

تأثیر رنگدانه آستاگزانتین بر شاخص‌های رشد، رسیدگی جنسی و بقاء لاروهای ماهی فایتر (*Betta splendens*)

- حمیده زکریائی: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- محمد سوداگر*: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- محمد مازندرانی: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹
- سیدعباس حسینی: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ۴۹۱۳۸-۱۵۷۳۹

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۲

چکیده

در تحقیق حاضر تأثیر رنگدانه آستاگزانتین بر میزان رشد، رسیدگی جنسی مولدین و بقاء لاروها در ماهی فایتر (*Betta splendens*) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ۴۸ قطعه ماهی ۲ ماهه فایتر تهیه گردید. سپس ماهی‌ها (با نسبت جنسی ۱:۱ و متوسط وزن ۰/۲ گرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار به میزان ۰ (گروه ۱ یا شاهد)، ۵۰ (گروه ۲)، ۱۰۰ (گروه ۳) و ۱۵۰ (گروه ۴) میلی‌گرم رنگدانه آستاگزانتین در کیلوگرم جیره به مدت ۲ ماه مورد تغذیه قرار گرفتند. نتایج آزمایش نشان داد در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین، هرچند ضریب تبدیل غذایی در پایین‌ترین میزان خود قرار داشت؛ اما میزان رشد در گروه تیمار و شاهد در سطح $(P > 0/05)$ معنی‌دار نبود. با این وجود رسیدگی جنسی در گروه تیمار زودتر رخ داد $(P < 0/05)$. همچنین در گروه شاهد، رسیدگی جنسی و تخم‌ریزی صورت نگرفت. در حالی که ماهیانی که با جیره غذایی حاوی این رنگدانه تغذیه شدند؛ در بازه زمانی دو ماهه تخم‌ریزی کردند. ماهیان گروه ۴ در سطح $(P < 0/05)$ دارای حداکثر بقاء لاری بودند. در مجموع با توجه به خواص تغذیه‌ای رنگدانه آستاگزانتین، رسیدگی جنسی و بقاء لاروهای حاصله، استفاده از این رنگدانه در رژیم غذایی لاروهای این ماهی با حداقل میزان ۵۰ میلی‌گرم رنگدانه در کیلوگرم غذا توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: رنگدانه آستاگزانتین، رسیدگی جنسی، بقاء لارو، ماهی فایتر (*Betta splendens*)



مقدمه

درصد لاروهای سالم را افزایش داد (Miki و Watanabe، ۱۹۹۵). به‌علاوه، با استفاده از جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین در گاوماهی (*Gubius culusfiarens*) ثابت شد که تعداد تخم در این گونه افزایش یافته و لاروهای تولیدی نسبت به گروه شاهد، از سلامت بیش‌تری برخوردار بودند (Mikulin، ۲۰۰۳). با توجه به این‌که ماهی فایتر (*Betta splendens*) یکی از محبوب‌ترین گونه‌های آب شیرین بوده که تکثیر و پرورش آن در بیش‌تر نقاط جهان با اهداف تجاری و اقتصادی انجام می‌پذیرد، به‌طوری‌که در سال‌های اخیر، تکثیر و پرورش اغلب ماهیان آکواریومی از جمله این ماهی در ایران در حال رشد می‌باشد، پیدا نمودن راه‌کارهایی که به تولید هر چه بهتر و افزایش بازماندگی لاروها کمک کند، در این راستا ارزشمند می‌باشد. با توجه به مطالب بیان شده، یکی از این راهکارها، افزودن رنگدانه آستاگزانتین به جیره غذایی ماهی فایتر می‌باشد. لذا در این بررسی، اثرات جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین در شاخص‌های رشد، رسیدگی جنسی و بازماندگی لاروهای حاصله ماهی فایتر، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه بچه ماهیان و شرایط نگهداری آن‌ها: در این پژوهش، رژیم غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین (Lucanthin (Pink, 10% Astaxanthin, Basf, Germany) و رژیم غذایی فاقد این رنگدانه (گروه شاهد) در ماهی فایتر مورد ارزیابی قرار گرفت. لاروهای ۲ ماهه ماهی فایتر با متوسط وزن ۰/۲ گرم از کارگاه خصوصی ماهیان زینتی واقع در شهرستان گرگان خریداری شد. این لاروها در قالب طرح کاملاً تصادفی و تحت ۴ تیمار رنگدانه آستاگزانتین با سطوح ۰ (گروه شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم رنگدانه به ازای هر کیلوگرم غذا و ۳ تکرار در طی یک دوره ۲ ماهه مورد پرورش قرار گرفتند. در این آزمایش مراحل مولدسازی، تغذیه و کلیه عملیات تکثیرشامل: تخم‌ریزی و جمع‌آوری لاروهای حاصله از اوایل آبان ماه ۱۳۹۲ لغایت ۳۰ آذر ۱۳۹۲ در سالن آبی‌پروری شهید ناصر فضلی دانشکده شیلات در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به انجام رسید. برای انجام این آزمایش لاروهای اولیه که به منظور مولدسازی مورد نگهداری قرار گرفتند؛ پس از تفکیک جنسیت، در ظروف یک‌بار مصرف به ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر و قطر ۱۴ سانتی‌متر و حجم تقریبی ۱/۸ لیتر به مدت یک ماه با غذای بیومار با سایز ۰/۵ میلی‌متر تغذیه شدند. در آغاز چهارمین ماه

کارتونوئیدها مولکول‌های رنگدانه‌ای هستند که به‌وسیله گیاهان، قارچ‌ها و تنها برخی از باکتری‌ها تولید می‌شوند (Demmig-Adams و همکاران، ۱۹۹۶) که در این موجودات مرکز جمع‌آوری نور و انتقال انرژی می‌باشند (تیزکار و همکاران، ۱۳۹۱). این رنگدانه در فتوسنتز بسیار حائز اهمیت بوده و عملکرد آن به‌خوبی شناخته شده است (Kerfeld و همکاران، ۲۰۰۳). با این‌حال، این مولکول‌ها در بدن ماهی‌ها ساخته نمی‌شوند بلکه ممکن است از شکلی به شکل دیگر تبدیل شوند (Matsuno و همکاران، ۲۰۰۱؛ Liaaen-Jensen، ۱۹۹۹). کارتونوئیدها دارای مسؤلیت و عملکردهای اختصاصی حتی در گیاهان می‌باشند (Kerfeld و همکاران، ۲۰۰۳) و به‌دلیل خاصیت آب‌گریز بودن، می‌توانند به‌راحتی با سایر مولکول‌های اصلی بدن جانوران و گیاهان ترکیب و در سراسر بدن پراکنده شوند (تیزکار و همکاران، ۱۳۹۱). عملکرد کارتونوئیدها تابع ساختار مولکولی و تنوع ترکیبات جانبی است که با سایر مولکول‌های بدن جانداران می‌سازند (Demmig-Adams و همکاران، ۱۹۹۶).

مهم‌ترین منابع رنگدانه‌های کارتونوئیدی مصنوعی مورد استفاده در آبی‌پروری، رنگدانه‌های آستاگزانتین و کانتاگزانتین می‌باشند که رنگدانه آستاگزانتین به‌طور طبیعی در مخمر قرمز (*Xanthophyllomyces hodorrhous*) و جلبک هماتوکوکوس (*Haematococcus plavialis*) تولید می‌شود (Bjerkeng، ۲۰۰۸). رنگدانه آستاگزانتین دارای عملکردهای متفاوتی از قبیل: تجمع در بافت خون، ایجاد رنگ در محصول، بهبود در عملکرد زیستی، ثبات در غشای سلولی، بهبود سلامتی و ایمنی از طریق حذف رادیکال‌های آزاد، مقاومت در برابر استرس‌های محیطی مانند: استرس دمایی، اسمزی و کاهش اکسیژن محلول آب می‌باشد (Darachai و همکاران، ۱۹۹۸؛ Latscha، ۱۹۸۹).

یکی از عملکردهای زیستی مهم در مورد آستاگزانتین، نقشی است که مانند یک هورمون باعث باروری تخمک شده که می‌تواند باعث افزایش قابلیت لقاح تخمک (افزایش درصد لقاح) توسط تحریک و جذب اسپرماتوزوآ گردد (Hartman و همکاران، ۱۹۴۷). مطالعاتی که روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انجام شد، نقش این رنگدانه را در افزایش درصد لقاح به‌خوبی تأیید می‌کند (Deufel، ۱۹۷۵). هم‌چنین افزودن آستاگزانتین خالص به جیره غذایی ماهی باس دریایی قرمز، باعث بهبود درصد شناوری و افزایش درصد تفریح تخم‌ها شده و



غذای بیومار انجام شد. غذای آماده شده به دلیل حساسیت بالای رنگدانه آستاگزانتین به دما و نور، درون ظروفی با جداره مشکی و فاقد هرگونه منفذ به منظور جلوگیری از نفوذ نور، در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقدار رنگدانه آستاگزانتین برای هر ماه، طبق جدول زیر محاسبه گردید:

جدول ۱: میزان رنگدانه مصرفی به ازای هر ۵۰ گرم غذا برای جیره غذایی مورد نیاز برای یک ماه

تیمار	میزان غذا (گرم)	رنگدانه مصرفی (میلی‌گرم)
گروه شاهد	۵۰	۰
A۵۰	۵۰	۲/۵
A۱۰۰	۵۰	۵
A۱۵۰	۵۰	۷/۵

ترکیب جیره غذایی بیومار: ترکیبات غذایی تجاری بیومار شامل ۵۵٪ پروتئین، ۲۱٪ کربوهیدرات، ۱۲٪ چربی، ۸٪ خاکستر و ۴٪ رطوبت بود که با توجه به اطلاعات بسته‌های غذایی ثبت گردید.

تغذیه لاروهای تولید شده: لاروهای حاصل از هر سه تیمار (۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم رنگدانه به ازای هر کیلوگرم غذا) ۲ تا ۳ روز اولیه تولد دارای کیسه زرده بوده و از اندوخته غذایی خود استفاده می‌نمایند. در روز سوم و چهارم با اتمام ذخیره غذایی، برای تغذیه آن‌ها از آب سبز (اینفوزوئر) با تراکم ۱۰۰۰۰ عدد در هر سی‌سی استفاده شد. لاروها روزانه ۱ سی‌سی طی دو وعده و به مدت یک هفته با آب سبز تغذیه شدند. لاروها از دهمین روز تولد با ناپلی آرتیمیا (*Arthemia uromiana*) با تراکم ۲۰ عدد در هر سی‌سی، به میزان ۱۰۰۰ سی‌سی در هر روز طی ۵ وعده غذایی تا روز چهاردهم، مورد تغذیه قرار گرفتند.

زیست‌سنجی و بررسی شاخص‌های رشد و بازماندگی لاروهای حاصله: زیست‌سنجی در ابتدا و انتهای دوره انجام گردید. اندازه‌گیری وزن با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم و اندازه‌گیری طول با خط‌کش به دقت ۱ میلی‌متر انجام شد. در پایان دوره شاخص‌های افزایش وزن، درصد افزایش وزن، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت و ضریب تبدیل غذایی به صورت زیر محاسبه شد (Ribeiro و همکاران، ۲۰۰۱):

وزن اولیه (گرم) - وزن ثانویه (گرم) = افزایش وزن بدن (گرم)

وزن اولیه (گرم) / وزن اولیه (گرم) - وزن ثانویه (گرم) × ۱۰۰ = درصد افزایش وزن بدن

طول دوره پرورش / (لگاریتم طبیعی وزن اولیه - لگاریتم طبیعی وزن ثانویه) × ۱۰۰ = ضریب رشد ویژه

طول ۳ (سانتی‌متر) / وزن (گرم) × ۱۰۰ = فاکتور وضعیت (ضریب چاقی)

میزان زی‌توده تولید شده (گرم) / مقدار غذای خورده شده (گرم) = ضریب تبدیل غذایی

زندگی، که از حالت لارو به پیش مولد تغییر یافتند، اندازه غذای بیومار از ۰/۵ به ۰/۸ میلی‌متر افزایش یافت. لاروها روزانه به میزان ۵ درصد وزن بدن ۶ بار (۸ صبح، ۱۰ صبح، ۱۲ ظهر، ۲ بعد از ظهر، ۴ عصر و ۶ غروب) و ماهیان مولد، روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن با جیره غذایی غنی شده با رنگدانه آستاگزانتین طی ۳ وعده غذایی (۸ صبح، ۲ بعد از ظهر و ۶ غروب) تغذیه شدند. جهت تمیز نگه‌داشتن آکواریوم مواد غذایی خورده نشده و مدفوع ماهیان توسط شیلنگ‌های آکواریوم سیفون گردید. عملیات تعویض ۹۰ درصد آب، هر ۳ روز یک‌بار صورت می‌گرفت. ۲۴ عدد آکواریوم با ابعاد ۲۵×۲۵×۳۰ سانتی‌متر برای عملیات تکثیر مولدین تهیه گردید. هر آکواریوم تا ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر از آب تمیز با pH در حد خنثی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد پرگردید.

پس از دو ماه پرورش و بروز اولین نشانه‌های تولیدمثلی مانند ساخت حباب‌های هوا در سطح ظروف یک‌بار مصرف توسط ماهی نر و حالت متورم محوطه شکمی ماهی ماده، ابتدا ماهی‌های نر به آکواریوم‌های تکثیر منتقل شدند. به منظور راحتی ساخت حباب توسط ماهی نر و هم‌چنین مشاهده بهتر و شمارش تعداد لاروها درون هر آکواریوم قطعه‌ای پلاستیک کوچک به طول ۷ و عرض ۳ سانتی‌متر به یکی از دیواره‌های آکواریوم به وسیله چسب متصل گردید. پس از ساخت حباب‌های هوا توسط ماهی نر، ماهی‌های ماده به آکواریوم‌های تکثیر منتقل شدند (مولدین نر و ماده با نسبت جنسی ۱:۱ مورد استفاده قرار گرفتند). پس از طی مراحل جفت‌گیری ماهی ماده از آکواریوم خارج و برای جبران انرژی از دست‌رفته حاصل از عملیات تکثیر، روزانه ۴ درصد وزن بدن، طی ۴ وعده غذایی تغذیه شد. فاصله بین هر جفت‌گیری برای هر جفت از ماهیان ۲ هفته، به‌عنوان مرحله استراحت در نظر گرفته شد. در این آزمایش از ۴۸ عدد ماهی (با نسبت جنسی ۱:۱) استفاده شد.

تهیه جیره غذایی: چهارجیره غذایی شامل مقادیر صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم رنگدانه آستاگزانتین در کیلوگرم غذا تهیه و آماده گردید (Page و Davies، ۲۰۰۳). رنگدانه آستاگزانتین پس از حل شدن در آب ۳۵ درجه به جیره غذایی (بیومار) اضافه گردید. عملیات تهیه غذا با افزایش اندازه دهان ماهی (از ۰/۵ به ۰/۸ میلی‌متر) هر یک ماه و برای ۵۰ گرم



میزان رنگدانه آستاگزانتین در بین سه تیمار تغذیه شده با جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین افزایش یافت اما این تغییرات نسبت به شاهد و یکدیگر معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). هم‌چنین ضریب تبدیل غذایی (FCR) در بین سه تیمار، در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم رنگدانه آستاگزانتین در کیلوگرم غذا، در بالاترین میزان خود قرار داشت، هرچند این مقدار در گروه شاهد نسبت به تیمارهای ۱۰۰ و ۱۵۰ بالاتر بود، اما معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). اگرچه در ظاهر در تیمار تغذیه شده با ۱۰۰ میلی‌گرم رنگدانه میزان CF در کم‌ترین و گروه شاهد در بیش‌ترین مقدار قرار داشت ولی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). میزان رشد در بین سه تیمار حاوی رنگدانه آستاگزانتین، در تیمار ۱ با ۵۰ میلی‌گرم رنگدانه آستاگزانتین کاهش یافت، با این‌حال بین گروه شاهد و سه گروه تغذیه شده با جیره غذایی حاوی رنگدانه تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$) (جدول ۲).

هم‌چنین میزان بازماندگی لاروهای حاصل از تیمارهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین با مقایسه تعداد آن‌ها در انتهای دوره به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS16 از آنالیز واریانس یک‌طرفه و به‌منظور تعیین اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌ها، از آزمون تفکیکی دانکن در سطح احتمال $P < 0.05$ صورت گرفت. هم‌چنین برای تعیین معنی‌داری فاکتورهای رشد بین دو جنس نر و ماده از آزمون Independent t-test استفاده شد. طبق آزمون Independent t-test شاخص‌های رشد (وزن نهایی، نرخ رشد ویژه، شاخص وضعیت و ضریب تبدیل غذایی) دارای اختلاف معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ در بین نرها و ماده‌ها بوده، به‌همین دلیل تمامی این فاکتورها برای دو جنس نر و ماده به‌طور جداگانه‌ای محاسبه گردید.

نتایج

بررسی شاخص‌های رشد در مولدین-شاخص‌های

رشد در جنس نر: نرخ رشد ویژه (SGR) در نرها با افزایش

جدول ۲: مقایسه برخی از شاخص‌های رشد جنس نر در ماهی فایتر با سطوح مختلف رنگدانه آستاگزانتین

شاخص‌های رشد	شاهد	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
افزایش وزن بدن (گرم)	۱/۰۷±۰/۱۱ ^a	۰/۹۴±۰/۲۴ ^a	۱/۰۵±۰/۱۱ ^a	۰/۹۳±۰/۰۸ ^a
شاخص وضعیت (گرم بر سانتی‌متر مکعب)	۱/۵۱±۰/۴۹ ^a	۱/۳۴±۰/۱۵ ^a	۱/۰۶±۰/۴۱ ^a	۱/۲۷±۰/۲۲ ^a
ضریب تبدیل غذایی	۱/۱۴±۰/۱۴ ^a	۱/۳۵±۰/۱۶ ^a	۱/۲۱±۰/۱۲ ^a	۱/۲۷±۰/۱۶ ^a
درصد افزایش وزن بدن (درصد)	۳۷۵/۵۷±۱۴۹/۲۹ ^a	۲۸۶/۷۴±۸۸/۳۳ ^a	۳۴۷/۳۲±۱۱۸/۰۷ ^a	۴۲۵/۸۷±۱۸۳/۰۸ ^a
نرخ رشد ویژه (درصد)	۲/۶۳±۰/۵۱ ^a	۲/۲۹±۰/۴۹ ^a	۲/۵۴±۰/۴۴ ^a	۲/۷۹±۰/۵۶ ^a
میانگین وزن اولیه (گرم)	۰/۳۰۶۷±۰/۰۷۵۷	۰/۳۳۳۳±۰/۰۲۵	۰/۳۲±۰/۰۷	۰/۲۴±۰/۰۷
میانگین وزن ثانویه (گرم)	۱/۳۸±۰/۰۴۵۸	۱/۲۷۶۷±۰/۲۳۲	۱/۳۷۶۸±۰/۰۷۱	۱/۱۷۶۷±۰/۰۴۳

حروف انگلیسی مشابه نمایانگر عدم اختلاف در معنی‌داری می‌باشد.

یافت اما درصد افزایش وزن (WGP) در تیمارها افزایش نداشت حتی در تیمار ۵۰ کم‌تر از شاهد بود در مجموع تأثیری مثبت بر روی رشد مشاهده نشد (جدول ۳). هم‌چنین در شاخص نرخ رشد ویژه (SGR) بین تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و تیمار ۵۰ کم‌تر شده است (جدول ۳).

شاخص‌های رشد در جنس ماده: در گروه‌های تغذیه

شده با رنگدانه افزایش وزن مشاهده نشد حتی تیمار ۵۰ میلی‌گرم وزن کم‌تری داشت در رابطه با شاخص وضعیت (CF) نیز اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف و شاهد مشاهده نشد ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیمارها به‌جز تیمار ۱۰۰ کاهش



جدول ۳: مقایسه برخی از شاخص‌های رشد جنس ماده در ماهی فایتر با سطوح مختلف رنگدانه آستاگزانتین

شاخص‌های رشد	شاهد	A50	A100	A150
افزایش وزن بدن (گرم)	0/24±0/41 ^b	0/17±0/02 ^b	0/34±0/04 ^a	0/38±0/05 ^a
شاخص وضعیت (گرم بر سانتی‌متر مکعب)	1/4±0/59 ^a	1/52±0/46 ^a	2/13±0/49 ^a	1/78±0/63 ^a
ضریب تبدیل غذایی	2/04±0/21 ^a	1/64±0/3 ^b	1/81±0/13 ^{ab}	1/56±0/25 ^b
درصد افزایش وزن بدن (درصد)	141/98±23/95 ^a	66/99±21/43 ^b	174/34±92/23 ^a	162/78±19/46 ^a
نرخ رشد ویژه (درصد)	1/51±0/17 ^b	0/87±0/22 ^a	1/73±0/14 ^b	1/87±0/12 ^b
میانگین وزن اولیه (گرم)	0/173 ± 0/0306	0/27 ± 0/025	0/1967 ± 0/021	0/2367 ± 0/035
میانگین وزن ثانویه (گرم)	0/4167 ± 0/0306	0/4433 ± 0/025	0/5383 ± 0/058	0/62 ± 0/87

حروف انگلیسی متفاوت نمایانگر وجود معنی‌داری می‌باشد.

گروه شاهد در این مدت زمانی تخم‌ریزی مشاهده نگردید، اگر چه از نظر ظاهری علائم رسیدگی جنسی در آن‌ها دیده شد (جدول ۴).

بررسی رسیدگی جنسی در مولدین: تیمارهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین، تیمارهایی که از غلظت آستاگزانتین بیش‌تری برخوردار بودند، به‌مراتب نسبت به تیمارهای با غلظت پایین‌تر دارای لاروهای بیش‌تر و بازماندگی بالاتری بودند و در

جدول ۴: میانگین تعداد لارو در دو تخم‌ریزی متوالی در ماهی فایتر در غلظت‌های متفاوت رنگدانه آستاگزانتین

تعداد لاروها در اولین تخم‌ریزی	شاهد	A50	A100	A150
0	0	34±20/37 ^c	145±29/83 ^c	281±13/41 ^a
تعداد لاروها در دومین تخم‌ریزی	0	37±20/03 ^c	142±26/31 ^b	266±9/19 ^a

تغییر در حروف لاتین نشان دهنده تغییر در معنی‌داری می‌باشد.

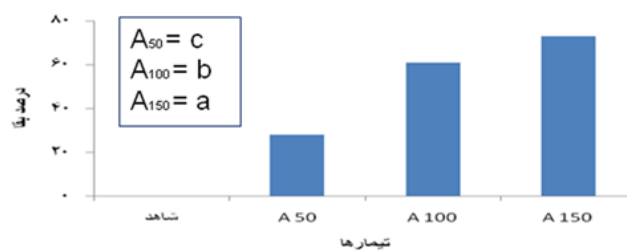
جدول ۵: زمان دو تخم‌ریزی متوالی در ماهی فایتر برحسب روز

زمان اولین تخم‌ریزی	شاهد	A50	A100	A150
مشاهده نگردید	مشاهده نگردید	۱۲۰	۱۲۷	۱۲۰
زمان دومین تخم‌ریزی	مشاهده نگردید	۱۴۴	۱۴۲	۱۳۴

مختلف دیده می‌شود که تیمار ۳ بیش‌ترین میزان بقاء را بین تیمارها دارد (شکل ۱). این تیمار هم‌چنین به‌صورت معنی‌داری کم‌ترین میزان تلفات را در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد.

بقاء در تیمارهای مورد آزمایش: تأثیر رنگدانه آستاگزانتین در جیره غذایی مولیدن بر شاخص‌های بقای لارو ماهی فایتر در دو تفریح متوالی نشان داده می‌شود که اختلاف کاملاً معنی‌داری در شاخص لاروهای بازمانده بین تیمارهای

درصد بقا لاروی



شکل ۱: مقایسه بقاء لاروها در بین سه جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین و گروه شاهد

تغییر در حروف انگلیسی بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد



بحث

(۱۹۸۱)، میگو (Harrison, ۱۹۹۷؛ Dall, ۱۹۹۵؛ Harrison, ۱۹۹۰؛ Quinitio و همکاران، ۱۹۹۰) و لایستر ماده (Merchie و همکاران، ۱۹۹۸) به اثبات رسیده است، مطالعات نشان داد هرچه قدر غلظت آستاگزانتین در جیره مولدین بیشتر باشد تجمع آستاگزانتین در کبد و در نتیجه تخمدان بیشتر می‌شود (Ribeiro و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pangantihon-Ku-hlmann و همکاران، ۱۹۹۸). محققان بسیاری این امر را مورد تأیید قرار داده‌اند و در نتایج خود بیان داشته‌اند که افزایش میزان کارتنوئیدها در طی مراحل رسیدگی جنسی مولدین باعث بهبود فرایند زرده‌سازی و رسیدگی جنسی در مولدین می‌شود (Ahmadi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wyban و همکاران، ۱۹۹۷؛ Watanabe و Miki، ۱۹۹۵؛ Watanabe و همکاران، ۱۹۸۴) و از آنجایی که کبد پایگاه اولیه متابولیسم کارتنوئیدها جهت انتقال به تخم‌هاست (Metusalach و همکاران، ۱۹۹۶؛ Hardy و همکاران، ۱۹۹۰)، در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ثابت شده است که سطوح مختلف آستاگزانتین در طی رسیدگی جنسی باعث افزایش سطح گلیکوژن کبد شده و این امر باعث بهبود ساختار کبد و عملکرد بهتر سایر مواد مغذی در تبدیل به مواد حد واسط می‌شود (Page و همکاران، ۲۰۰۵؛ Swingle و همکاران، ۱۹۸۱). جدول ۴ نشان داد که نتایج حاصل، مطابق با یافته‌های سایر محققان در این زمینه می‌باشد. در بسیاری از ماهیان ثابت شده است که تخم‌هایی که نرخ لقاح بالایی داشته باشند در نهایت دارای نرخ تخم‌گشایی بالاتری بوده و درصد لاروهایی که شروع به تغذیه فعال می‌کنند در آن‌ها بالاتر است (Springate و همکاران، ۱۹۸۴).

هم‌چنین در برخی بررسی‌های نشان داده شده است کارتنوئیدهایی که همراه با وتیلین، وارد تخم ماهیان می‌شوند، علاوه بر بهبود رسیدگی جنسی مولدین باعث افزایش کیفیت لاروها می‌شوند (Harrison, ۱۹۹۰). اگرچه گروهی دیگر معتقدند که جیره‌های حاوی رنگدانه‌های آستاگزانتین و کانتازانتین تأثیری در بهبود نرخ بقاء لاروها نسبت به شاهد ندارند (Choubert و همکاران، ۲۰۰۶)، با این وجود تأثیر مثبت کارتنوئیدها بر میزان رشد و بقاء لاروهای سخت‌پوستان (Linan-Cabello و همکاران، ۲۰۰۴) و هم‌چنین جلوگیری از ناهنجاری ریختی و افزایش نرخ بقاء لاروهای توتیای دریایی *Pseudocentrus depressus* نیز ثابت شده است (Tsushima و Matsuno, ۱۹۹۸). شواهد زیادی مبنی بر ارتباط بین کارتنوئیدهای موجود در تخم و کیفیت لاروها موجود است، چنان‌چه ثابت شد که مقادیر بیشتر کارتنوئیدهای آستاگزانتین در تخم آزادماهیان باعث افزایش

با توجه به این که نقش مثبت کارتنوئیدها در متابولیسم آبزیان شناخته شده است که می‌تواند سبب افزایش استفاده از مواد مغذی شود که نتیجه آن بهبود رشد است (Amar و همکاران، ۲۰۰۱؛ Segner و همکاران، ۱۹۸۹)، به طوری که طبق تحقیقات Petit و همکاران (۱۹۹۷) جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین باعث کاهش چرخه پوست‌اندازی در میگوی کروما (*Penaeus japonicus*) شده که نتیجه آن افزایش رشد بوده است. هم‌چنین ثابت شده که رشد میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی آستاگزانتین نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده است (Thongrod و همکاران، ۱۹۹۵). به‌علاوه Merchie و همکاران (۱۹۹۸) دریافتند که در پست لاروهای میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) با رژیم غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین و ویتامین C در سطوح متفاوت، گروهی که کم‌ترین میزان رنگدانه آستاگزانتین و ویتامین C را دریافت کردند دارای کم‌ترین مقدار رشد و بازماندگی نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشند (Merchie و همکاران، ۱۹۹۸). هم‌چنین گزارش شد کارتنوئیدها باعث بهبود رشد و بازماندگی لاروها در صدف آبالون (*Haliotis discus*) می‌شوند (Tsushima و Matsuno, ۱۹۹۸)، از طرفی دیگر تیزکار و همکاران (۱۳۹۱) با بررسی اثر جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین در ماهی طلایی به این نتیجه رسیدند که در طی مراحل نمونه‌برداری میانگین وزن و طول ماهیان اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان نداد. این نتیجه در مطالعات انجام شده توسط برخی محققان نیز تأیید شده است. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که کارتنوئیدهای موجود در جیره تأثیری در رشد ماهی طلایی نداشته‌اند. در پژوهش حاضر، براساس آمار، رنگدانه بر روی فاکتورهای رشد تأثیر چندانی نداشت و بیش‌ترین اثر را بر روی فاکتورهای جنسی و تخم‌ریزی و بقاء لاروها داشت که با مطالعات سایر محققین بر روی سایر گونه‌های ماهی هم‌خوانی دارد. با توجه به نقش هورمونی رنگدانه آستاگزانتین در فرآیند لقاح از سال‌ها پیش (Hartman و همکاران، ۱۹۴۷)، ثابت شد که جیره‌های غذایی حاوی کارتنوئیدها از جمله این رنگدانه می‌توانند باعث افزایش نرخ لقاح، رسیدگی جنسی و افزایش نرخ بقاء تخم‌ها پس از لقاح، در ماهیان شوند (Huang و همکاران، ۲۰۰۸؛ Mikulin، ۲۰۰۳؛ Georgiev، ۱۹۷۱؛ Deufel، ۱۹۶۵؛ Hubbs و Stavenbagen، ۱۹۵۸؛ Hubbs و Strawn، ۱۹۵۷). در بسیاری از یافته‌های محققان، عملکرد کارتنوئیدها برای رسیدگی جنسی بهتر مولدین ماهی قزل‌آلا (Swingle،



2. **Ahmadi, M.R.; Bazyar, A.; Safi, S.; Ytrestoyl, T. and Bjerkeng, B., 2006.** Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Appl. Ichthyol. Vol. 22, pp: 388.
3. **Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S. and Watanabe, T., 2001.** Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defense mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research. Vol. 32, pp: 162-17.
4. **Benjamin, J. and Del Tito, J.R., 1988.** Role of Beta carotene and Lutein in the Synthesis of Vitamin A in Goldfish. The Prog. Fish Culturist. Vol. 45, pp: 94-97.
5. **Bjerkeng, B., 2008.** Carotenoids in aquaculture: Fish and crustaceans. Birkhäuser, Basel, Switzerland. Vol. 4, pp: 237-250.
6. **Bjerkeng, B. and Berge, G.M., 2000.** Apparent digestibility coefficients and accumulation of astaxanthin E: Z isomers in Atlantic salmon (*Salmosalar L.*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Comp Bioch Physiol. BiochemMolBiol. Vol. 127, pp: 423-432.
7. **Christiansen, R.; Torrissen, O.J.; Struksnaes, G. and Esterman, R., 1995.** Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon in relation to dietary astaxanthin concentration and period. Aquac. Nutr. pp: 84-177.
8. **Choubert, G.; Manuel, M.; Pinto, M. and Morais, R.M., 2006.** Pigmenting efficacy of Astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Effect of dietary Astaxanthin and lipid sources. Aquaculture. pp: 28-30.
9. **Darachai, J.; Piyatiratitivorakul, S.; Kittakoop, P.; Nitithamyong, C. and Menasveta P., 1998.** Effects of astaxanthin on larval growth and survival of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: (T.W Flegeled) Advances in shrimp biotechnology. 5th Asian Fisheries Forum, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand. pp: 117-121.
10. **Dall, W., 1995.** Carotenoid versus retinoids (Vitamin A) as essential growth factors in penaeid prawns (*Penaeus semisulcatus*). Mar. Biol. Vol. 124. pp: 209-213.
11. **Demmig-Adams, B.; Gilmore, AM. and Adams, W.W., 1996.** Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. FASEB J. Vol. 10, pp: 403-412.
12. **Deufel, J., 1975.** Physiologische wirkungen von carotinoiden bei salmoniden. Hydrologie. Vol. 37, pp: 244-248 (in german).
13. **Deufel, J., 1965.** Pigmentierungs versuchemit Canthaxanthin bei Regen bogen forellen. Arch. Fishereiwiss. Vol. 16, pp: 125-132.
14. **Georgiev, G.S., 1971.** Carotenoids and vitamin A content in Salmoirideus eggs and their significance in the initial periods of them embryogenesis. Folia Balcania. Vol. 2, pp: 1-10.
15. **George, S.B.; Lawrence, J.M.; Lawrence, A.L.; Smiley, J. and Plank, L., 2001.** Carotenoids in the adult diet enhance egg and juvenile production in *Lytechinus variegatus*. Aquaculture. Vol. 199, pp: 353-369.
16. **Hardy, R.W.; Torrissen, O.J. and Scott, T.M., 1990.** Absorption and distribution of 14C-labeled canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. Vol. 87, pp: 331-340.
17. **Harrison, K.E., 1990.** The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. J. Shellfish Res. Vol. 9, pp: 1-28.

نرخ بقاء لاروها در قبل و بعد از جذب کیسه زرده می شود (George و همکاران، ۲۰۰۱). به علاوه گزارش شد که مکمل های آستاگزانتین باعث افزایش سلامت و عملکرد سیستم ایمنی لاروهای ماهی قزل آلا می شوند (Pan و همکاران، ۲۰۰۳؛ Christiansen و همکاران، ۱۹۹۵). Bjerkeng و Berge (۲۰۰۰) در یک بررسی در ماهی آزاد نشان دادند که که کارتنوئیدهای موجود در غذا پس از خورده شدن به صورت های مختلف در کبد ذخیره شده و در طی مراحل جنسی به تخمدان و سپس تخمک منتقل می شود. این موضوع در بررسی سایر محققین در میگو نیز به اثبات رسیده است (Linan-Cabello و همکاران، ۲۰۰۴؛ Pan و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین در ماهی طلایی ثابت شده است که بتاکاروتن خورده شده توسط مولدین ماده پس از ذخیره شدن در کبد، در اثر متابولیسم های کبدی، به ویتامین A₂ تبدیل شده و سپس ویتامین A₂ طی مراحل زرده سازی به تخمکها منتقل می شود (Benjamin و Del Tito، ۱۹۸۸) و از آنجایی که ویتامین A و رتینول یکی از اصلی ترین مواد برای دید بهتر لاروهای ماهیان آب شیرین می باشند، در نتیجه باعث افزایش قدرت دید لاروها می شود به طوری که سبب دریافت بهتر غذا از محیط شده و میزان بقاء لاروها در نتیجه خوردن میزان بیش تری از غذا افزایش می یابد (West و همکاران، ۱۹۶۶) که منطبق با نتایج حاصل از تحقیق اخیر می باشد (شکل ۱).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر رژیم های غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین در مقادیر بالای خود باعث افزایش معنی دار در فاکتورهای رشد در ماهی فایتر نشده است اما باعث بهبود فرایند لقاح و تولیدمثل بهتر ماهی فایتر شده و لاروهای حاصله از آن مقاوم تر بوده و نرخ بقاء بالایی را نسبت به تیمارهای دارای غلظت کم تر آستاگزانتین نشان می دهد. در پایان با توجه به یافته های تحقیق، پیشنهاد می گردد در جیره غذایی مولدین، ضمن استفاده از آستاگزانتین سنتتیک از جلبک های حاوی این رنگدانه و تعیین سایر اثرات طبیعی آن در فاکتورهای تولید مثلی استفاده شود.

منابع

۱. تیزکار، ب؛ سوداگر، م؛ بهمنی، م؛ حسینی، س.ع. و چمنی، م، ۱۳۹۱. تاثیر جیره های تک میلی حاوی آستاگزانتین و بتاکاروتن بر شاخص های تولید مثلی ماهی طلایی (*Carassius auratus*) و استرس ناشی از تراکم در مرحله انکوباسیون. محیط زیست جانوری. سال ۴، شماره ۴، صفحات ۱۳۱ تا ۱۴۴.



- A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. *Aquat. Living Resour.* Vol. 11, pp: 403-409.
36. **Pan, C.H.; Chien, Y.H. and Hunter, B., 2003.** Alterations of antioxidant capacity and hepatopancreatic enzymes in *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin and exposed to *Vibrio damsela* challenge. *J. Fish.Soc. Taiwan.* Vol. 30, pp: 279-290.
 37. **Petit, H.; Nègre, S.G.; Castillo, R. and Trilles, J.P., 1997.** The Effects of dietary astaxanthin on growth and moulting cycle of postlarval stage of prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). *Comparative Biochemistry and Physiology.* Vol. 117, pp: 539-544.
 38. **Quinitio, E.T.; Hara, A.; Yamauchi, K. and Fuji, A., 1990.** Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*. *Invertebr.Reprod. Dev.* Vol. 17, pp: 221-227.
 39. **Ribeiro, E.A.; Genofre, G.C. and McNamara, J.C., 2001.** Identification and quantification of carotenoid pigments during the embryonic development of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* Vol. 34.
 40. **Segner, H.; Arend, P.; Poeppinghaussen, K.V. and Schmidt, H., 1989.** The effect of feeding astaxanthin to *Oreochromis niloticus* and *Colisa labiosa* on the histology of the liver. *Aquaculture.* Vol. 79, pp: 381-390.
 41. **Springate J.R.C.; Bromage, N.R.; Elliott, J.A.K. and Hudson, D.L., 1984.** The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilisation and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture.* Vol. 43, pp: 313-322.
 42. **Svensson, P.A.; Pelabon, C.; Blount, J.D.; Surai, P.F. and Amundsen, T., 2006.** Does female nuptial coloration reflect egg carotenoids and clutch quality in the Two-Spotted Goby (*Gobiusculus flavescens*, Gobiidae). *Vol. 20,* pp: 689.
 43. **Swingle, H.S., 1981.** Relationships of pH of pond waters to their suitability for fish culture. *Proc. Pac. Sci.Congr.* Vol. 10, pp: 72-75.
 44. **Tacon, A.G., 1990.** Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. *Feeding Methods.* Agent Laboratories Press, Redmond, Taoka. Vol. 3.
 45. **Thongrod, S.; Tansutapanich, A. and Torrisen, O.J., 1995.** Effect of dietary astaxanthin supplementation on accumulation, survival and growth in postlarvae of *Penaeus monodon* Fabricius. In: (P. Cavens, E. Jaspers & I. Roelantseds.) *Larvi'95 Fish & Shellfish Larviculture Symposium, Special Publication, European Aquaculture Society, Gent, Belgium.* Vol. 24, pp: 251-254.
 46. **Tsushima, M. and Matsuno, T., 1998.** The role of beta-carotene on growth and survival of juvenile Japanese abalone *Haliotis discus*. *Fish.Sci.* Vol. 64, pp: 660-661.
 47. **Watanabe, T.; Ohashi, S.; Itoh, A.; Kitajima, C. and Fujita, S. 1984.** Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red sea bream broodstock and eggs produced. *Bul.Jpn.Soc.Sci.Fish.* Vol. 50, pp: 503-515.
 48. **Watanabe, T. and Miki, W., 1995.** Astaxanthin: an effective dietary component for red seabream broodstock. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice.* INRA, Paris. pp: 27-36.
 49. **West, E.S.; Todd, W.R.; Mason, H.J. and Van Bruggen, J.T., 1966.** Textbook of biochemistry, 4th ed. The Macmillan Co., New York. 1595 p.
 50. **Wyban, J.; Martinez, G. and Sweeney, J., 1997.** Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves naupli quality. *World Aquac.* Vol. 28, pp: 59-62.
 18. **Harrison, K.E., 1997.** Broodstock nutrition and maturation diets. In: *Crustacean Nutrition, Vol. 6.* World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. pp: 390-408.
 19. **Hartman, M.; Medem, F.G.; Kuhn, R. and Bielg, H.J., 1947.** About The Investigations Fertilization substances of Rainbow trout. *Z.Naturforsch.* Vol. 2, pp: 330-343
 20. **Huang, J.H.; Jiang, S.G.; Lin, H.Z.; Zhou, F.L. and Ye, L., 2008.** Effects of dietary highly unsaturated fatty acids and astaxanthin on the fecundity and lipid content of pond-reared *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquac. Res.* Vol. 39, pp: 240-251.
 21. **Hubbs, C. and Stavenbagen, L., 1958.** Effects of maternal carotenoid deficiency on the viability of darter *Osteichthyes* offspring. *Phy.Zool.* Vol. 31, pp: 280-283.
 22. **Hubbs, C. and Strawn, K., 1957.** Survival of F₂ hybrids between fishes of the subfamily Etheostominae. *J. Exp. Zool.* Vol. 134, pp: 33-62.
 23. **Kerfeld, C.A.; Sawaya, M.R.; Brahmandam, V.; Cascio, D.; Ho, K.K.; Trevithick-Sutton, C.C.; Krogmann, D.W. and Yeates, T.O., 2003.** The Crystal Structure of a Cyanobacterial Water-Soluble Carotenoid-Binding Protein. *Structure.* Vol. 11, pp: 55-65.
 24. **Latscha, T., 1989.** The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Advances in Tropical Aquaculture.* Vol. 9, pp: 319-325.
 25. **Liaaen-Jensen, S., 1990.** Marine carotenoids-Selected topics. *New J. Chem.* Vol. 14, pp: 747-759.
 26. **Linan-Cabello, M.A.; Medina-Zendejas, R.; Sanchez-Barajas, M. and Herrera, A.M., 2004.** Effects of carotenoids and retinol in oocyte maturation of crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquacult. Res.* Vol. 35, pp: 905-911.
 27. **Matsuno, T.; Tsushima, M. and Maoka, T., 2001.** Salmoxanthin, deepoxy-salmoxanthin and 7, 8-di dehydrodeepoxy-salmoxanthin from the salmon *Oncorhynchus keta*. *J. Nat. Prod.* Vol. 64, pp: 507-510
 28. **Merchie, G.; Kontara, E.; Lavens, P.; Robles, R.; Kurmaly, R. and Sorgeloos, P., 1998.** Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistant of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture Research.* Vol. 29, pp: 579-585.
 29. **Metusalach, S.J.; Brown, J. and Shahidi, F., 1996.** Deposition and metabolism of dietary canthaxanthin in different organs of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture.* Vol. 142, pp: 99-106.
 30. **Mikulin, A.Y., 2003.** The influence of carotenoids contained in the eggs upon the offspring quality at artificial fish breeding. *Proceedings book, Int. Symp. Coldwater Aquaculture.* St Petersburg, Russia, 72 p.
 31. **Niu, J.; Tian, L.X.; Liu, Y.J.; Yang, H.H.; Ye, C.X. and Gao, W., 2009.** Effect of dietary astaxanthin on growth, survival, and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society.* Vol. 40, pp: 795-802.
 32. **Page, G.I. and Davies, S.J., 2003.** Hepatic carotenoid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using an isolated organ perfusion model. *Aquaculture.* Vol. 225, pp: 405-419.
 33. **Page, G.I.; Russell, P.M. and Davies, S.J., 2005.** Dietary carotenoid pigment supplementation influences hepatic lipid and mucopolysaccharide levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.* Vol. 142, pp: 398-402.
 34. **Paibulkichakul, C.; Piyatiratitivorakul, P.; Sorgeloos, P. and Menasveta, P., 2008.** Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Using fish oil and Astaxanthin feed supplements. *Aquaculture.* Vol. 282, pp: 83-89.
 35. **Pangantihon-Kuhlmann, M.P.; Millamena, O. and Chern, Y., 1998.** Effect of dietary astaxanthin and vitamin

