View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

بررسی مراحل توسعه و تکوین جنینی ماهی بنی

(*Barbus sharpeyi* Gunther, 1874)

سارا احمدی[۱]*، مژگان خدادادی[۲]، لاله رومیانی[۳]، رضا حکیمی مفرد[۴]

* sara_ahmadi_61@yahoo.com

۱، ۲ و ۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، گروه شیلات، اهواز، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، گروه شیلات، خوزستان، ایران

تاریخ دریافت: خرداد۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۲**

چکیده

درک مراحل جنینی ماهی بنی، ابزار مفیدی برای یافتن زمان و شرایط محیطی مناسب تخم‌ریزی، احتیاجات رشد و استفاده از تکنیکهایی جهت افزایش نرخ رشد و بازماندگی خواهد بود. در این بررسی، مراحل توسعه و تکوین جنینی در ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. مولدین پرورشی در شرایط اسارت تخم‌ریزی کردند. تخم‌ها کروی، نارنجی و بسیار چسبنده و فاقد گلبول چربی بودند. ظهور شکافت سلولی در این گونه سریع بوده و اولین تقسیم در ۲۰- ۱۵ دقیقه پس از لقاح مشاهده شد. بلاستولاسیون ۷:۴۰ و گاسترولاسیون ۱۳:۱۰ ساعت پس از لقاح با میانگین (±SD) قطر کیسه زرده ۰/۰۶۱± ۱/۱۸ میلی‌متر ثبت گردید. اندام‌زایی ۲۱ ساعت پس از لقاح، زمانی که بلاستوپور بسته شده و نوتوکورد تشکیل شد، آغاز شد. مراحل جنینی با ظهور مغز، تشکیل بندهای بدن و ملانوفورها در روی کیسه زرده دنبال گردید. قلب شروع به زنش نموده و چرخش خون ۶۵ ساعت پس از لقاح به خوبی قابل مشاهده بود. سر، دم و باله سینه‌ای به طور متناوب حرکت می کردند. جنین ماهی بنی در ۱۰: ۷۹ و ۱۰: ۸۴ ساعت پس از لقاح به ترتیب به مراحل پیش تفریخ (Pre hatching) و تفریخ نهایی رسیده و با طول جنین ۰/۱۲۱± ۵/۲۹ میلی‌متر از پوسته خارج گردید.

لغات کلیدی: تکوین جنینی، تخم، انکوباسیون، *Mesopotamichthys sharpeyi*

*نویسنده مسئول

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

مقدمه

به طور کلی توسعه و تکوین در ماهیان، به مراحل جنینی، لاروی، نوجوانی، جوانی، بلوغ و پیری طبقه‌بندی می‌شود (Urho, 2002). توسعه و تکوین عمومی مراحل اولیه زندگی در ماهیان استخوانی، تقریباً از الگوی مشابهی پیروی می‌کند (Falk-Peterson, 2005). مشاهده خصوصیات مورفولوژیکی طی مراحل اولیه تکامل مطمئن‌ترین و سودمندترین شاخص کیفی و کاربردی در تخم ماهیان استخوانی است (Vallin & Nissling, 1998).

دوره جنینی دوره‌ای است که در آن تکامل موجودات کاملاً به تامین مواد غذایی توسط مادر (تغذیه از زرده تخم و یا به طور مستقیم از جفت) وابسته است. این دوره بلافاصله پس از لقاح آغاز شده و می‌تواند به دو مرحله تقسیم گردد. اولین مرحله، مرحله تقسیم تخم است که فاصله بین اولین تقسیم سلولی تا مشاهده و تشخیص اندام‌ها، مخصوصاً صفحه عصبی (Neural Plate) بوده و در مرحله دوم، جنین به عنوان یک مهره دار قابل تشخیص می‌باشد (Moyle & Cech, 2004).

زمان رسیدن به مراحل مختلف توسعه، تکوین و تفریخ به گونه و شرایط محیطی بستگی دارد. به محض آن که جنین از غشاء تخم جدا گردید، مرحله جنین آزاد آغاز می‌شود. در این مرحله، جنین برای تامین نیازهای غذایی به زرده متکی بوده، در حالی که آغاز مرحله لاروی با نمایش توانایی کسب مواد غذایی از خارج همراه است (Chen, 2005).

ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) از خانواده کپورماهیان و از جنس Mesopotamichthys بوده که در رودخانه‌های کارون و کرخه (نیک‌پی، ۱۳۷۵) بهمنشیر، هورالعظیم و هور شادگان (نجف‌پور، ۱۳۷۵) گزارش شده است. بازارپسندی این ماهی و استفاده از روش‌ها و آلات صید مخرب، بقاء نسل این ماهی را شدیداً به مخاطره انداخته است (یزدی‌پور، ۱۳۷۰).

امروزه ثابت شده که یکی از راه‌های شناخت شاخص های زیستی ماهیان به منظور دستیابی به الگوهای موفق آبزی‌پروری در جهان، کسب آگاهی از روند اولیه رشد و نمو آن‌ها در شرایط کارگاهی می‌باشد. با توجه به این‌که حساس‌ترین مرحله رشد در ماهیان، دوره تکامل جنینی آن‌ها به شمار می‌رود (Blaxter, 1988)، نقش شناخت خصوصیات مورفوفیزیولوژیک تخم از مرحله لقاح تا تفریخ (دوره زمانی توسعه و تکوین جنینی، سایز سلولی و نقش اکسیژن و دما)، در ارزیابی توان تولید در آبزی‌پروری و بازسازی ذخایر این گونه ارزشمند، تاکنون به درستی مشخص نشده است.

بیشتر مطالعات جنینی انجام شده بر روی ماهیان خاویاری و آب شور می‌باشد، برای مثال بهزادی (۱۳۷۰) مراحل رشد و نمو جنینی ماهی سفید (*Rutilus frisi kutum*) را مورد بررسی قرار داد. شفیع‌زاده (۱۳۷۲) بر روی ماهی قره برون (*Acipencer persicus*) و پرندآور (۱۳۸۳) بر روی ماهی ازون برون (*Acipencer stellatus*) مطالعات مشابهی را انجام دادند. در حوزه خلیج فارس، سروی غیاث‌آبادی (۱۳۸۶) مراحل تکامل جنینی و لاروی ماهی شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) را بررسی نمود.

Kimmel و همکاران (۱۹۹۵) مطالعه رشد و نمو جنینی و لاروی گورخرماهی (*Danio rerio*) را انجام دادند.

Reynalte-Tataje و همکاران (۲۰۰۱) در برزیل بر روی گونه (*Leporinus macrocephalus*) تحقیق نمودند. Firat و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Okan Kamaci و همکاران در سال ۲۰۰۵ بررسی‌هایی را به ترتیب بر روی ماهیان *Dentex dentex* و*Sparus aurata* و Liew و همکاران (۲۰۰۶) این بررسی را بر روی دلقک‌ماهی (*Amphiprion ocellaris*) انجام دادند.

مطالعه مراحل توسعه و تکوین ماهی بنی، نه تنها دانش ما را در مورد نحوه و ساختار تکامل در این گونه افزایش می‌دهد، بلکه زمانی که الگوهای طبیعی تکامل جنینی به دلایل مختلف ژنتیکی، محیطی و یا هر دو دستخوش تغییر می‌شوند، می‌تواند مدلی را برای تشخیص و مقایسه ارائه دهد. هدف از انجام این تحقیق، تعیین مراحل تکاملی و جذب کیسه زرده ماهی بنی در زمان جنینی تحت شرایط کارگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌کار

این مطالعه، در مرکز توسعه ماهیان بومی استان خوزستان و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تکثیر، بررسی تخم، ثبت فاکتورهای زیستی و نمونه‌برداری از تخمک و تخم لقاح یافته از

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

۳ جفت مولد صورت گرفت. مولدین در حوضچه‌های سرامیکی با ابعاد ۱/۵×۰/۵×۳ متر، با تراکم ۵ کیلوگرم مولد در متر مکعب و جریان دائم آب نگهداری شدند. جهت کاهش استرس، سطح حوضچه‌ها پوشانده شد. اکسیژن محلول، دما و EC دو بار در روز اندازه‌گیری گردید. قبل از تزریق هورمون هیپوفیز، نرخ تعویض آب حوضچه‌های مولدین ۳۰ درصد در ساعت بود که پس از آن به ۱۵ درصد در ساعت کاهش یافت (Buke *et al.*, 2003).

عملیات تکثیر، از نیمه فروردین ماه آغاز و جهت تحریک به تخم‌ریزی، از هورمون هیپوفیز کپور استفاده شد. بدین منظور، ابتدا مولدین در ماده بیهوش کننده گل میخک با غلظت ۳-۱ قسمت در میلیون قرار گرفته و تزریق در زیر باله سینه‌ای انجام شد. هورمون مورد استفاده برای مولدین ماده، ۴ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن بود که طی دو نوبت به فاصله زمانی ۱۲ ساعت (در نوبت اول ۱۰ درصد غلظت هورمون و در ۱۲ ساعت بعد ۹۰ درصد باقی‌مانده) تزریق گردید، در صورتی که برای مولدین نر ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم در یک نوبت، در ۱۲ ساعت قبل از عملیات تکثیر استفاده شد (Buke *et al.*, 2003).

عملیات تکثیر در صبح انجام گرفت. تخمک‌ها را از ماهی ماده استحصال نموده و پس از آن اسپرم به آن اضافه شد. سپس به وسیله پر به آرامی و به حالت زیگزاگی آنها را مخلوط کرده و مرتباً محلول لقاح افزوده شد (برای تهیه محلول لقاح، ۳ گرم اوره و ۴ گرم نمک طعام در ۱ لیتر آب مخلوط می‌گردد).

به علت چسبندگی زیاد تخم ماهی بنی، عملیات شستشوی تخم‌ها و تعویض آب حدود ۱ ساعت طول کشید که باعث افزایش جذب آب و کاهش چسبندگی تخم‌ها شد. سپس تخم-ها جهت از بین بردن چسبندگی با محلول تانن (۳/۵ گرم تانن +۲۰ لیتر آب) به مدت ۲۰ ثانیه شستشو شده و این عمل چند بار تکرار شد (Al Hazza & Hussein, 2003).

تخم‌های استحصال شده درون انکوباتورهای ویس قرار گرفتند. دبی آب ۰/۶ لیتر بر دقیقه بوده و برای ضدعفونی نمودن تخم‌ها از مالاشیت گرین استفاده شد. از تخمک و تخم لقاح یافته تا ۸ ساعت پس از لقاح هر ۵ دقیقه و پس از آن تا زمان تفریخ کامل هر ۴۵ دقیقه یک بار به صورت سیفونی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها در شیشه‌های کوچک حاوی ماده تثبیت کننده (فرمالین ۲ درصد) قرار داده شدند. جهت ثبت وقایع، مراحل تکامل و خصوصیات مورفولوژی نمونه‌های زنده از میکروسکوپ نوری مدل Nikon Eclipse E400-Ш استفاده شد. در آزمایشگاه، نمونه‌های تثبیت شده توسط استریومیکروسکوپ مجهز به سیستم عکس‌برداری و فیلم‌برداری متصل به رایانه شناسایی شده، سپس با استفاده از نرم افزار Axio Vision، قطر تخم، قطر بلاستومر، ضخامت و طول جنین، سایز چشم و کیسه زرده اندازه‌گیری گردید.

خصوصیات مورفولوژیک و آناتومیک مراحل تکامل جنینی تشخیص و زمان وقوع هر پدیده، بر اساس مطالعات قبلی، زمانی که ۵۰ درصد نمونه‌ها به مراحل مختلف می‌رسیدند، ثبت گردید (Okan Kamaci *et al.*, 2005; Firat *et al.*, 2003; Gorshkova *et al.*, 2002; Tachihara & Kawaguchi, 2003; Arezo *et al.*, 2005; Chen, 2005).

میانگین قطر تخم، قطر بلاستومر، ضخامت جنین، طول جنین، سایز چشم و طول کیسه زرده ثبت شد. سپس حجم کیسه زرده، بر اساس فرمول زیر محاسبه شد که کیسه زرده را یک بیضی فرض می‌نماید (Blaxter & Hempel, 1966; Cetta & Capuzzo, 1982):

$$V=\frac{4}{3}\pi\frac{L}{2}(\frac{H}{2})^2$$

L بزرگ‌ترین محور و H کوچک‌ترین محور (عمودی) بیضی می‌باشد. لازم به ذکر است که برای به دست آوردن میانگین و انحراف معیار از ۳۰ نمونه در هر دوره نمونه‌برداری استفاده گردید.

نتایج

در این بررسی میزان اکسیژن محلول ۷/۳- ۶/۵ میلی‌گرم در لیتر، pH ۷-۷/۳ ، دما با میانگین (±SD) ۰/۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و EC ۰/۶-۰/۵ میلی‌موس بر متر مکعب ثبت گردید. میانگین (±SD) وزن مولدین ماده ۱۲۷±۱۰۰۰ گرم، میانگین (±SD) طول ۴/۵±۴۱ سانتی‌متر، میانگین (±SD) وزن و طول متوسط مولدین نر به ترتیب ۱۵۴±۶۹۰ گرم و ۳/۷±۴۳/۵ سانتی متر بود. میانگین (±SD) وزن تخم‌های مولدین مورد استفاده ۵±۹۳/۵ گرم و میانگین (±SD) حجم تخم آب کشیده ۷±۳۲۱/۶ سی‌سی بود. بر اساس مشاهدات تکامل و تغییرات ظاهری، مراحل جنینی این گونه را می‌توان به سه دوره طبقه‌بندی نمود:

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

دوره اول: از لقاح تا اندام‌زایی (Organogenesis)

تخمک: تخم‌ریزی ۱۲ ساعت پس از تزریق دوم و در اولین ساعات صبح انجام شد. تخمک ماهی بنی زرد رنگ، کوچک، کروی، بسیار چسبناک، فاقد گلبول چربی و دارای توده زرده بود. تعداد تخم‌ها در حدود ۴۵۰-۴۰۰ عدد در هر گرم تخم و میانگین (±SD) اندازه تخمک ۰/۱۰۲±۱/۵۷ میلی‌متر بدست آمد. تخم این ماهی در زیر استریومیکروسکوپ کروی بوده و در سطح آن میکروپیل به صورت برجسته و نسبتاً بزرگ مشاهده شد (شکل ۱).

مرحله تخم لقاح‌یافته: اولین مرحله پس از لقاح است. سیتوپلاسم تخمک به صورت متراکم درآمده و دارای یک سلول بلاستومر بود. در این مرحله، بلاستومر تک سلولی به صورت شفاف، بی‌رنگ، مدور و متورم بوده و در قطب حیوانی تخم مشاهده شد (شکل ۲).

مرحله دو سلولی: اولین تقسیم سلولی ۲۰- ۱۵ دقیقه پس از لقاح، باعث به وجود آمدن این مرحله شد. در این مرحله در قطب حیوانی شیاری در سلول ایجاد شد و بلاستودیسک به دو سلول بلاستومر متمایز گردید. در این وضعیت تخم ماهی بنی دارای دو سلول بلاستومر کروی و کاملاً شفاف است (شکل ۳). این مرحله سرآغاز تقسیمات سلولی بعدی می‌باشد.

مرحله چهار سلولی: این مرحله از دومین تقسیم شکافت سلولی (Cleavage) پدید آمد. شکاف تقسیم دوم عمود بر اولین شکاف تقسیم است که باعث به وجود آمدن ۴ سلول بلاستومر در ۳۰ دقیقه پس از لقاح شده که در دو ردیف دوتایی قرار دارند (شکل ۴).

۱. ۵. مرحله مورولا: در پایان کلیواژ، توپی از سلول‌های توت فرنگی شکل تشکیل گردید. توده سلول‌های جنینی (Germ cell) به دلیل قرار گرفتن بلاستومرها در چند لایه بر روی یکدیگر، متورم و برآمده شده و به صورت گنبدی شکل در □ ۳۰: ۵ پس از لقاح مشاهده شد (شکل ۵).

۱. ۶. مرحله بلاستولای اولیه: برجستگی توده سلولی بلاستومر مورولا از زرده ایجاد شده، سپس سلول‌ها مسطح شده و گسترش یافتند. بلاستودرم ضخیم بوده و در نتیجه توسعه و تکوین جنینی، بین زرده و بلاستودرم در قطب حیوانی حفره‌ای به نام بلاستوکول (Blastocoel) به وجود آمد. سلول‌های جنینی به صورت لایه سلولی شفاف و بی‌رنگ بودند که در سطح زرده به شکل یک توده یا نیم کره تو خالی در □ ۴۰: ۷ ساعت پس از لقاح مشاهده شدند (شکل ۶).

۱. ۷. مرحله بلاستولای پیشرفته: در این مرحله با کاهش حجم بلاستوکول، از ارتفاع لایه جنینی در قطب حیوانی کاسته شده و به وسعت آن افزوده شد. توده سلول‌های جنینی به صورت یک غلاف سلولی توسعه یافته و به سمت بلاستوپور حرکت نمودند. این توده سلولی رونده " اپی بولی" (Epiboly) نامیده می‌شود. باید متذکر شد که به دلیل تقسیمات شکافت سلولی غیرهمزمان، توسعه بلاستودرم (پیشروی اپی‌بولی) به صورت غیر متقارن صورت گرفت که □ ۴۰: ۹ ساعت پس از لقاح مشاهده گردید (شکل ۷).

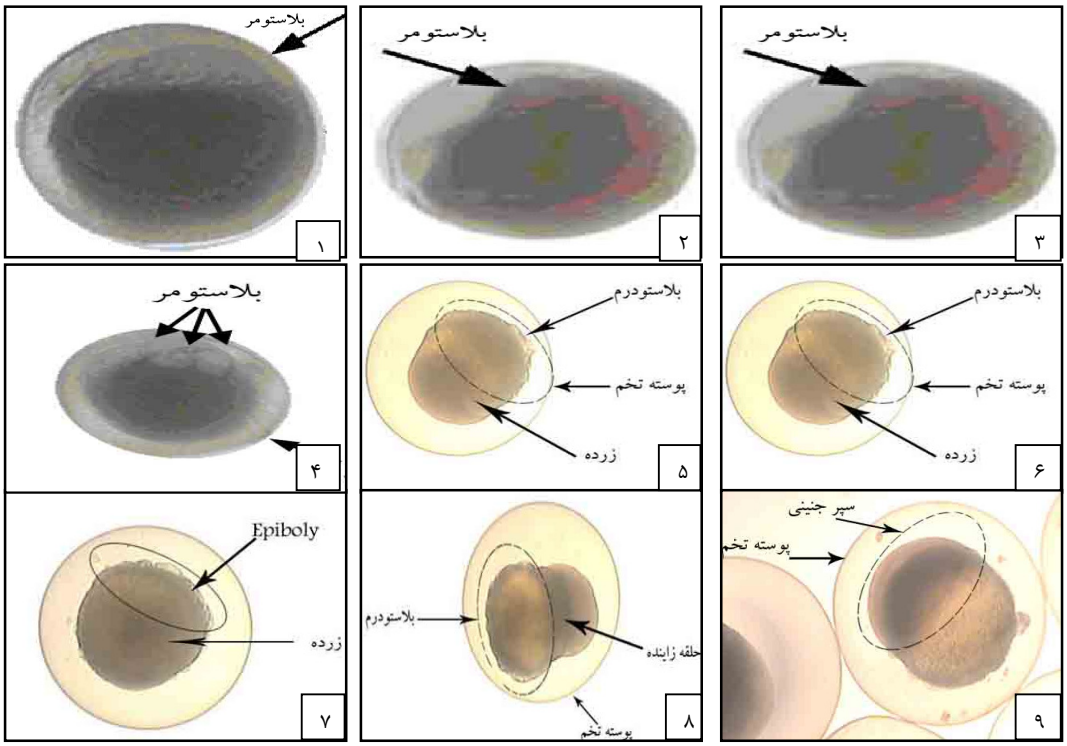
۱. ۸. مرحله گاسترولای اولیه: در این زمان سلول‌های بخش تیره‌تر، در محدوده سیتوپلاسم و زرده در خود برمی‌گردند. این علائم آغاز گاسترولاسیون است. در خود برگشتن سلول‌ها " امبولی" (Emboly) نامیده می‌شود. بنابراین یک حلقه برجسته مشخصی به نام حلقه زاینده (Germ ring) به وجود آمد. تنها بخشی که بر خود برگشتن سلول‌ها را به طور کاملاً مشخص نشان می‌دهد، ناحیه حلقه زاینده است که به وسیله بخش تیره صفحه بلاستودرم تشکیل شد. قطب جلویی بلاستودرم، ضخیم-تر از نواحی مجاور بوده که سپر جنینی (Embryonic shield) را به وجود می‌آورد. این وضعیت □ ۱۰: ۱۳ ساعت پس از لقاح مشاهده گردید (شکل ۸).

۱. ۹. مرحله نیمه‌گاسترولاسیون: در این مرحله توسعه غیر متقارن لایه جنینی در تخم ماهی بنی ادامه یافت. از ضخامت سپر جنینی کاسته شد و به صورت یک لایه نازک مشاهده گردید که □ ۳۰: ۱۶ ساعت پس از لقاح بوقوع پیوست. هاله‌ای در قطب حیوانی سلول و سمت مخالف زرده را فرا گرفت. همچنین به تدریج از ناحیه زرده (در قطب مخالف بلاستودرم) کاسته شد و به سمت داخل بلاستومر خوردگی پیدا کرده تا جایی که زرده از حالت مدور خارج شده و تقریباً به شکل نیم-دایره در آمد. این مرحله پایان گاسترولاسیون و آغاز اندام‌زایی در ماهی بنی است (شکل ۹).

در شکل ۱ مراحل توسعه و تکوین جنینی در ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) از تخمک تا ابتدای اندام-

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

زایی نشان داده شده است. مهم‌ترین رویدادهای توسعه و تکوین جنینی تا گاسترولاسیون در جدول ۱ ارائه شده است.



شکل۱: مراحل توسعه و تکوین جنینی در ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) از تخمک تا ابتدای اندام‌زایی (با مقیاس ۲۰ برابر) ۱: تخمک ۲: تخم لقاح یافته ۳: دو سلولی ۴: چهار سلولی ۵: مرحله مورولا ۶: بلاستولای اولیه ۷: بلاستولای پیشرفته۸: گاسترولای اولیه ۹: نیمه گاسترولاسیون

جدول۱ : مراحل توسعه و تکوین جنینی ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) تا ابتدای اندام‌زایی با دمای آب ۲۲ درجه سانتی گراد و در شرایط کنترل شده مرکز تکثیر مصنوعی

مراحل تکامل جنینی	زمان لقاح (دقیقه: ساعت)	میانگین (±SD) قطر تخم (میلی‌متر)	میانگین (±SD) قطر بلاستومر (میلی‌متر)	میانگین (±SD) قطر کیسه زرده (میلی‌متر)
تخم ریزی	۰ :۰۰	۱/۶۵±۰/۱۰۱	-	-
دو سلولی	۲۰ -۱۵	۱/۷۵±۰/۱۰۲	۱/۱۳±۰/۱۰۱	۱/۴۸±۰/۰۵۷
چهارسلولی	۰ :۳۰	۱/۹۸ ±۰/۱۰۶	۱/۲۴±۰/۱۱۴	۱/۴۵±۰/۰۷۸
مورولا	۳ :۳۰	۲/۴۴±۰/۱۷۸	۱/۱۸±۰/۱۲۴	۱/۴۲±۰/۰۸
بلاستولای اولیه	۷ :۴۰	۲/۵۱±۰/۰۵۶	۱/۴۸±۰/۰۸۷	۱/۲۵±۰/۰۹۹

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

ادامه جدول۱:

بلاستولای پیشرفته	□۴۰: ۹	۲/۵۳±۰/۰۵۷	۱/۱۵۶±۰/۰۸۶	۱/۲۴±۰/۱۰۲
گاسترولای اولیه	□۱۰: ۱۳	۲/۵۶±۰/۰۳۹	۱/۵۳±۰/۰۷۶	۱/۱۸±۰/۰۶۱
گاسترولای پیشرفته	□۳۰: ۱۶	۲/۵۷±۰/۰۵۶	۱/۵۶±۰/۱۳۳	۱/۵۳±۰/۰۷۶

دوره دوم: اندام‌زایی (ارگانوژنز)

مرحله نورولا: اولین مرحله از مراحل ارگانوژنز بوده و با پایان گاسترولاسیون، تخم ماهی بنی ۱۹ ساعت پس از لقاح وارد این مرحله شد. اولین مشاهده در این مرحله شکل‌گیری طناب عصبی (Neural tube) بود که در اکتودرم پشتی صورت پذیرفت. توسعه لایه جنینی ادامه یافت و قسمت اعظم زرده را پوشاند. همچنین بلاستوپور (فضایی بدون پوشش در سطح زرده و در قطب گیاهی تخم ماهیان استخوانی) نیز شکل گرفت. در طی رشد جنین ماهی بنی و با گذشت زمان، در قسمت نزدیک به بلاستوپور (قطب گیاهی) دم و در طرف دیگر (قطب حیوانی) سر بوجود آمد.

مرحله بسته شدن بلاستوپور: با بسته شدن بلاستوپور، مراحل اپی‌بولی به اتمام رسید. لایه جنینی کاملاً توسعه یافت، به گونه‌ای که اطراف زرده را به صورت غلافی احاطه کرده و سوراخ بلاستوپور را مسدود نمود. قطر تخم در این مرحله ۲/۶±۰/۰۹ میلی‌متر بود و □۱۵: ۲۱ ساعت پس از لقاح وارد این مرحله شد.

مرحله شکل‌گیری بندهای بدن: □۳۰: ۲۳ ساعت پس از لقاح، بندها (Somite) بوجود آورنده ارگان‌هایی همچون ستون مهره‌ها، دستگاه دفع، گوارش و سایر دستگاه‌های بدن است. بندها در ناحیه شکمی به صورت برجستگی‌های کوچکی قابل مشاهده بود. در این مرحله با افزایش رشد، طول جنین نسبت به مرحله قبل افزایش یافت.

مرحله ظهور قلب: موقعیت قلب دقیقاً در زیر سر و در قسمت گلو می‌باشد. در این زمان قلب کوچک و بی‌حرکت بود و طپشی در آن دیده نشد. میانگین (±SD) طول جنین ۴/۴۳±۰/۲۳۴ میلی‌متر بوده و□۰۵: ۳۶ ساعت پس از لقاح وارد این مرحله شد.

مرحله شکل‌گیری کره چشم: کره چشم به صورت دو حباب بیضی شکل شفاف فاقد عدسی مشخص گردید. در این زمان قلب شروع به طپش کرده و فعالیت حیاتی خود را در□۲۰: ۳۷ ساعت پس از لقاح آغاز نمود.

آغاز دوره روییدن دم: حدود ۵۰ ساعت پس از لقاح جوانه دم جنین شروع به روییدن نمود. دم جنین بر خلاف جهت بدن جنین رشد نموده، به گونه‌ای که گرداگرد کیسه زرده را فرا گرفت.

مرحله ظهور رنگدانه‌ها: در این مرحله رنگدانه‌هایی به رنگ مشکی و کوچک به صورت پراکنده در سطح بدن جنین مشاهده شد که شامل ملانوفورهای ستاره‌ای شکل بودند. چشم توسعه یافته و دارای لنز دایره‌ای شکل بود. ناحیه سر جنین نیز توسعه یافت. جنین تقریباً تمام فضای پری ویتلین را اشغال کرده و ۷۳ ساعت پس از لقاح به این مرحله رسید.

دوره سوم: تفریخ

مرحله تفریخ اولیه: ارتباط بین بدن با کیسه زرده به حداقل رسید. کیسه زرده تدریجاً کاهش یافته و جنین رشد نمود. جنین با تحرکات و فشارهایی که به پوسته تخم وارد نموده، تخم را از حالت کاملاً کروی خارج کرده و تقریباً بیضی شکل شد. پوسته تخم پاره شده و لاروها با توانایی محدود در شنا خارج گردید. این مرحله شروع تفریخ تخم‌های ماهی بنی بوده و حدود ۱۰ درصد از تخم‌ها □۱۰: ۷۹ ساعت پس از لقاح تفریخ شدند.

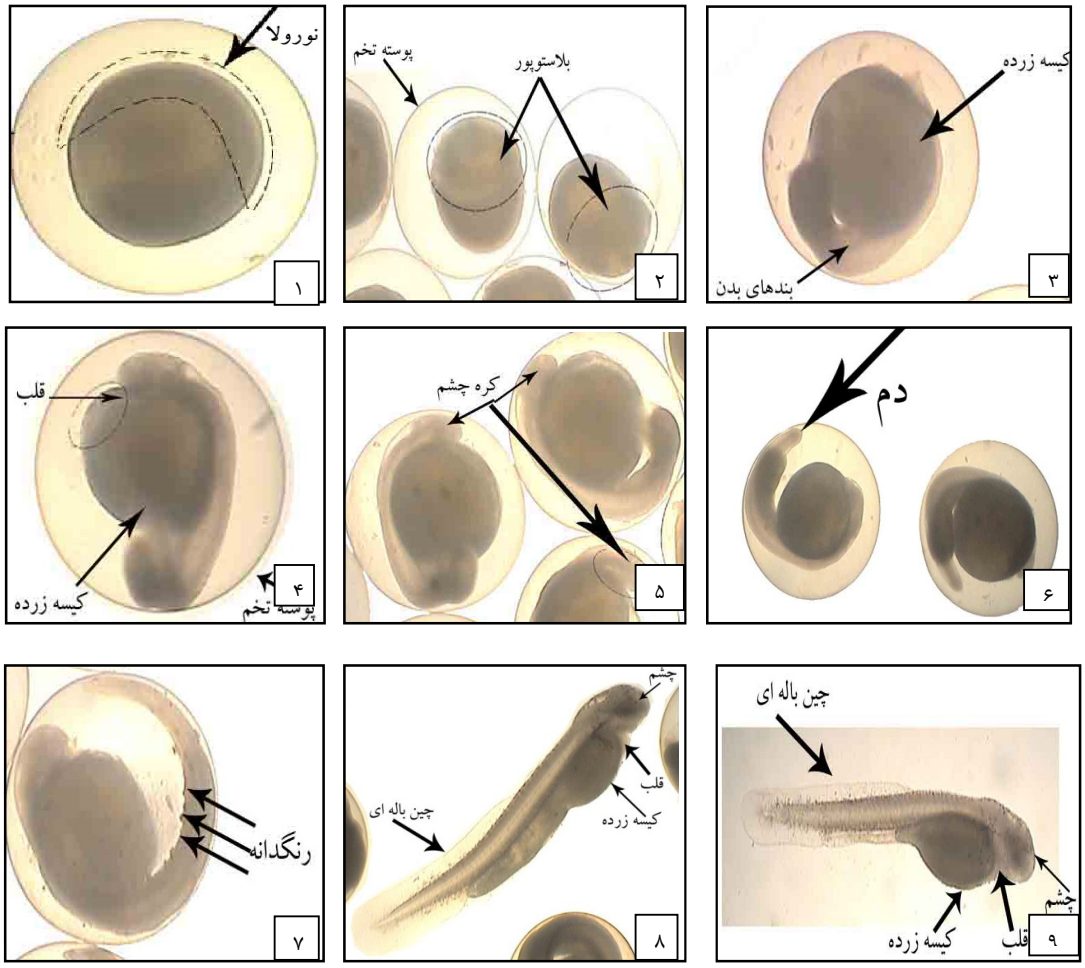
مرحله تفریخ نهایی تخم: ۲-۱/۵ ساعت قبل از تفریخ، جنین حرکات انقباضی متناوب و منظمی را به نمایش گذاشت. بدین ترتیب جنین پوسته را شکسته و لاروها ابتدا از دم خارج شدند. دستگاه گوارش لاروهای تازه تفریخ شده کامل نشده، بنابراین توانایی گرفتن غذای خارجی را نداشته و تنها منبع غذایی و

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

تأمین انرژی از کیسه زرده بود. □۱۰: ۸۴ ساعت پس از لقاح، تفریخ نهایی رخ داد.

در شکل ۲ مراحل تکامل توسعه و تکوین جنینی از ابتدای اندام‌زایی تا تفریخ نهایی ارائه شده است.

در جدول ۲ مراحل توسعه و تکوین جنینی (از اندام‌زایی تا تفریخ نهایی) ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) نمایش داده شده است.



شکل ۲: مراحل توسعه و تکوین جنینی در ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) از ابتدای اندام‌زایی تا تفریخ نهایی (با مقیاس بزرگی ۲۰ برابر) ۱: مرحله نورولا ۲: مرحله بسته شدن بلاستوپور ۳: مرحله شکل‌گیری بندهای بدن ۴: مرحله ظهور قلب ۵: مرحله شکل‌گیری کره چشم ۶: مرحله روییدن دم۷: مرحله ظهور رنگدانه‌ها ۸: مرحله تفریخ اولیه ۹: مرحله تفریخ نهایی

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

مهم‌ترین رویدادهای مراحل اولیه تکامل جنینی (از اندام‌زایی تا تفریخ نهایی) ماهی بنی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول۲: مراحل توسعه و تکوین جنینی در ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) از ابتدای اندام‌زایی تا تفریخ نهایی با دمای آب ۲۲ درجه سانتی گراد و در شرایط کنترل شده مرکز تکثیر مصنوعی (با مقیاس بزرگی ۲۰ برابر)

مراحل تکامل جنینی	زمان پس از لقاح (دقیقه: ساعت)	میانگین (±SD) قطر تخم (میلی‌متر)	میانگین (±SD) طول جنین (میلی‌متر)	میانگین (±SD) ضخامت جنین (میلی‌متر)
نورولا	۰۵ :۱۹	۲/۶±۰/۰۶۲	۲/۷۵±۰/۴۶۰	-
بسته شدن بلاستوپور	۱۵ :۲۱	۲/۶±۰/۰۹	-	-
شکل گیری بندهای بدن	۳۰ :۲۳	۲/۶۳±۰/۰۲۸	۳/۹۷±۰/۳۴۳	۰/۴۷±۰/۰۴۱
ظهور قلب	۰۵ :۳۶	۲/۶۵±۰/۰۵۸	۴/۴۳±۰/۲۳۴	۰/۴۷±۰/۰۴۶
شکل گیری کره چشم	۲۰ :۳۷	۲/۶۷±۰/۰۶۲	۴/۵±۰/۱۷۷	۰/۵۲±۰/۰۳۷
ظهور رنگدانه‌ها	۰۵ :۷۳	۲/۷±۰/۰۲۱	۵±۰/۲۸۱	۰/۵۳±۰/۰۲۷
تفریخ اولیه	۱۰ :۷۹	۲/۷۲±۰/۰۱۹	۵±۰/۳۱۲	۰/۵۴±۰/۰۳۴
تفریخ نهایی	۱۰ :۸۴	-	۵/۲۹±۰/۱۲۱	۰/۵۴±۰/۰۹۷

بحث

اگرچه دگردیسی حقیقی برای ماهیان توصیف نشده است، سه دوره تفریخ، لارو و پست‌لارو برای مشخص نمودن مراحل مختلف تکامل استفاده می‌شود (Boglinoe *et al.*, 1992). پس از آغاز تقسیمات، به دلیل ضخیم و نیمه‌شفاف شدن تخم، مشاهده مراحل تکامل اندکی دشوار است (Kovac, 2000). تغییرات ساختاری در محدوده‌های تکامل جنینی، لاروی و پست لاروی به ترتیب بر اثر آغاز شکاف سلولی یا اپی‌بولی و اندام‌زایی قابل تفکیک است (Kovac, 2000; Carlos *et al.*, 2002).

اولین تقسیم بسته به کیفیت تخم و گونه ماهیان متنوع است (Kjorsvik, 2003). در ماهی بنی، شکافت سلولی سریع بوده و اولین تقسیم، ۲۰-۱۵ دقیقه پس از لقاح انجام شد. لایه اپیدرم از بین رفته و با توسعه مراحل تکامل، محو شد (Falk-Peterson, 2005). ۱۰ دقیقه بعد، دومین تقسیم انجام شد و ۴ سلول مشاهده گردید که ماهی حمری (*Barbus luteus*) مشابهت زمانی دارد (Alhazzaa & Hossein, 2003).

مرحله مورولا در ماهی بنی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد پس از ۳۰: ۳ دقیقه ثبت شد. تخم ماهی حمری (*Barbus luteus*) در دما و زمان مشابه وارد این مرحله گردید (Alhazzaa & Hossein, 2003). تخم ماهی *Dentex dentex* (از شانک-ماهیان) در دمای ۱۸/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵ ساعت و ۱۵ دقیقه پس از لقاح وارد این مرحله شد (Firat *et al.*, 2003).

مرحله بلاستولاسیون در این گونه سریع اتفاق می‌افتد (۴۰: ۷ ساعت پس از لقاح). Falk-Peterson در سال ۲۰۰۵ بیان نمود که بلاستولا پس از چند ساعت یا نهایتاً ۲ روز بسته به گونه و دمای انکوباسیون شکل می‌گیرد. تخم ماهی بنی، پس از ۷ ساعت و ۴۰ دقیقه و ماهی حمری (*B.luteus*) در دمای ۲۲-

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

۲۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ ساعت پس از لقاح وارد این مرحله می‌شود (Alhazzaa & Hossein, 2003).

بنابر نظر Arezo و همکاران (۲۰۰۵)، گاسترولاسیون در ماهیان استخوانی بطور مورفولوژیکی، با حضور حلقه زاینده که شامل دو لایه سلول با نام‌های اپی‌بلاست (لایه خارجی) و هیپوبلاست (لایه داخلی) است، شناخته می‌شود. این دو لایه فعالانه در تنظیم فشار اسمزی و انتقال یون در ابتدای گاسترولاسیون نقش دارند (Swanson, 1996). ماهی بنی پس از ۱۰: ۱۳ ساعت وارد این مرحله شد. تخم ماهی حمری (*B.luteus*) در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد پس از ۱۳ ساعت و ماهی *Dentex dentex* در همین میانگین دمایی ۱۵: ۵ ساعت پس از لقاح وارد این مرحله می‌شود (Firat *et al.*, 2003).

در مرحله ارگانوژنز پس از بسته شدن بلاستوپور، بدن جنین شکل گرفته و جوانه دم در ناحیه پشتی توده زرده پدیدار می-شود. ۱۵: ۲۱ ساعت پس از لقاح، بلاستوپور در ماهی بنی بسته شد، در حالی که ماهی حمری (*B.luteus*) پس از ۲۶ ساعت وارد این مرحله می‌شود (Alhazzaa & Hossein, 2003). نوتوکورد، سر و چشم نیز مشاهده می‌شود.

در ماهی بنی، ۳۷ ساعت پس از لقاح، قلب شروع به طپش نموده و خون در سرتاسر بدن به گردش در آمد. خون از آئورت پشتی جاری شده و در ناحیه پشتی کیسه زرده، شریان دمی را ساخته و از آنجا به سیاهرگ دمی وارد گردید. سپس به سمت ناحیه درونی جنین رفته و به دو سیاهرگ اصلی پشتی و سیاهرگ زیر روده‌ای تفکیک شده، وارد شد (Kovac, 2005).

ظهور رنگدانه‌ها در ماهی با متابولیسم، هورمون‌های ویژه و فاکتورهای رشد (Christensen and Korsgaard, 1999; Solbakken *et al.*, 1999)، مواد مغذی و فاکتورهای غذایی (Bolker &Hill, 2000; Diler & Dilek, 2002)، ژن‌ها و عوامل متقابل ژنتیک و محیط زیست، مانند زیستگاه (Urho, 2002) ارتباط تنگاتنگی دارد. رنگدانه‌ها در ماهی بنی ۷۱ ساعت پس از لقاح به رنگ مشکی و کوچک به صورت پراکنده در سطح بدن جنین مشاهده گردید که شامل ملانوفورهای ستاره‌ای شکل بودند.

دوره انکوباسیون تخم‌ها به طور مستقیم به پارامترهای کیفی آب نظیر شوری و دما وابسته است (Kuo *et al.*, 1973; Liao, 1975). در مطالعه حاضر، تخم ماهی بنی در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، پس از ۸۴ ساعت تفریخ شدند، در صورتی که تفریخ نهایی ماهی حمری ۷۴ ساعت (Alhazzaa & Hossein, 2003) و در ماهی گطان (*B.xanthopterus*) ۴۷-۴۶ ساعت پس از لقاح در دمای ۲۳/۵-۲۲/۵ درجه سانتی‌گراد به وقوع پیوست (مرتضوی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین تفریخ نهایی ماهی *Dentex dentex* در دمای ۱۸/۵ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ساعت پس از لقاح ثبت گردید (Firat *et al.*, 2003).

به طور کلی، اندازه زرده در ماهیان استخوانی، به صورت یک الگوی مشابه است و به آهستگی کاهش می‌یابد (Liew *et al.*, 2006). اندازه زرده از استراتژی‌های مهم تولید مثل و بقاء در ماهیان می‌باشد، به گونه‌ای که هر چه زرده تخم بیشتر باشد، نیاز لارو به تغذیه از محیط خارج به تعویق می‌افتد (Blaxter, 1988). تخلیه کیسه زرده ممکن است با برخی از پیشرفت‌های عمده در سیستم تنفسی، توانایی شناوری و فعالیت شنا مرتبط باشد (Alhazza, 2005). میانگین (±SD) حجم کیسه زرده در زمان تفریخ در ماهی بنی ۰/۲۶۴±۰/۰۳۴۱ میلی‌متر مکعب می‌باشد. در ماهی زبرا (*Danio rerio*) ۰/۱۴۹۷ میلی‌متر مکعب (Schmidt & Starck, 2004)، در گونه *Pagrus pagrus* با میانگین (±SD) ۰/۳۱۷۸±۰/۸۵ میلی‌متر مکعب (Mihelakakis *et al.*, 2001)، در شانک زردباله (*Acanthopagrus latus*) ۰/۱۸۵۶ میلی‌متر مکعب (سروی غیاث‌آبادی، ۱۳۸۶) و در گونه *Dentex dentex* با میانگین (±SD) ۰/۲۴۷۶±۰/۱۰۲ میلی‌متر مکعب گزارش شده است (Firat *et al.*, 2003).

بررسی توسعه و تکوین جنینی و لاروی در ماهی بنی و دیگر ماهیان در شرایط کنترل شده، می‌تواند به تشخیص صحیح نیازهای زیستی و محیطی در روند توسعه یاری نماید که این موضوع در مدیریت ذخایر ماهیان بومی حائز اهمیت می‌باشد.

منابع

بهزادی، ص.، ۱۳۷۰. مطالعه مراحل رشد و نموجنینی ماهی سفید (*Rutilus frisi kutum*). مرکز تحقیقات استان گیلان، صفحات ۱، ۲ و ۲۱.

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

پرندآور، ح.، ۱۳۷۸. مراحل رشد و نمو جنینی ماهی ازون برون (*Acipencer stellatus*). انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان –رشت، ۱۱صفحه.

شفیع‌زاده، س. ش.، ۱۳۷۲. مطالعه مراحل رشد و نمو جنینی ماهی قره برون (*Acipencer persicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، صفحات ۱-۲.

سروی غیاث‌آبادی، ا.، ۱۳۸۶. مطالعه مراحل تکامل جنینی ماهی شانک زردباله (*Acanthopterus latus*). پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، صفحات ۱۴-۴.

مرتضوی‌زاده، ع.؛ معاضدی، ج.؛ یونس زاده فشالمی، م. و جرفی، ا.، ۱۳۸۹. بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی گطان (*Barbus xanthopterus*). مجله علمی شیلات ایران، سال نوزدهم، شماره چهارم، صفحات ۱۴۲-۱۳۷.

نجف پور، ن.، ۱۳۷۵. گزارش نهایی پروژه شناسایی برخی از ماهیان آب شیرین خوزستان. موسسه تحقیقات شیلات ایران، صفحات ۹۶-۱.

نیک‌پی، م.، ۱۳۷۵. گزارش نهایی پروژه بررسی بیولوژیک ماهی شیربت (*Barbus grypus*) و ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*). موسسه تحقیقات شیلات ایران، صفحات ۱۰ -۱ و ۶۴-۵۲.

یزدی‌پور، ع. ا.، ۱۳۷۰. گزارش بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی بنی. مرکز تحقیقات شیلات استان خوزستان، صفحات ۲۸-۱.

Al Hazza, R. and Hussein, A., 2005. Larval development of Himri, *Barbus luteus* (Cyprinidae: Cypriniformes) reaed in the laboratory. Turkish Journal of Zoology, 30: 1-17.

Al Hazza, R. and Hussein, A., 2003. Initial observation in Himri (*Barbus luteus*, Heckel) propagation. Turkish journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 3: 41-45.

Arezo, M. J., Pereiro, L. and Berois, N., 2005. Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. Journal of Fish Biology, 66: 1357-1370.

Blaxter, J. H. S., 1988. Eggs and larvae. *In:* Hoar WS, Randall DJ (Eds.) Fish physiology. New York: Academic Press, v.11A, pp. 17-48.

Blaxter, J. H. S. and Hempel, G., 1966. Utilization of the yolk sac by herring larvae. Journal of Marine Biology, 46: 219-234.

Boglinoe, C., Bertolini, B., Russiello, M. and Cataudella, S., 1992. Embryonic and larval development of the thick-lipped mullet (*Chelon labrosus*) under controlled reproduction conditions. Aquaculture, 101: 349-359.

Bolker, J. A. and Hill, C. R., 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. Journal of Fish Biology, 56: 1029-1052.

Calta, M., 1997. Early development of Barbel (*Barbus barbus* L.) larvae. Turkish Journal of Zoology, 22: 17-22.

Carlos, A. M., Sanchez, M. C., Papp, G. S., Parra, A. D. and Ross, L. G., 2002. Observations on spawning, early development and growth of the puffer fish *Sphoeroides annulatus*. Journal of Aquaculture Tropical, 17: 59-66.

Cetta, C. M. and Capuzzo, J. M., 1982. Physiological and biochemical aspects of embryonic and larval development of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. Journal of Marine Biology, 71: 327-337.

Chen, Y. F., 2005. Induced ovulation and embryonic development of Ocellated puffer, *Takigugu ocellatus*. Journal of Applied Ichthyology, 21: 136-140.

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

Kuo, C. M., Shehadeh, Z. H. and Milison, K. K., 1973. A preliminary report on the development, growth and survival of laboratory reared larvae of the grey mullet, *Mugil cephalus* (L.). Journal of Fish Biology, 5: 459-470.

Liao, I. C., 1975. Experiments on the induced breeding of the grey mullet in Taiwan from 1963-1973. Aquaculture, 6: 31-58.

Liew, H. J., Ambak, M. A. and Abol-Munafi, A. B., 2006. Embryonic development of clownfish (*Amphiprion ocellaris*) under laboratory reared conditions. Journal of Sustainability Science and Management, 1: 64-73.

Mihelakakis, A., Yoshimatsu, T. and Tsolkas, C., 2001. Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. Aquaculture, 199: 333-352.

Moyle, P. B., Cech, J. J. J. R., 2004. Fishes: An introduction to ichthyology, 5th ed. Pearson, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ. 726 P.

Okan Kamaci, H., Saka, S. and Firat, K., 2005. The cleavage and embryonic phase of Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) eggs. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1-2: 205-207.

Reynalte-Tataje, D., Zaniboni-Fihol, E. and Muelbert, B., 2001. Stages of the embryonic development of the *Leporinus macrocephalus*. University of Federal of Santa Catarina, Santa Catarina Brasil. pp. 824 -826.

Schmidt, K. and Starck, M., 2004. Developmental variability during early embryonic development of Zebra fish (*Danio rerio*). Journal of Experimental Zoology, pp. 5-10.

Christensen, M. N. and Korsgaard, B., 1999. Protein metabolism, growth and pigmentation patterns during metamorphosis of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. Journal of Marine Biology, 237:225-241.

Diler, I. and Dilek, K., 2002. Significance of pigmentation and use in aquaculture. Turkish journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2: 97-99.

Firat, K., Saka, S. and Coban, D., 2003. The effect of light intensity on early life development of the common dentex (*Dentex dentex*) larvae. Aquaculture Research, 34: 1-6.

Falk-Petersen, I. B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. Fish Shellfish Immunology, 19: 397- 412.

Gorshkova, G. V., Protas, Y., Ben-Atia, S. and Gorshkov, S., 2002. Cytogenetic examination of early embryonic development in the white grouper *Epinephelus aeneus* (Pisces, Serranidae). Journal of Applied Ichthyology, 18: 29-34.

Kimmel, C., Ballard, W., Ullmann, B. and Schmillng, T., 1995. Zebrafish (*Danio rerio*) embryonic development. Oregon. Eugene, Hanover, Developmental Dynamics, 203: 205-310.

Kjorsvik, E., Hoehne-Reitan, K. and Reitan, K. I., 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 227: 9-20.

Kovac, V., 2000. Early development of *Zingel streber.* Journal of Marine Biology, 57: 1381-1403.

juveniles of laboratory-reared Ryukyu-ayu *Plecoglossus altivelis* ryukyuensis. Journal of Fish Sciences, 69: 323-330.

Urho, L., 2002. Characters of larvae-what are they? Folia Zoology, 51: 161-186.

Vallin, L. and Nissling, A., 1998. Cell morphology as an indicator of viability of cod eggs results from an experimental study. Fish Research, 38: 247-255

Solbakken, J. S., Norberg, B., Watanab, K. and Pittman, K., 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Environmental Biology of Fishes, 56: 53-65.

Swanson, C., 1996. Early development of milkfish: Effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth. Journal of Fish Biology, 48: 405-421.

Tachihara, K. and Kawaguchi, K., 2003. Morphological development of eggs, larvae and

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

Downloaded from isfj.ir at 12:16 +0330 on Wednesday December 27th 2017

The embryonic development and formation of Bunnei (*Barbus sharpeyi* Gunther, 1874)

Ahmadi, S. [(1)*]; Khodadadi, M. [(2)], Roomiani, L.[(3)] and Hakimi Mofrad, R. [(4)]

***sara_ahmadi_61@yahoo.com**

1,2,4- Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

3- Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Khouzestan, Iran

Received: May 2013 Accepted: November 2013

Key words: Bunnei, Embryonic development, Egg, incubation, *Mesopotamichthys sharpeyi*

Abstract

Understanding the embryogenesis of Bunni is a useful tool for finding the time and suitable environmental conditions for spawning, growth requirements and use of techniques to increase the growth rate and survival. The stages of embryonic development for Bunnei (*Barbus sharpeyi*) was investigated in 22°C. The reared brood stocks were spawned in captivity condition. The oocytes were spherical, brown and very adhesive. The cleavage was fast and the first division was recorded within 15-20 minutes after fertilization. The blastulation and gastrulation were investigated in 7:40 and 13:10 hours after fertilization with the yolk sac diameter of 1.18±0.061mm (Mean±SD), respectively. The organogenesis was started 21 hours after the fertilization, when the blastopore was closed and notochord was formed. The embryonic stages were continued by appearance the brain, the somites and the melanophores on the yolk sac. The heart was beaten and shown the blood circulation 65 hours after the fertilization. The head, tail and pectoral fins were moved frequently. The embryo reached to pre hatching and final hatching 79:10 and 84:10 hours after fertilization, respectively, and the embryo existed from corion with the length of about 5.29±0/121mm (Mean±SD).