فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال دوم/ شماره چهارم/ پاییز ۹۳/ صفحات ۱۸-۱۱

بررسی ناهنجاری اسکلتی ناشی از کمبود فسفر در لارو ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*, Yakovlev, 1870)

سهراب احمدی‌وند*[۱]، سهیل ایگدری[۲]، شقایق حسن‌پور[۲]

چکیده

بروز ناهنجاری‌های اسکلتی، از جمله مشکلات رایج در لارو ماهیان، ناشی از ناکافی بودن اطلاعات در خصوص ارتباط بین عوامل محیطی، تغذیه‌ای و ژنتیکی می‌باشد. بررسی‌های رادیولوژیکی در مشخص نمودن مراحل اولیه ناهنجاری‌های اسکلتی لارو ماهیان بسیار کارآمد می‌باشد، بطوریکه آنالیز تصاویر X- ray می‌تواند اطلاعات زیادی در خصوص ترکیبات استخوان و همچنین ناهنجاری‌های اسکلتی فراهم نماید. از این‌رو مطالعه حاضر جهت بررسی رادیولوژیکی ناهنجارهای اسکلتی ناشی از فسفر جیره غذایی در لارو ماهی کلمه خزری به اجرا در آمد. در این آزمایش لاروها در ۵ تیمار A، B، C، D و E (با ۳ تکرار) با استفاده از یکی از پنج جیره نیمه خالص، به ترتیب حاوی ۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲و ۱/۶ درصد فسفر، به نسبت ۵ درصد وزن بدن و در ۳ نوبت در روز به مدت ۶۰ روز غذا دهی شدند. در انتهای دوره آزمایش ناهنجاری‌های اسکلتی، تعداد مهره‌ها، طول استاندارد (SL)، طول سر (HL) و شاخص جمجمه (HL/SL) از روی تصاویر رادیوگرافی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج لاروها تغییر معنی‌داری در پارامترهای ریختی مورد سنجش نشان ندادند. کیفوزیس، ستون مهره نامنظم و خم‌شدگی خارهای خونی و عصبی ازجمله ناهنجاری‌های مشاهده شده در لاروها بودند. که بیشترین میزان ناهنجاری‌ها مربوط به لاروهای تغذیه شده با جیره فاقد فسفر یعنی گروه (A) بود. به علاوه کیفوزیس رایج ترین ناهنجاری مشاهده شده در لاروها بود.

کلید واژه: X- ray، ناهنجاری اسکلتی، فسفر، لارو کلمه خزری.

۱- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران s.ahmadivand@ut.ac.ir

۲- گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

ناهنجاری‌های اسکلتی از مشکلات رایج در تفریخگاه‌های ماهیان است که می‌تواند رشد، نمو، بقاء و نهایتاً ارزش بازاری محصول را تحت تأثیر قرار دهد (Divanach et al., 1996; Boglione et al., 2001). بیشتر ناهنجاری‌های اسکلتی که در ماهیان مشاهده می‌شوند، ترکیب پیچیده‌ای از اختلالات استخوانی شامل کیفوزیس، لوردوزیس، امتزاج مهره‌ها و ستون مهره نامنظم می‌باشند. این ناهنجاری‌ها می‌توانند با شرایط محیطی، مواد زنوبیوتیک (Xenobiotic)، ژنتیک، فاکتورهای تغذیه‌ای از جمله کمبود مواد مغذی مانند برخی ویتامین‌ها (D، A، B و C) و مواد معدنی مانند روی، منیزیم، فسفر، کلسیم و سلنیوم، مواد سمی، کیفیت آب، استرس، بیماری‌های عفونی، آلودگی، زخم‌های مکانیکی و دمای بالا در طی انکوباسیون تخم مرتبط باشند (Cahu et al., 2003; Lall et al., 2007).

در بین مواد غذایی که می‌توانند بر روی ناهنجاری اسکلتی اثر بگذارند، فسفر و کلسیم به سبب اینکه مستقیماً در نمو و پایداری سیستم اسکلتی نقش دارند، بسیار مهم تلقی می‌شوند (Divanach et al., 1996; Boglione et al., 2001). علیرغم اینکه ماهیان قادرند فسفر را از آب جذب کنند، به دلیل میزان کم فسفر آب‌های طبیعی و همچنین نرخ پایین بازجذب آن، جیره غذایی منبع اصلی فسفر برای این موجودات می‌باشد ولی کلسیم مورد نیاز از طریق قابلیت جذب آن بطور مستقیم از آب تامین می‌شود و کمبود کلسیم در ماهیان کمتر مشاهده می‌شود (Phillips et al., 1958; Boyd, 1971).

کمبود کلسیم باعث تأخیر در آنتوژنی نمو اسکلتی بدون تاثیر بر میزان سخت‌شدن نهایی استخوان می‌شود و ممکن فقط روی شکل و سایز مهرها اثر بگذارد (Fontagné et al., 2009). در حالی که کمبود فسفر باعث کاهش رشد، کاهش میزان معدنی شدن استخوان‌ها، ناهنجاری های اسکلتی، کاهش خاکستر و افزایش چربی لاشه می‌شود و میزان زیاد آن بقای لاروها را کاهش می‌دهد (Tacon, 1992; Lall, 2002). به دلیل تغییر سریع نیازها در طی مراحل آنتوژنی و متفاوت بودن آنها با دوره جوانی اطلاعات محدودی در خصوص نیاز به مواد مغذی از جمله فسفر و کلسیم در مرحله لاروی وجود دارد. از این رو دانستن اثرات زیستی و عملکرد این ترکیبات ضروری بوده و مد نظر داشتن چنین اثراتی باعث افزایش کیفیت لاروی در تفریخگاه‌ها خواهد شد(Cahu et al., 2003). بنابراین باید به میزان فسفر در جیره‌ها برای توسعه معمول سیستم اسکلتی در مراحل اولیه نمو لارو ماهیان توجه ویژه‌ای نمود.

ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus* Jakowlew, 1870) از جمله ماهیان تجاری مهم دریای خزر است که به دلیل صید بی‌رویه و از بین رفتن بسیاری از مکان‌های تخمریزی طبیعی، میزان صید آن به شدت کاهش یافته و از این‌رو به‌منظور بازسازی ذخایر آن، تکثیر مصنوعی، پرورش لاروها و

Archive of SID

www.SID.ir

رهاسازی آن در حال اجرا می‌باشد (Kiabi et al., 1999). از این‌رو تحقیق حاضر با هدف بررسی ناهنجاری‌های اسکلتی ناشی از کمبود فسفر در دوره تکوین اولیه لارو ماهی کلمه خزری با استفاده از عکسبرداری با اشعه X به اجرا در آمد.

۲- مواد و روش‌ها

جهت انجام این آزمایش لارو ماهی کلمه خزری با میانگین وزنی ۰/۰۱± ۰/۱۰۸ گرم از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان استخوانی سیجوال واقع در استان گلستان تهیه و پس از ۱۰ روز سازگاری با شرایط آزمایشگاه (دما، pH و اکسیژن محلول به ترتیب °C ۲ ±۲۴، ۰/۲± ۷/۸ و۱±۷ میلی گرم در لیتر) به‌طور تصادفی در ۱۵ مخزن ۱۰۰ لیتری (هر مخزن حاوی ۳۰ لارو) توزیع شدند. سپس لاروها در ۵ تیمار A، B، C، D و E (با ۳ تکرار) به ترتیب با استفاده از پنج جیره نیمه خالص (جدول ۱) حاوی ۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲ و ۱/۶ درصد فسفر (نسبت ۱/۱ NaH_2Po_4/KH_2Po_4) به نسبت ۵ درصد وزن بدن در ۳ نوبت در روز به مدت ۶۰ روز غذا دهی شدند. هر دو هفته یکبار جهت تعیین بیومس و غذادهی دقیق ماهیان توزین شدند.

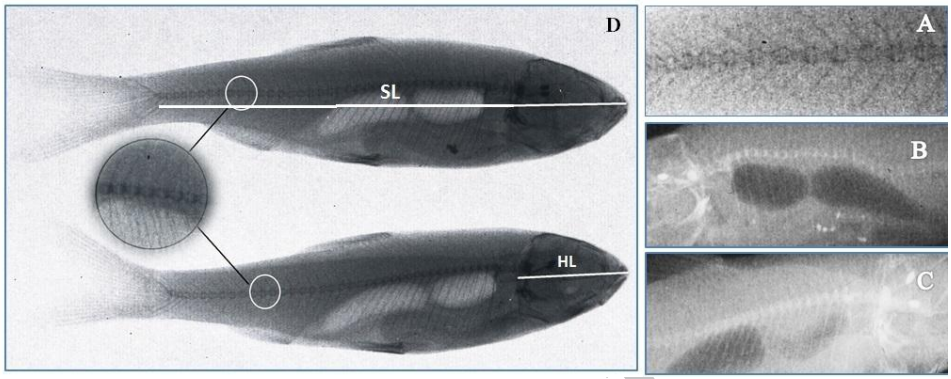
جدول ۱: ترکیبات جیره (برحسب گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک).

جیره / گروه	A	B	C	D	E
کازئین- دکسترین	۸۲/۵	۸۲/۵	۸۲/۵	۸۲/۵	۸۲/۵
مخلوط ویتامین	۵	۵	۵	۵	۵
مخلوط مواد معدنی فاقد فسفر و	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
NaH_2Po_4/KH_2Po_4(۵۰/۵۰)	۰	۱/۶۸	۳/۳۶	۵/۰۴	۶/۷۲
آلفا-سلولز	۷/۵	۵/۸۲	۴/۱۴	۲/۴۶	۰/۷۸
کلسیم کربنات	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
فسفر دردسترس	۰	۰/۴	۰/۸	۱/۲	۱/۶
کلسیم دردسترس	۱	۱	۱	۱	۱

در پایان دوره آزمایش برای بررسی تغییرات اسکلتی از هر تیمار ۳۰ لارو (هر مخزن ۱۰ لارو) به طور تصادفی برداشت و پس از تثبیت در فرمالین بافری ۵ درصد با استفاده از دستگاه ماموگرافی (Payamed, mamo x-Ray, unit 100 kHZ, IRAN) با تنظیمات kv=20 و mAs=10 ا عکس-برداری به‌عمل آمد .سپس عکس‌ها با استفاده از اسکنر (Epson V600) برای آنالیز های بعدی اسکن، به فرمت JPEG تبدیل و سپس با استفاده از نرافزار ImageJ آنالیز شدند. در این مطالعه ناهنجاری‌های اسکلتی، تعداد مهره‌ها، طول استاندارد (SL)، طول سر (HL) و شاخص جمجمه (HL/SL)از روی تصاویر رادیو گرافی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این‌که مقادیر سنجش

Archive of SID
www.SID.ir

شده برحسب پیکسل بود (200 dpi)، براساس فرمول (pixel=(cm*dpi)/25.4) به سانتی‌متر تبدیل شدند. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.



شکل ۱: ساختار اسکلتی نرمال (D) و غیرنرمال (A) خم شدگی خارهای خونی و عصبی، (B) ستون مهره نامنظم و (C) کیفوزیز در لارو ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*) پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره حاوی سطوح مختلف فسفر (۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲ و ۱/۶ درصد).

۳- نتایج

نتایج شاخص‌های ریختی مورد بررسی شامل تعداد مهره‌ها، طول استاندارد، طول سر و شاخص جمجمه لارو ماهی کلمه خزری تغذیه شده با سطوح مختلف فسفر در جدول ۲ ارائه شده است. براساس نتایج، لاروها پس از ۶۰ روز تغذیه با سطوح مختلف فسفر تغییر معنی‌داری در تعداد مهره‌ها نشان ندادند ($P>0.5$). به‌علاوه تغییر معنی‌داری در سایر پارامترهای ریختی اندازه‌گیری شده از جمله طول استاندارد، طول سر و شاخص جمجمه نیز بین تیمارها مشاهده نگردید ($P>0.5$).

نتایج مربوط به ناهنجاری‌های اسکلتی در شکل ۱ نشان داده شده است. براساس نتایج حاصل از آنالیز تصاویر رادیوگرافی (X-ray) در پایان دوره آزمایش (۶۰ روز)، ناهنجاری‌های اسکلتی مشاهده شده شامل کیفوزیس، ستون مهره نامنظم و خم شدگی خارهای خونی و عصبی بودند. فراوانی هریک از ناهنجاری‌ها بر حسب درصد در شکل ۲ ارائه شده است. بیشترین ناهنجاری اسکلتی در لاروهای گروه A که با جیره فاقد فسفر تغذیه شده بودند، مشاهده شد و کیفوزیس رایج‌ترین ناهنجاری اسکلتی بود. همچنین در تیمار D یعنی لاروهای تغذیه شده با ۱/۲ درصد فسفر کمترین میزان ناهنجاری مشاهده گردید.

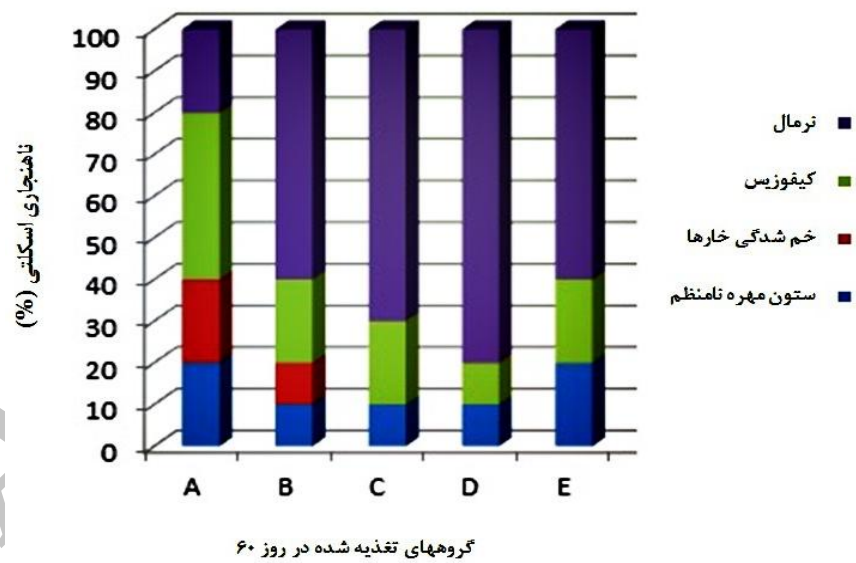
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: برخی پارامترهای ریختی مورد بررسی لارو ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*)، پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره حاوی سطوح مختلف فسفر (۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲ و ۱/۶ درصد به ترتیب تیمارهای گروه‌های A ، B، C، D و E).

A	B	C	D	E
۱/۴ ± ۰/۰۹^{a}	۱/۴۲ ± ۰/۰۹^{a}	۱/۳۶ ±۰/۰۵^{ab}	۱/۵۳ ± ۰/۰۹^{a}	۱/۴۴ ± ۰/۱^{a}
۴/۹۵ ± ۳/۱^{a}	۴/۹۵ ± ۰/۲۱^{a}	۴/۷۷ ± ۰/۱۷ ^{a}	۴/۶۸ ± ۰/۱۹ ^{ab}	۴/۶ ± ۰/۲۷ ^{ab}
۲۸/۷۲ ± ۲/۱۲^{a}	۲۹/۲۷ ± ۱/۷۷ ^{a}	۲۷/۶ ± ۰/۵۱^{a}	۲۹/۵۳ ± ۱/۵۲^{a}	۳۰/۹۶ ± ۱/۴۱^{ab}
۳۶/۶ ± ۱/۸۱ ^{a}	۳۶ ±۱/۴۱ ^{a}	۳۷ ± ۱/۸۷ ^{a}	۳۷ ± ۱/۵۸ ^{a}	۳۷/۲ ± ۱/۹۲^{a}

حروف لاتین غیر مشترک نشان معنی دار بودن می باشد ($P<0.05$).



شکل ۲- میزان (٪) ناهنجاری‌های اسکلتی مشاهده شده (خم‌شدگی خارهای خونی و عصبی، ستون مهره نامنظم و کیفوزیس) در لارو ماهی کلمه خزری (*Rutilus caspicus*)، پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره حاوی سطوح مختلف فسفر (۰، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۲ و ۱/۶ درصد به ترتیب تیمارهای گروههای A ، B، C، D و E).

www.SID.ir

۴- بحث

بروز ناهنجاری در لاروها و حتی ماهیان جوان ناشی از ناکافی بودن اطلاعات در خصوص ارتباط بین فاکتورهای تغذیه‌ای، محیط و ژنتیک می‌باشد. اثر فاکتورهای تغذیه‌ای در انسان و دیگر موجودات خشکی‌زی به‌خوبی مشخص شده است در حالی که در ماهیان هنوز نیاز به مطالعات فراوانی دارد (Beattie and Avenell, 1992; Wallach, 2002). در بین مواد مغذی فسفر و کلسیم به‌خصوص فسفر به دلیل غلظت کم آن در محیط‌های آبی، به دلیل نقش مهمی که در ساختار اسکلتی جانوران آبزی دارند، بیش از دیگر عناصر معدنی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Divanach et al., 1996; Boglione et al., 2001). رشد و نمو اسکلتی به‌صورت قابل توجهی به‌میزان فسفر موجود در جیره غذایی ماهیان به‌ویژه در مراحل اولیه تکوین، بستگی دارند و کمبود و یا زیادی آن می‌تواند موجب بروز تغییرات و ناهنجاری‌هایی در ساختار اسکلتی گردد (Lewis-McCrea and Lall, 2010).

در تحقیق حاضر لاروهای ماهی کلمه خزری تغذیه شده با سطوح مختلف فسفر در پایان دوره آزمایش در هیچ یک از تیمارها تغییر معنی‌داری در فاکتورهای ریختی اندازگیری شده شامل تعداد مهره‌ها، طول استاندارد، طول سر و شاخص جمجمه نشان ندادند. اگرچه لاروهای تغذیه شده با ۰/۸ درصد فسفر (گروه C) اندازه طول سر و شاخص جمجمه کمتر از بقیه تیمارها بود، ولی این تفاوت معنی‌دار نبود. با توجه به این‌که کوچک بودن سر در ماهیان پرورشی مزیت محسوب می‌شود، این نتایج می‌تواند مورد توجه قرار گرفته و مطالعات بیشتری روی این میزان فسفر در جیره انجام گیرد.

ناهنجاری‌های اسکلتی معمولاً ترکیب پیچیده‌ای از اختلالات شامل کیفوزیس، لوردوزیس، اسکلوزیس، کوتاهی دم، مهره‌های به‌هم چسبیده و یا نامنظم، خمیدگی خارهای خونی و عصبی، فک‌های غیر نرمال، کوتاهی سرپوش آبششی و دیگر نواقص مانند کوتاهی و نامناسب بودن باله‌ها می‌باشند (Lall et al., 2007). در بررسی حاضر، آنالیز تصاویر X- ray لاروهای کلمه خزری ناهنجاری‌هایی اسکلتی شامل خمیدگی خارهای خونی و عصبی، کیفوزیس و ستون مهره‌های نامنظم را نشان داد که در تأیید دیگر مطالعات انجام‌شده در این زمینه می‌باشد (Baeverfjord et al., 1998; Vielma and Lall, 1998; Helland et al., 2005; Uyan et al., 2007).

بیشترین میزان ناهنجاری در لاروهای تغذیه شده با جیره فاقد فسفر (گروه A) مشاهده شد و در مقابل کمترین ناهنجاری اسکلتی در گروه D، یعنی ماهیان تغذیه شده با ۱/۲ درصد فسفر مشاهده گردید. با این وجود زیادی فسفر در طولانی مدت می‌تواند عواقب دیگری از جمله تلفات و همچنین صرف هزینه بالاتری را موجب شود. با توجه به این نتایج میزان ۱/۲ درصد فسفر برای لارو ماهی کلمه خزری پیشنهاد می‌شود مگر بنا به دلایل ذکر شده، که در آن صورت ۰/۸ درصد فسفر می‌تواند مناسب‌تر باشد اگرچه نیاز به مطالعات بیشتری است.

Archive of SID

www.SID.ir

بر اساس نتایج کمبود فسفر باعث بروز ناهنجاری‌های اسکلتی در لارو ماهی کلمه خزری می‌شود و بر ضرورت تعیین مناسب فسفر در جیره غذایی این ماهی تأکید می‌نماید. به‌علاوه ناهنجاری اسکلتی ناشی از کمبود مواد مغذی در ماهیان مختلف می‌تواند مدل عالی برای مطالعه عملکرد ژن، تمایز سلولی، ریخت‌زایی، تفاوت‌های گونه‌ای در بیان فنوتیپ مربوط به اختلالات ژنتیکی، ذخیره فسفر و کلسیم و دیگر عناصردر بافت‌های استخوانی و غضروفی در پاسخ به ویتامین‌ها، هورمون‌ها و برهمکنش مواد مغذی را ارائه نماید (Lall et al., 2007). بنابراین بررسی کنونی می‌تواند مدل و زمینه مناسبی برای انجام این تحقیقات در آینده باشد.

فهرست منابع

1. **Baeverfjord G., Asgad T., Shearer K.D. (1998).** Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon *Salmo salar* L., parr and post-smolts. Aquaculture Nutrition, 4: 1–11.
2. **Beattie J.H., Avenell A. (1992).** Trace element nutrition and bone metabolism. Nutrition Research Reviews, 5: 167-188.
3. **Boglione C., Gagliardi F., Scardi M., Cautaudella S. (2001).** Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (Sparus aurata L. 1758). Aquaculture, 192: 1 – 22.
4. **Boyd C.E. (1971).** Phosphorus dymamic in ponds. Proceeding of the Annual Conference of the Southeast Associated, Game and Fish Commission, 25: 418-426.
5. **Cahu C., Zambonino-Infante J.L. (2003).** Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture, 227: 245–258.
6. **Divanach P., Boglione C., Menu M. Kounoundouros G., Kentouri M., Cataudella S. (1996).** Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions. Sea Bass and Sea Bream Culture: Problems and Prospects. Verona, Italy, October 16–18. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, pp. 45– 66.
7. **Fontagné S., Silva N., Bazin D., Ramos A., Aguirre P., Surget A., Abrantes A., Kaushik S.J., Power D.M. (2009)**. Effects of dietary phosphrus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. Aquaculture, 297: 141–150.
8. **Kiabi B.H., Abdoli A., Naderi M. (1999).** Status of the fish fauna in the south Caspian Basin of Iran. Zoology in Middle East, 18: 57-65.
9. **Lall S.P. (2002).** The minerals. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition, 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA, pp. 259–308.

Archive of SID

www.SID.ir

10. **Lall S.P., Lewis-Mccrea L.M. (2007).** Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish. Aquaculture, 267: 3-19.
11. **Lewis-McCrea L.M., Lall S.P. (2010).** Effects of phosphorus and vitamin C deficiency, vitamin A toxicity and lipid peroxidation on skeletal abnormalites in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Journal Applied Ichthyology, 26: 334–343.
12. **Phillips A.M., Podoliak H.A., Brockway D.R., Vaughn R.R. (1958).** The nutrition of trout. Cortland Hatch. Report, No. 26, Fish. Res. Bull. No.21, New York Conservation Department, Albany, NY.
13. **Tacon A.G. (1992).** Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO Fisheries Technical Paper, vol. 330. FAO, Rome, Italy. 75 pp.
14. **Wallach S. (2002).** Disorders of skeleton and kidney stones. In: Bedrdanier, C.D. (Ed.), Handbook of Nutrition and Food. CRC Press, Florida, USA, pp. 1275–1289.

Archive of SID

www.SID.ir