significant difference with the commercial diet. Similarly, SERRANO *et al.* (2015) report a significant reduction of *P. monodon* growth by using 15% and 30% of *U. lactuca* flour in the diet.

The lower growth obtained in treatments containing *U. lactuca* is attributable to the dilution experienced by the nutrients of the balanced feed by directly incorporating the *U. lactuca* flour as it has a lower nutrient composition than that found in the balanced feed (Tables 1 and 2). Moreover, *U. lactuca* flour has a high ash level ($31.68\% \pm 2.03$) increasing its composition in diets; according to YANG *et al.* (2009), high ash content decreases the digestibility of the feed.

The results found in this work show that *U. lactuca* presents immunostimulant compounds that improve the survival of *P. vannamei* against WSSV infection as well as the Stylicin, Crustin, and Mas gene expression. New strategies need to be developed to incorporate the purified immunostimulant compounds so as not to increase the ash content of *U. lactuca* flour in the shrimp diet, which could be interfering in the growth of the shrimp.

Acknowledgments

The authors thank the IMARPE's Directorate-General of Aquaculture Research for funding this project. Likewise, to the Instrumental Analysis Laboratory at IMARPE headquarters for the proximal analyses performed on diets and to the *Penaeus vannamei*-Marinasol Post-larvae Research and Development Center for the donation of *P. vannamei* muscle positive to WSSV.

REFERENCIAS / REFERENCES

- ALFARO R, GUEVARA M, GONZALES I. 2010. Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan a los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Rev. peru. biol.* 17(3): 359 - 364.
- BALASUBRAMANIAN G, SARATHI M, VENKATESAN C, JOHN THOMOS D, SAHUL-HAMEED A S. 2008. Oral administration of antiviral plant extract of *Cynodon dactylon* on a large scale production against white spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 279: 2 - 5.
- ROSA R, BARRACO M. 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. *ISJ*. 7: 262 - 284.
- CHANG P, LO C, WANG Y, KOU G. 1996. Identification of white spot syndrome associated baculovirus ŽWSBV target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.* 27: 131 - 139.
- CITARASU T, SIVARAM V, GRASIAN I, ROUT N, MURUGAN V. 2006. Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. *Fish & Shellfish Immunology*. 21: 372 - 384.
- DECLARADOR R, SERRANO J, CORRE L. 2014. Ulvan extract acts as immunostimulant against white spot syndrome virus (WSSV) in juvenile black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *AACL Bioflux*. 7(3): 153 - 161.
- DE LA PEÑA L, LAVILLA-PITOGO C, VILLAR C, PANER M, SOMBITO CH, CAPULOS. 2007. Prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.* 77: 175 - 179.
- DÍAZ M. 2008. Modelo biológico, económico y social del cultivo de *Litopenaeus vannamei* (langostino) en el departamento de Tumbes, Perú 1998-2007. Tesis

- para optar el grado de doctor en ciencias biológicas. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. Pp: 11 - 46.
- GONCALVES P, GUERTLER C, BACHERE E, DE SOUZA C, ROSA R, PERAZZOLO L. 2014. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. *Developmental and Comparative Immunology*. 42: 294 - 301.
- JEARAPHUNT M, AMPARYUP P, SANGSURIYA P, CHAROENSAPSRI W, SENAPIN S, TASSANAKAJON A. 2015. Shrimp Serine Proteinase Homologues PmMasSPH-1 and -2 Play a Role in the Activation of the Prophenoloxidase System. *Plos One*. 20 pp.
- JHA R K, BABIKIAN Y H, BABIKIAN H Y, WISOYO S D, ASIH Y, *et al.* 2016. Effectiveness of Natural Herbal Oil Formulation against White Spot Syndrome Virus in *Penaeus vannamei*. *J. Pharmacogn Nat. Prod.* 2: 123.
- LI F, XIANG J. 2012. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunol.* 34(4): 973 - 980.
- LIU H, PENG H, CHENG Y, YUAN H, YANG-YEN H. 2005. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell. Biol.* 25: 3117 - 3126.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*. 25: 402e8.
- MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN (PRODUCE). 2016. Anuario estadístico pesquero y acuícola. Dirección General de políticas y desarrollo pesquero del Ministerio de la Producción. Perú.
- OKAMURA T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 22: 68 - 76.
- QIAO G, XU D, WANG Z, JANG I, ZHITAO Q, ZHANG M, KIM S. 2015. Comparison of immune response of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*. 44: 257 - 264.
- QUISPE M, BERGER C. 2005. Evolución de los cultivos intensivos de camarones peneidos (*Litopenaeus vannamei*) en Perú. *Boletín Nicovita*. 1 - 7 pp.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ H, ORDUÑA-ROJAS J, VILLALOBOS-MEDINA J P, GARCÍA-ULLOA M, POLANCO-TORRES A, LÓPEZ-ÁLVAREZ E, *et al.* 2014. Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Appl. Phycol.* 26: 2453 - 2459.
- RUBIO-CASTRO A, LUNA-GONZÁLES A, ALVÁREZ-RUIZ P, ESCAMILLA-MONTES R, FIERRO-CORONADO J, LÓPEZ-LEÓN P, *et al.* 2016. Survival and immune-related gene expression in *Litopenaeus vannamei* co-infected with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 464: 692 - 698.
- SERRANO A, SANTIZO R, TUMBOKON B. 2015. Potential use of the sea lettuce *Ulva lactuca* replacing soybean meal in the diet of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* juvenile. *Int. J. Bioflux Soc.* 8: 245 - 252.
- SONG Y, LI C. 2014. Shrimp immune system-special focus on penaeidin. *Journal of Marine Science and Technology*. 22(1): 1 - 8.
- TAKAHASHI Y, UEHRA K, WATANABE R, OKUMURA T, YAMASHITA T, OMURA H, *et al.* 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulphated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in kumura shrimp in Japan. En: *Advances in shrimp biotechnology*. Ed. Flegel T. national Center for Genetic Engineering and Biotechnology. 171 - 173 pp.
- TREJO-FLORES V, LUNA-GONZÁLEZ A, ÁLVAREZ-RUIZ P, ESCAMILLA-MONTES R, PERAZA-GÓMEZ V, DIARTE-PLATA G, *et al.* 2016. Protective effect of *Aloe vera* in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 465: 60 - 64.
- VARGAS-ALBORES F, YEPIZ-PLASCENCIA G, JIMÉNEZ-VEGA F, AVILA-VILLA A. 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. *Comp. Biochem. Physiol.* 138: 415 - 22.
- WANG Y C, CHANG P S, CHEN H Y. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defense of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 1161 - 1177.
- YANG Q, ZHOU X, ZHOU Q, TAN B, CHI S, DONG X. 2009. Apparent digestibility of selected feed ingredients for white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquac. Res.* 41: 78 - 86.
- YU-QUING T, MAHMOOD K, SHEHZADI R, FURQAN M. 2016. *Ulva lactuca* and its polysaccharides: Food and biomedical aspect. *Journal of Biology Agriculture and Healthcare*. 6(1): 140 - 151.
- ZHANG Z, SHAO M, KANG H. 2006. Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 21: 159 - 169.