

## تعیین سن و پارامترهای رشد در

### ماهی سرخو معمولی (*Lutjanus johni*) آبهای هرمزگان

عیسی کمالی

مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

بخش ارزیابی ذخایر، مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان - بندرعباس، صندوق پستی: ۱۵۹۷

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۷۷ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۷۷

### چکیده

سرخو معمولی (*Lutjanus johni*) یکی از ماهیهای با ارزش آبهای خلیج فارس و دریای عمان است. برای تعیین سن و پارامترهای رشد آن یک بررسی تحقیقاتی از اردیبهشت ۷۵ تا تیر ۷۶ در آبهای هرمزگان صورت پذیرفت. نمونه گیری بصورت ماهانه بود و جمعاً ۶۱۳ نمونه تهیه گردید. سن از روی دواير رشد (لایه نیره و روشن) ظاهری سنگ گوش (otolith) ۵۹۷ نمونه و همچنین از روی لایه‌های رشد استخوان اوراهيال (urohyal) در بعضی از نمونه‌ها تعیین گردید. پارامترهای رشد براساس فرمول وان برتالانفی محاسبه گشت. معادله رشد وان برتالانفی برای این گونه بصورت  $L_t = 122 \times (1 - e^{-(0.128 \times (L_{\infty} - L_t) / 29.5)})$  بدست آمد. معادله رشد Lee از استخوان اوراهيال (urohyal) بصورت  $L_t = -3.718 - [(L_{\infty} + 3.718)(O_t / OR)]$  بدست آمد. محاسبه پیشینه بردازی (Back calculation) جهت تعیین طول براساس فرمول Lee در استخوان اوراهيال انجام شد، میانگین طول ماهی برای سن های ۱ تا ۸ سال برآورد گردید. تست t برای مقایسه سن های بدست آمده از سنگ گوش و اوراهيال هر ماهی انجام شد و اختلاف معنی داری رانشان نداد ( $P > 0.05$ ).

### مقدمه

ماهی سرخو معمولی (*Lutjanus Johni*) یکی از گونه های غالب سرخو ماهیان (LUTJANIDAE) در آبهای جنوبی ایران است. این گونه کف زی بوده و در مناطق صخره‌ای و

تپه‌های مرجانی زندگی می‌کند و از سواحل دریا تا اعماق ۸۰ متر دیده شده است (Fischer & Bianchi, 1984).

این ماهی شکارچی بوده و گاهی ممکن است در تعقیب شکار به مناطق غیر صخره‌ای نیز وارد شود (Polovina & Ralston, 1987).

در سواحل استان هرمزگان و اطراف جزایر صخره‌ای نظیر لارک، ابوموسی، قارور و کیش صید سرخو معمولی عمدتاً با گرگور و قلاب صورت می‌پذیرد (رزمنجو و خضایی ۱۳۷۴ و ۱۳۷۲) گونه فوق در مناطق جغرافیایی خاص زندگی خود (مناطق صخره‌ای و تپه‌های مرجانی) سهم عمده‌ای از کل صید را تشکیل می‌دهد (Allen, 1985).

با توجه به اهمیت اقتصادی و غذایی آن در ایران و سایر نقاط جهان خصوصاً جنوب شرق آسیا ضرورت مطالعه اطلاعات زیستی نظیر پارامترهای رشد و رابطه طول و سن امبری اجتناب ناپذیر است. مقاوم بودن این ماهی به شرایط سخت (حمل و نقل مؤلدها، تغییرات شرایط محیطی استخرهای پرورشی و ...) این گونه را برای تکثیر و پرورش ایده‌آل می‌سازد هم اکنون در کشورهای جنوب شرق آسیا نظیر مالزی، سنگاپور، نیوزلند پرورش آن انجام شده و نتایج مطلوبی را حاصل کرده است (Seng, 1992; Field, 1993). این تحقیق جهت شناخت پارامترهای رشد و تعیین رابطه طول و سن که امبری ضروری در صنعت تکثیر و پرورش و ارزیابی ذخایر ماهیان می‌باشد برای این گونه در آبهای استان هرمزگان انجام گرفته است.

## مواد و روشها

جهت بررسی رشد (پارامترهای رشد مورد استفاده در تعیین سن و رابطه طول و سن) در ماهی سرخو معمولی از اردیبهشت ۱۳۷۵ تا تیرماه ۱۳۷۶ نمونه‌برداری بطور ماهانه از مناطق تخلیه صید در بندر بستانه در غرب استان و بازار ماهی فروشان بندرعباس انجام گرفت. در طی این ۱۵ ماه بررسی تعداد ۶۱۳ عدد ماهی سرخو مورد زیست سنجی قرار گرفت.

در عملیات زیست سنجی طول کل (از پوزه تا انتهای باله دم)، طول استاندارد (از پوزه تا

ستون فقرات و ...) ابتدا سنگ گوش (otolith) انتخاب گردید و از اواسط اجرای تحقیق استخوان اوراهیال (urohyal) نیز مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج سنگ گوشها از درون سر ماهی، ابتدا کانال‌های آبششی ماهی از سر جدا شدند و پس از شکافتن جایگاه سنگ گوش (شکل الف)، سنگ گوشها بیرون آورده شد (این جایگاه در زیر جمجمه، انتهای فضای دهانی و در طرفین سقف حلق قرار دارد و بوسیله غضروف نیمه شفاف پوشیده شده است). سنگ گوشها پس از شستشو خشک شده و پس از یک یا دو ماه که رطوبت خود را از دست دادند برای خواندن تعداد حلقه‌های رشد مورد استفاده قرار گرفتند. از استخوان اوراهیال ۶۶ ماهی بطول‌های مختلف نیز جهت تعیین سن و همچنین تأیید سن تعیین شده بوسیله اتولیت، استفاده شد. استخوان اوراهیال از مجموعه استخوانهای سرماهی است (Smith & Heemstra, 1986) که در محل تلاقی عضلات سینه با بخش تحتانی اتصال آبششها در زیر جمجمه قرار دارد (شکل ۱ ب) و جهت تعیین سن در سرخو ماهیان مناسب می‌باشد (Davis & West, 1992). حلقه‌های رشد در سنگ گوشها از لایه‌های تیره و روشن تشکیل شده است، در استخوان اوراهیال که یک استخوان نازک و نیمه شفاف است این لایه‌ها نیز مشخص بودند. در این استخوان فاصله لایه‌های تیره و روشن اندازه‌گیری شد که در محاسبه پیشینه‌پردازی (Back calculation) جهت تعیین طول مورد استفاده قرار گرفت. رابطه طول و سن از طریق معادله وان برتالانفی محاسبه شد که در این راستا پارامترهای رشد در این معادله تعیین گردیدند (Manooch & Mason, 1984).

معادله فوق عبارت است از:  $L_t = L_{\infty} (1 - e^{-k(t-t_0)})$  که در این معادله:

$L_{\infty}$  : طول بی نهایت فرضی است که ماهی به آن خواهد رسید

$K$  : ضریب رشد

$t_0$  : سن فرضی در زمانی که طول ماهی صفر است

$t$  : سن ماهی در زمان صید

$L_t$  : طول ماهی در سن  $t$

ابتدا  $L_{\infty}$  از رابطه  $L_{\infty} = \frac{l_{max}}{7.95}$  بدست آمده و پس از یک سری عملیات ریاضی در فرمول وان

برتالانفی، همبستگی بین  $\ln \left| \frac{L_{\infty} - L_t}{L_{\infty}} \right|$  و سن ( $t$ ) ماهی تعیین گردید. سپس با تغییر  $L_{\infty}$  در



شکل ۱: نمایش محل استقرار سنگ گوش و استخوان اوراهيال در سر ماهی سرخو (*Lutjanus johni*)

الف: سنگ گوش (otolith)      ب: اوراهيال (urohyal)

فرمول فوق تا کسب بهترین همبستگی محاسبه و  $L_{\infty}$  حاصل به عنوان مقدار نهایی در نظر گرفته شد (Hoedt, 1992). مقدار  $K$  از رابطه  $K = -b$  و مقدار  $L_0$  از رابطه  $L_0 = a/k$  بدست آمد (b شیب خط و a مقدار ثابت رابطه همبستگی است). از آنالیز فراوانی نسبی ماهانه لبه‌های تیره و روشن بر روی سنگ گوش در تعیین دوره تناوب تشکیل حلقه‌های رشد ظاهری استفاده شد. محاسبه پیشینه‌پردازی (Back calculation) طول در دوره‌های سنی با استفاده از استخوان اوراهیال از روش Lee انجام شد (Carlander, 1981) که معادله آن عبارت است از:

$$L_i = a + [(L_c - a)(O_i / OR)]$$

$L_i$  : طول ماهی در زمان شکل‌گیری حلقه سالانه در سن (i)

a : عدد ثابت که از محاسبه همبستگی بین سن ماهی و طول اوراهیال بدست آمد.

$L_c$  : طول ماهی در زمان صید

$O_i$  : طول اوراهیال در زمان شکل‌گیری سالانه در سن (i)

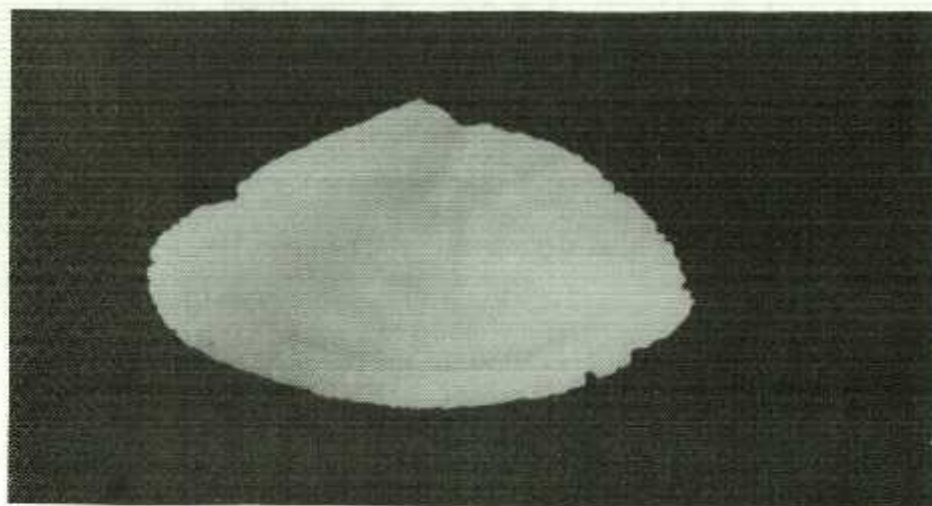
OR : طول کل اوراهیال

از ۶۱۳ ماهی بررسی شده ۵۹۷ جفت از سنگ گوشها جهت خواندن تعداد حلقه‌های رشد مناسب بودند که تعیین سن شدند بقیه یا به علت شکستگی و یا کهولت سن قابل خواندن نبودند.

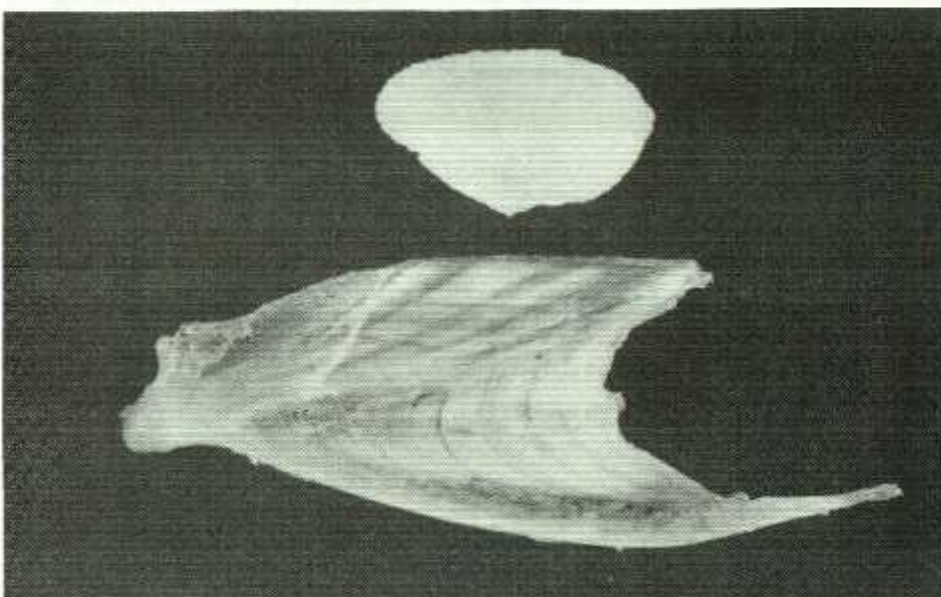
## نتایج

سن ۵۹۷ عدد ماهی با توجه به حلقه‌های رشد قابل مشاهده در سطح خارج (Distal) سنگ گوش تخمین زده شد (شکل ۲). در این بررسی کوچکترین طول ماهی ۱۲ سانتی‌متر و بزرگترین طول آن ۹۴ سانتی‌متر بود که سن آن ۸/۵ سال برآورد گردید. شکل شماره ۳ لایه‌های رشد در استخوان اوراهیال سرخو معمولی را نشان می‌دهد.

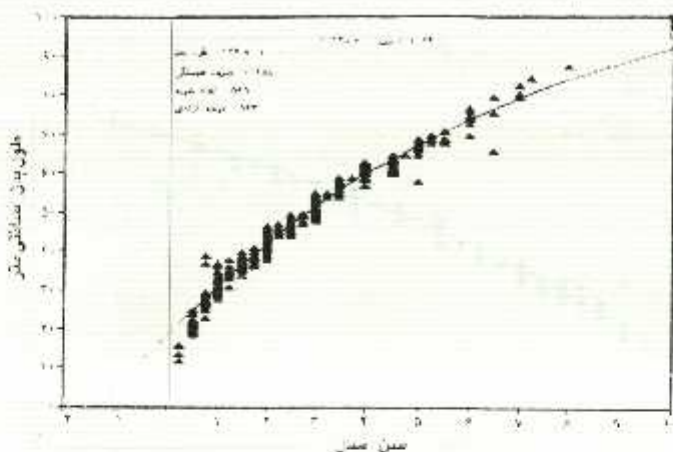
با قرار دادن  $L_{\infty} = 122$  در معادله وان برتالانفی بهترین ضریب همبستگی بین متغیر مستقل سن (i) و متغیر وابسته به آن یعنی  $[ \frac{L_{\infty} - L_i}{L_{\infty}} ]$  بدست آمد (شکل ۲).



شکل ۲: لایه‌های رشد در سنگ گوش سرخو معمولی (*Lutjanus johni*)



شکل ۳: لایه‌های رشد در استخوان اوزاهاال سرخو معمولی (*Lutjanus johni*)



شکل ۴: رابطه طول و سن ماهی سرخو (*Lutjanus johni*) در آبهای هرمزگان (۷۶-۱۳۷۵)

همچنین با استفاده از روش فورد - والفورد نیز پارامترهای رشد برای ۵۹۷ عدد ماهی محاسبه گردید که نتایج زیر حاصل شد:

$$\Rightarrow \text{وان برتالانفی} (L_{\infty} = 122 \quad K = 0.1128 \quad t_0 = -1.112 \quad R^2 = 0.9888)$$

$$\Rightarrow \text{فورد و الفورد} (L_{\infty} = 119 \quad K = 0.1148 \quad t_0 = -0.705 \quad R^2 = 0.87)$$

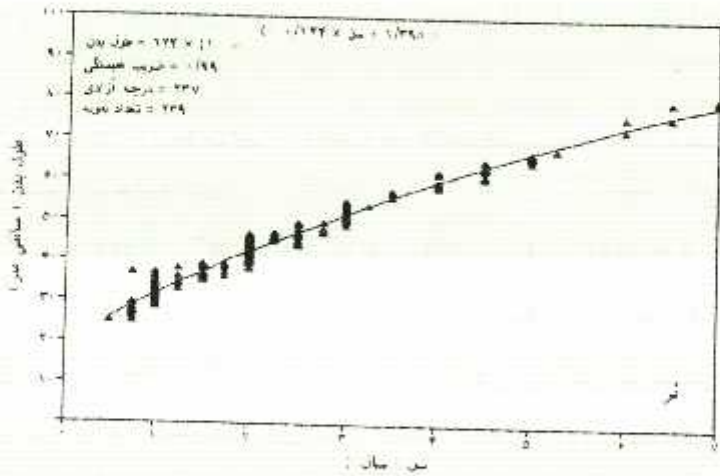
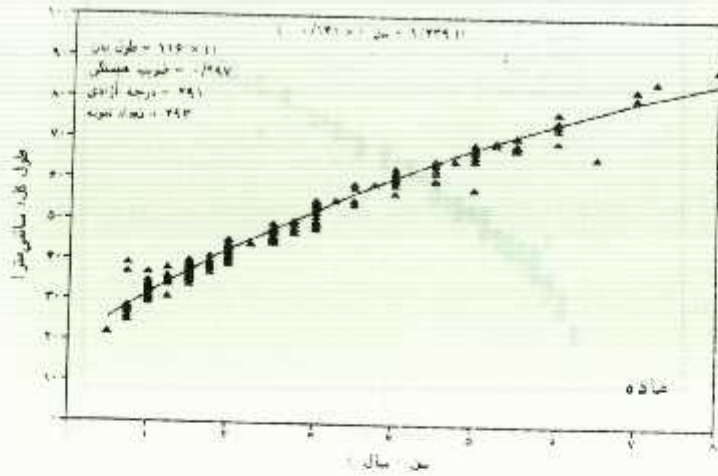
رابطه طول با سن به تفکیک جنس با استفاده از معادله وان برتالانفی نیز محاسبه گردید (شکل ۵). در بررسی‌های انجام شده بر روی سن ۶۶ عدد ماهی از روی سنگ گوش و استخوان اوزاهيال، بطور مجزا پارامترهای رشد در معادله وان برتالانفی به قرار زیر حاصل شد:

$$\Rightarrow \text{سنگ گوش} (L_{\infty} = 125 \quad K = 0.1116 \quad t_0 = -1.1492 \quad R^2 = 0.976)$$

$$\Rightarrow \text{استخوان اوزاهيال} (L_{\infty} = 124 \quad K = 0.105 \quad t_0 = -1.533 \quad R^2 = 0.987)$$

محاسبه پیشینه برداری طول در سنین مختلف با توجه به قابلیت اندازه‌گیری فواصل رشد در استخوان اوزاهيال از طریق معادله  $L_{t+1}$  نیز انجام شد (جدول ۱) و معادله زیر حاصل گشت:

$$L_t = -3/718 - [(L_{t+1} + 2/718) (O_t/OR)]$$



شکل ۵: رابطه طول و سن سرخو معمولی (*Lutjanus johni*) الف - جنس ماده ب - جنس نر

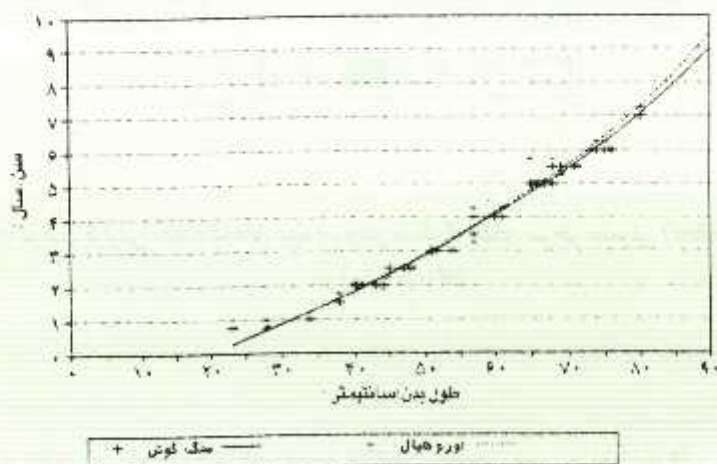
در آبهای هرمزگان (۷۶-۱۳۷۵)



جدول ۱: میانگین محاسبه طول پروش 1.5x و طول مشاهده شده (میلیمتر) در زمان تشکیل حلقه رشد (سال) برای زده سنی ۱ تا ۸. ۶۶ عدد ماهی سرخو معمولی (*Lutjanus johni*) در آبهای هرمزگان (۱۳۷۶)

زده سنی	تعداد	میانگین طول در زمان صید	انحراف معیار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
۱	۹	۳۱۹	۲۷	۳۲۲							
۲	۱۲	۴۱۲	۲۸	۴۱۳	۲۶۶						
۳	۱۴	۵۲۱	۳۴	۲۶۸	۳۹۶	۵۲۲					
۴	۸	۶۰۰	۴۲	۲۳۸	۳۹۰	۴۹۸	۶۰۰				
۵	۸	۶۶۲	۴۴	۲۶۱	۳۶۵	۵۰۲	۵۹۱	۶۶۲			
۶	۷	۷۳۷	۴۸	۲۱۶	۳۳۶	۴۶۸	۵۵۱	۶۲۸	۷۳۸		
۷	۵	۸۲۶	۵۶	۲۳۲	۳۶۳	۴۸۱	۵۶۸	۶۶۳	۷۵۱	۸۲۶	
۸	۳	۹۰۷	۶۵	۲۵۹	۴۰۶	۵۱۲	۶۲۳	۷۱۳	۷۸۴	۸۵۹	۹۰۷

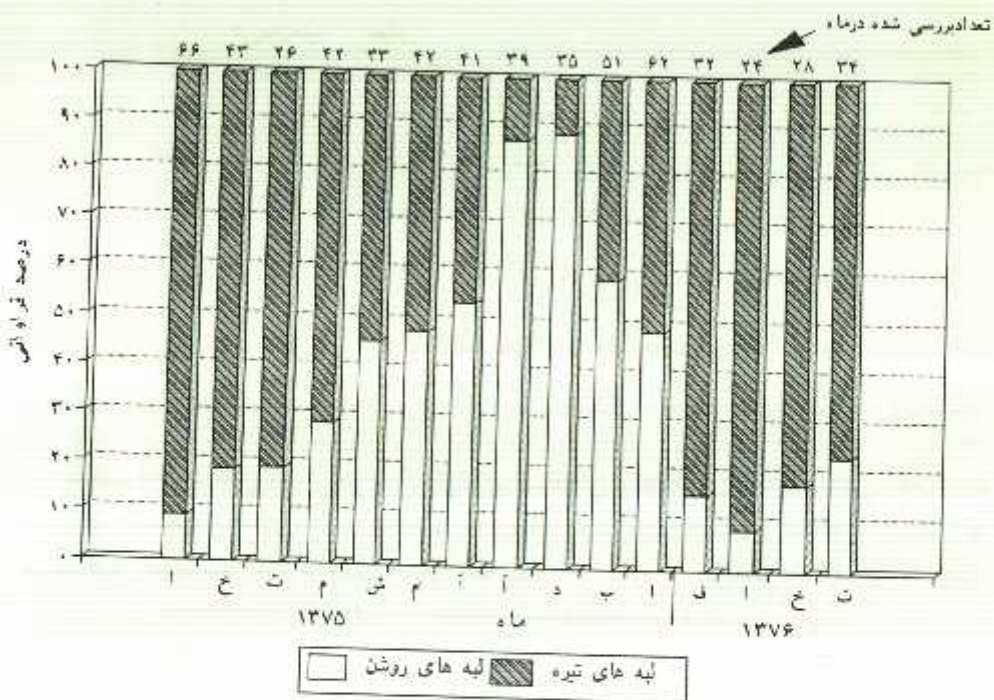
مقایسه ارتباط طول با سن در سنگ گوش و استخوان اوراهيال در شکل ۶ نشان داده شده است. در یک تحلیل آماری (تست t) که بین سن‌های تخمین زده شده در استخوان اوراهيال و سنگ گوش انجام شد اختلاف معنی داری دیده نشد ( $n=66$   $d=64$   $p>0.05$ )



شکل ۶: مقایسه رابطه طول و سن در استخوان اوراهيال و سنگ گوش سرخو معمولی (*Lutjanus johni*) در آبهای هرمزگان (۱۳۷۶)

در شکل ۷ یک اوج فراوانی نسبی برای لبه‌های روشن در ماه‌های آذر و دی ماه بدست آمد.

اوج فراوانی نسبی لبه‌های تیره در اردیبهشت بود، و در سال ۱۳۷۶ نیز مشابه سال ۱۳۷۵ بود.



شکل ۷: درصد فراوانی ماهانه لبه‌های تیره و روشن سنگ‌گوش‌های سرخو معمولی (*Litjanus johnei*) در آب‌های هرمزگان

## بحث

یکی از مهمترین عوامل شناخت رشد ماهیان، تعیین سن و پارامترهای رشد می‌باشد. روش‌های آناتومی تعیین سن که از شمارش علائم رشد در بافت‌های سخت نظیر فلس، خار،

استخوان، سنگ گوش حاصل می‌شود، بسیار متداولتر از سایر روشهایی است که به منظور تعیین سن بکار می‌رود (Manooch & Mason, 1984).

در این بررسی نمونه‌های موجود در تعدادی از سنگ گوشهای ماهیان مسن، علائم رشد وضوح کمتری داشتند و گاهی نیز غیرقابل شمارش بودند. در صورتی که در استخوان‌های اوراهيال بررسی شده فواصل لایه‌ها در ماهیان مسن نیز واضح بودند.

Davis & West, 1992 گزارش دادند که فواصل بین حلقه‌های رشد سالانه در ماهی‌های مسن بر روی سنگ گوش ماهی سرخو (*Lutjanus vittus*) بسختی قابل مشاهده است ولی در استخوان اوراهيال این فواصل کاملاً مشخص هستند. این گزارش جنبه موضوعی مطالعه حاضر را تأیید می‌کند.

از تحلیل آماری بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که تشکیل حلقه‌های رشد در سنگ گوش یا ایجاد علائم رشد در استخوان اوراهيال کاملاً مطابقت داشته و در نتیجه می‌توان از استخوان اوراهيال در این ماهی به عنوان یک شاخص تعیین سن استفاده کرد.

Davis & West, 1992 نیز در یک بررسی بر روی ماهی سرخو *L. vittus* خاطر نشان کردند که لایه‌های رشد در استخوان اوراهيال با حلقه‌های رشد در سنگ گوش مطابقت دارد. چندین محقق دیگر نیز استخوان اوراهيال را برای تعیین سن چند گونه از سرخو ماهیان مورد استفاده قرار داده‌اند و همین نتایج را بدست آوردند (Reshenikov & Claro, 1976; Claro, 1983; Palazon & Gonzalez, 1986; Pozo & Spinosa, 1982).

همچنین نتایجی که این محققین در رابطه با طول و سن کسب کردند با نتایج حاصله از این تحقیق همخوانی داشت.

دوره تناوب رسوب گذاری حلقه‌ها با نمایش فراوانی نسبی سنگ گوشها واجد لبه‌های تیره و روشن، مشخص می‌شود. در حالت تشکیل سالانه این حلقه‌ها، یک اوج فراوانی نسبی در هر سال برای حلقه تیره یا روشن بدست خواهد آمد (Morales-nin, 1992). با استفاده از نتایج می‌توان گفت که هر جفت حلقه (تیره و روشن) شمرده شده در سنگ گوش و استخوان اوراهيال معرف یک سال سن و مجموع تعداد هر جفت حلقه معرف سن ماهی می‌باشد. همچنین می‌توان حدس

زده که زمان تشکیل لایه‌های سالانه (لایه های روشن) پس از اوج لایه‌های تیره یعنی خرداد تا تیر ماه می‌باشد. Samuel et al., 1987 اعلام کردند که رشد یک ساله در ماهی سرخو بوسیله یک لایه روشن مشخص شده و لایه تیره دوره های متناوب رشد را مجزا می‌کند. نتایج حاصله با نظریات Samuel et al., 1987 مطابقت داشته که دلیلی بر تأیید مطالعه حاضر است.

در کل، نتایجی که از این تحقیق حاصل شده، در امر شناخت ذخایر و ارزیابی آن و همچنین در تعیین نرخ رشد و تعیین طول در سن بلوغ (فاکتورهای اساسی در تکثیر و پرورش) کاربرد وسیعی داشته و یکی از ملزومات اصلی در تکثیر و پرورش ماهی می‌باشد.

## منابع

رمزجو، غ. و خضرای نیار، ر.، ۱۳۷۲. گزارش نهایی طرح ارزیابی ذخایر ایزیان شیلاتی جلد اول: تحلیل وضعیت صید و صیادی در استان هرمزگان سال ۱۳۷۱، مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان، بندرعباس. ۹۰ ص.

رمزجو، غ. و خضرای نیار، ر.، ۱۳۷۴. گزارش نهایی طرح ارزیابی ذخایر ایزیان شیلاتی جلد اول: تحلیلی بر وضعیت صید و صیادی در استان هرمزگان سال ۱۳۷۳، مرکز تحقیقات شیلاتی دریای عمان، بندرعباس. ۱۰۹ ص.

Allen, G.R. , 1985. FAO species catalogue, Snappers of the world, FAO, Rome, Italy. Vol.6. 208 P.

Carlander, K.D. , 1981. Caution on the use of the regression method of back calculating lengths from scale measurements. Fisheries (Bethesda) Vol. 6. pp.2-4.

Claro, R. , 1983. Ecology and life cycle of the gray snapper *Lutjanus griseus* (Linnaeus) in the cuban plat form. 3. Dynamic of some morphophysiological indicator Rep. Invest. Inst. Oceanol. Acad. Sienc. Cuba. No.36, 14 P.

Davis, T.L.O. ; West, G.J. . 1992. Growth and mortality of *Lutjanus vittus* (Quoy

- and Gaimard) from the North west shelf of Australia, Fish. Bull. U.S. Vol. 90, pp.365-404.
- Field, D. , 1993. Expanding horizons for Northern territory aquaculture. Australia. Prof. Fisherman, Vol. 15, No. 6. 20 P.
- Fischer, W. ; BIANCHI, G. , 1984. FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Indian Ocean (Fishing area 51). FAO, Rome. Vol. 3. pp.LUT lut6.
- Hoedt, F.E. , 1992. Age and growth of a large tropical anchovy, *Thyssa hamilton* (Gray): A comparison of ageing techniques. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, Vol.43, pp.953-71.
- Lim, L.C. ; Cheong, L. ; Lee, H.B. and Heng, H.H. , 1985. Induced breeding studies of the John's snapper *Lutjanus johni* (Bloch), in Singapore. Singapore J. Pri. Ind. Vol. 13, No. 2, pp.70-83.
- Manooch, S.C. ; Mason, D.L. , 1984. Age, growth, and mortality of lane snapper from southern Florida. Northeast Gulf Sci. Vol. 7, No. 1, pp.109-115.
- Morales-nin, B. , 1992. Determination of growth in bony fishes from otolith microstructure. FAO fish. Tech. Paper, 322, FAO, Rome, Italy. ?.
- Nedachi, K. ; Hirota, N. , 1991. Changes in ATP related compounds and IMP-degrading activity of New Zealand golden snapper. Japan. Nippon-Suisan-Gak kaishi - Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. Vol. 57, No. 2, pp.329-335.
- Palazon, J.L. ; Gonzales, L.W. , 1986. Age and growth of the mutton snapper, *Lutjanus analis* (cuvier, 1828) (Teleostei: Lutjanidae) in Margarita Y alrededores, Venezuela. INVEST. PESQ. BARC. Vol. 50, No.2, pp.151-165.
- Polovina, J.J. ; Ralston, S. , 1987. Tropical snappers and groupers biology and

- Fisheries management. Ocean Resour. Mar. Policy - Ser. Boulder, Co. USA, Westview - press. 656 P.
- Pozo, E. and Spinosa, L. , 1982.** Study of the age and growth of the silk snapper (*Lutjanus vivanus* Cuvier, 1828) in south eastern cuban shelf. REV. CUB. INVEST. PESQ. Vol.7, No.2, pp.1-23.
- Reshenikov, Y.S. ; Claro, R.M. , 1976.** Cycles of biological processes in tropical fishes with reference to *Lutjanus synagris*. J. Ichthyol, Vol.16, pp.711-723.
- Samuel, M. ; Mathews, C.P. and Bawazeer, A.A. , 1987.** Age and validation of age from otoliths for warm water fishes from the Arabian (Persian) Gulf. In: Summerfelt, R.C. and G. E. HALL, The Age and growth of fish. The Iowa state Uni. Press, Ames, Iowa. pp. 253-266.
- Seng, L.K. and Seng, L.T. , 1992.** Treatment of cultured golden snapper (*Lutjanus johni*) infected with monogeneans. Malaysia, J. Aquaculture: Vo. 106, No.1, pp.1-8.
- Smith, M.M. ; Heemstra, P.C. (eds). 1986.** Smith's sea fishes. Springer - Velage, New York. 1047 P.

# Age Determination and Growth Parameters in Golden Snapper (*Lutjanus johni*) of Hormozgan Waters

Kamali A.

I.F.R.O.

Stock Assessment Dep., Oman Sea Fisheries Research Center

P.O.Box : 1597 Bandar Abbass, Iran

received : October 1998      accepted : February 1999

## ABSTRACT

Golden snapper is one of the valuable fishes of the Persian Gulf and Oman Sea. To determine the age and growth parameters a research study was conducted in Hormozgan waters from May 1996 to July 1997. Samples (the total amount was 613) were collected on a monthly basis. The age determination of 597 fish were performed using apparent growth rings (dark and light layers) on the otoliths.

Growth layers of urohyal bone were used for age determination in some samples. Growth parameters were calculated according to the Von Bertalanffy formula. The Von Bertalanffy growth equation for this species was as  $TL=122(1-e^{-0.128(t+1.29)})$ .

The Lee equation, based on urohyal bone readings, was calculated as  $TL=-3.718[LC+3.718](Oi/OR)]$ . Back calculation was performed to determine the length on the basis of Lee formula in the urohyal and the mean length of the age groups of 1-8 years was obtained.

The T-test was applied to compare two methods of age determination (based on otolith and urohyal) and there was not any significant difference ( $P>0.05$ ).