

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- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهواز، گروه شیلات، اهواز، ایران

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

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۲ | تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۲

چکیده

در ک مراحل جنینی ماهی بنی، ابزار مفیدی برای یافتن زمان و شرایط محیطی مناسب تخم‌ریزی، احتیاجات رشد و استفاده از

تکنیکهای 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. مولدهای پرورشی در شرایط اسارت تخم‌ریزی

کردند. تخم‌ها کروی، نارنجی و بسیار چسبنده و فاقد گلbul چربی بودند. ظهور شکافت سلولی در این گونه سریع بوده و اولین تقسیم در

۲۰ دقیقه پس از لقاح مشاهده شد. بلاستولاسیون ۷:۴۰ و گاسترولاسیون ۱۳:۱۰ ساعت پس از لقاح با میانگین ($\pm SD$) قطر کیسه

زرده $1/18 \pm 0.06$ میلی‌متر ثبت گردید. اندام‌زایی ۲۱ ساعت پس از لقاح، زمانی که بلاستوپور بسته شده و نوتوكورد 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 می‌کردند. 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 $1/21 \pm 0.05$ میلی‌متر از پوسته خارج گردید.

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

*نویسنده مسئول

مقدمه

۱۹۸۸)، نقش شناخت خصوصیات مورفوژیولوژیک تخم از مرحله لقاح تا تغیریخ (دوره زمانی توسعه و تکوین جنینی، سایز سلولی و نقش اکسیژن و دما)، در ارزیابی توان تولید در آبزی پروری و بازسازی ذخایر این گونه ارزشمند، تاکتون 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 پرنداور (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 گورخرمایی (*Danio rerio*) را انجام دادند. Reynalte-Tataje و همکاران (۲۰۰۱) در بزرگی بروی گونه (Leporinus macrocephalus) تحقیق نمودند. Firat و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Okan Kamaci 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 دلگچمه‌ای (*Amphiprion ocellaris*) انجام دادند.

مطالعه مراحل توسعه و تکوین ماهی بنی، نه تنها دانش ما را در موردنحوه و ساختار تکامل در این گونه افزایش می‌دهد، بلکه زمانی که الگوهای طبیعی تکامل جنینی به دلایل مختلف ژنتیکی، محیطی 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 روش کار

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

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 مورفوژیکی 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 تأمین مواد غذایی توسط مادر (تفذیه 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 تغیریخ 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 تأمین 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) بهمنشهر، هورالعظیم و هور شادگان (نجف‌پور، ۱۳۷۵) گزارش شده است. بازاری‌سندی این ماهی و استفاده از روش‌ها و آلات صید مخرب، بقاء نسل این ماهی را شدیداً به مخاطره انداخته است (بیزدی‌پور، ۱۳۷۰).

امروزه ثابت شده که یکی از راههای شناخت شاخص‌های زیستی ماهیان به منظور دستیابی به الگوهای موفق آبزی پروری 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,

تکامل و خصوصیات مورفولوژی نمونه‌های زنده از میکروسکوپ نوری مدل Nikon Eclipse E400-UIII آستفاده شد. در آزمایشگاه، نمونه‌های ثبیت 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 1966; Capuzzo, 1982

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

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 $6/5$ میلی‌گرم در لیتر، $pH = 7-7/3$ ، دما با میانگین $(\pm SD)$ $22 \pm 0/3$ درجه سانتی‌گراد و $EC = 40/5 \pm 0/6$ میلی‌موس بر متر مکعب ثبت گردید. میانگین $(\pm SD)$ وزن مولдин ماده 1000 ± 127 گرم، میانگین $(\pm SD)$ طول سانتی‌متر، میانگین $(\pm SD)$ وزن و طول متوسط مولдин نر به ترتیب $41 \pm 4/5$ سانتی‌متر، میانگین $(\pm SD)$ وزن تخم‌های مولдин مور استفاده 690 ± 154 گرم و میانگین $(\pm SD)$ حجم تخم آب کشیده $321/6 \pm 7$ سی‌سی بود. بر اساس مشاهدات تکامل و تغییرات ظاهری، مراحل جنینی این گونه را می‌توان به سه دوره طبقه‌بندی نمود:

۳

۳ جفت مولد صورت گرفت. مولдин در حوضچه‌های سرامیکی با ابعاد $1/5 \times 0/5 \times 0/3$ 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 مولдин 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 تخریزی، از هورمون هیپوفیز کپور استفاده شد. بدین منظور، ابتدا مولдин در ماده ببهوش کننده گل میخک با غلظت ۱-۳ قسمت در میلیون قرار گرفته و تزریق در زیر باله سینه‌ای انجام شد. هورمون مورد استفاده برای مولдин 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 مولдин 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 مرتبًا محلول لقاح افزوده شد (برای تهیه محلول لقاح، ۳ گرم اوره و ۴ گرم نمک طعام در ۱ لیتر آب مخلوط می‌گردد).

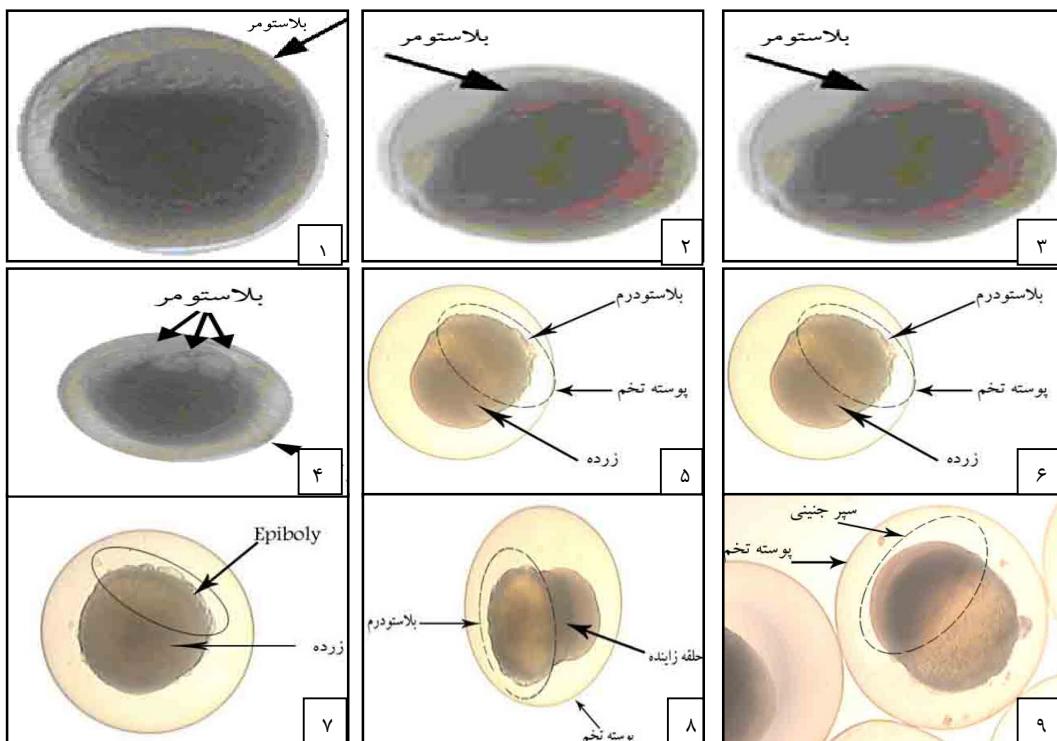
به علت چسیندگی زیاد تخم ماهی بنی، عملیات شستشوی تخمک‌ها و تعویض آب حدود ۱ ساعت طول کشید که باعث افزایش جذب آب و کاهش چسیندگی تخمک‌ها شد. سپس تخمک‌ها جهت از بین بردن چسیندگی با محلول تانن ($3/5$ گرم تانن $20+$ لیتر آب) به مدت ۲۰ ثانیه شستشو شده و این عمل چند بار تکرار شد (Al Hazza & Hussein, 2003).

تخمک‌های استحصال شده درون انکوباتورهای ویس قرار گرفتند. دبی آب $0/6$ لیتر بر دقیقه بوده و برای ضدغوفونی نمودن تخمک‌ها 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 تفريخ کامل هر 45 دقیقه یک بار به صورت سیفونی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها در شیشه‌های کوچک حاوی ماده ثبیت کننده (فرمالین ۲ درصد) قرار داده شدند. جهت ثبت واقعی، مراحل

جنینی به صورت لایه سلولی شفاف و بی‌رنگ بودند که در سطح زرده به شکل یک توده یا نیم کره تو خالی در ۴۰ ساعت پس از لقاح مشاهده شدند (شکل ۶).
 ۱.۷. مرحله بلاستولای پیشرفت: 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 غیرهمزن، توسعه بلاستودرم (پیشروی اپی بولی) به صورت غیر متقارن صورت گرفت که ۴۰ 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 برپمی‌گردند. این علائم آغاز گاسترولاسیون است در خود برگشتن سلول‌ها "امبولی" (Emboly) نامیده می‌شود. بنابراین یک حلقه بر جسته 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، ضخیم‌تر از نواحی مجاور بوده که سپر جنینی (Embryonic shield) را به وجود می‌آورد. این وضعیت ۱۰ 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 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 خورده‌گی پیدا کرده تا جایی که زرده از حالت مدور خارج شده و تقریباً به شکل نیمه‌دایره در آمد. این مرحله پایان گاسترولاسیون و آغاز اندامزایی در شکل ۱ مراحل توسعه و تکوین جنینی در ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*)

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 گلوبول چربی و دارای توده زرده بود. تعداد تخم‌ها در حدود ۴۵۰ عدد در هر گرم تخم و میانگین ($\pm SD$) اندازه تخمک $1/57 \pm 0.102$ میلی‌متر بدست آمد. تخم این ماهی در زیر استریومیکروسکوپ کروی بوده و در سطح آن میکروبیل به صورت برجسته و نسبتاً بزرگ مشاهده شد (شکل ۱).
 مرحله تخم لقاح‌بافته: 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 ۲۰-۲۵ دقیقه پس از لقاح، باعث به وجود آمدن این مرحله شد. در این مرحله در قطب حیوانی شیاری در سلول ایجاد شد و بلاستوپیسک 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، توبی 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 گنبده شکل در ۳۰ ساعت پس از لقاح مشاهده شد (شکل ۵).
 ۱.۶. مرحله بلاستولای اولیه: بر جستگی توده سلولی بلاستومر مورولا از زرده ایجاد شده، سپس سلول‌ها مسطح شده و گسترش یافته‌ند. 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

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



شکل ۱: 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 سلوی ۴: چهار سلوی ۵: مرحله مورو ۶: بلاستولای اولیه ۷: بلاستولای پیشرفته ۸: گاسترولای اولیه ۹: نیمه گاسترولاکسیون

جدول ۱: 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 (دقیقه: ساعت)	زمان لقاح (دقیقه: ساعت)	میانگین (±SD) قطر تخم (میلی‌متر)	میانگین (±SD) قطر بلاستومر (میلی‌متر)	میانگین (±SD) قطر کیسه زردہ (میلی‌متر)
تحم ریزی	-	-	-	-
دو سلوی	۱۵-۲۰ □	۱/۶۵±۰/۱۰۱	۱/۱۳±۰/۱۰۱	۱/۷۵±۰/۱۰۲
چهار سلوی	۰:۳۰ □	۱/۹۸±۰/۱۰۶	۱/۲۴±۰/۱۱۴	۱/۴۵±۰/۰۷۸
مورو	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

ادامه جدول ۱:

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

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 فعلیت حیاتی خود را در ۳۷:۲۰ 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 گردآگرد 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: تغذیه

مرحله تغذیه اولیه: ارتباط بین بدن با کیسه زرده به حداقل رسید. کیسه زرده تدریجی 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 تغذیه تخمهای ماهی بنی بوده و حدود ۱۰ درصد از تخمهای ۱۰:۷۹ ساعت پس از لقاح تغذیه شدند.

مرحله تغذیه نهایی تخم: ۱/۵-۲ ساعت قبل از تغذیه، 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 تغذیه شده کامل نشده، بنابراین توانایی گرفتن غذای خارجی را نداشته و تنها منبع غذایی و

دوره دوم: اندام‌زایی (ارگانوژن)

مرحله نوروولا: اولین مرحله از مراحل ارگانوژن 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 آکتوورم 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 ۲/۶±۰/۰۹ بلاستوپور را مسدود نمود. قطر تخم در این مرحله ۹ میلی‌متر بود و ۱۵:۲۱ ساعت پس از لقاح وارد این مرحله شد.

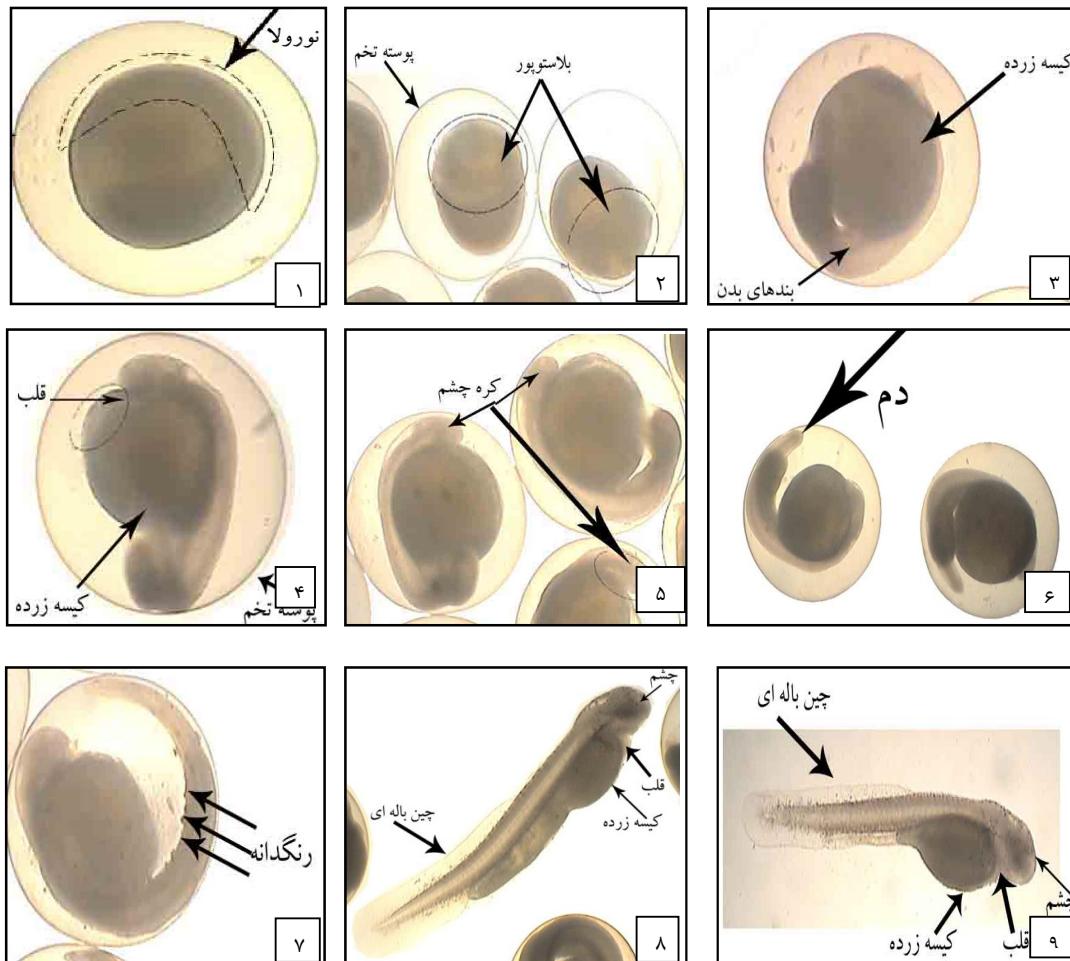
مرحله شکل‌گیری بندهای بدن: ۲۳:۳۰ ساعت پس از لقاح، بندها (Somite) بوجود آورنده ارگان‌هایی همچون ستون مهره‌ها، دستگاه دفع، گوارش و سایر دستگاه‌های بدن است. بندها در ناحیه شکمی به صورت برجستگی‌های کوچکی قابل مشاهده بود. در این مرحله با افزایش رشد، طول جنین نسبت به مرحله قبل افزایش یافت.

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

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

تأمین انرژی از کیسه زرد بود. □ 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.



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 شکل گیری بندهای بدن ۴: مرحله ظهور قلب ۵: مرحله کره چشم ۶: مرحله روییدن دم ۷: مرحله ظهور رنگدانه‌ها ۸: مرحله تفریخ اولیه ۹: مرحله تفریخ نهایی

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

جدول ۲: مراحل توسعه و تکوین جنینی در ماهی بنی (*Mesopotamichthys sharpeyi*) از ابتدای اندامزایی تا تغیرخ 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)	تخم (میلی‌متر)	طول جنین (میلی‌متر)	میانگین (±SD) ضخامت جنین (میلی‌متر)	میانگین (±SD) میانگین (±SD)
نوروولا	۱۹ :: ۵ □	۲/۶۷±۰/۰۶۲	۲/۷۵±۰/۴۶۰	-	-
بسته شدن بلاستوپور	۲۱ : ۱۵ □	۲/۶±۰/۰۹	-	-	-
شکل گیری بندهای بدن	۲۳ : ۳۰ □	۲/۶۳±۰/۰۲۸	۳/۹۷±۰/۳۴۳	۰/۴۷±۰/۰۴۱	-
ظهور قلب	۳۶ :: ۰۸ □	۲/۶۵±۰/۰۵۸	۴/۴۳±۰/۲۳۴	۰/۴۷±۰/۰۴۶	-
شکل گیری کره چشم	۳۷ : ۲۰ □	۲/۶۷±۰/۰۶۲	۴/۵±۰/۱۷۷	۰/۵۲±۰/۰۳۷	-
ظهور رنگدانه‌ها	۷۳ :: ۰۵ □	۲/۷±۰/۰۲۱	۵±۰/۲۸۱	۰/۵۳±۰/۰۲۷	-
تغیرخ اولیه	۷۹ : ۱۰ □	۲/۷۲±۰/۰۱۹	۵±۰/۳۱۲	۰/۵۴±۰/۰۳۴	-
تغیرخ نهایی	۸۴ : ۱۰ □	-	۵/۲۹±۰/۱۲۱	۰/۵۴±۰/۰۹۷	-

بحث

۴ سلول مشاهده گردید که ماهی حمری (*Barbus luteus*) مشابهت زمانی دارد (Alhazzaa & Hossein, 2003). مرحله موروولا در ماهی بنی در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد پس از ۳۰ دقیقه ثبت شد. تخم ماهی حمری (*Barbus luteus*) در دما و زمان مشابه وارد این مرحله گردید (Alhazzaa & Kovac, 2000). تخم ماهی *Dentex dentex* (از شانک-ماهیان) در دمای ۱۸/۵ درجه سانتی گراد، ۵ ساعت و ۱۵ دقیقه پس از لقاح وارد این مرحله شد (Firat et al., 2003). مرحله بلاستولاسیون در این گونه سریع اتفاق می‌افتد (۰:۴۰-۷ 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 ۲۲-۲۶ درجه سانتی گراد پس از لقاح اتفاق می‌افتد (Falk-Peterson et al., 2005).

اگرچه دگردیسی حقیقی برای ماهیان توصیف نشده است، سه دوره تغیرخ، 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، ۱۵-۲۰ دقیقه پس از لقاح انجام شد. لایه اپیدرم از بین رفت و با توسعه مراحل تکامل، محوا شد (Peterson, 2005).

۱۹۷۵). 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, 2003-۴۷) (B.xanthopterus) و در ماهی گقطان (Dentex dentex) در دمای ۲۲/۵-۲۳/۵ درجه سانتی گراد ۴۶ ساعت پس از لقاح در دمای ۱۸/۵ درجه سانتی گراد به وقوع پیوست (مرتفوی زاده و همکاران، ۱۳۸۹) همچنین تفریخ نهایی ماهی Dentex dentex در دمای ۱۸/۵ درجه Firat et al., 2003) سانتی گراد، ۵۰ ساعت پس از لقاح ثبت گردید.

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 (Alhazzaa, 2005). میانگین ($\pm SD$) حجم کیسه زرده در زمان تفریخ در ماهی بنی 0.0341 ± 0.0264 میلی‌متر مکعب می‌باشد. در ماهی زبرا (Danio rerio) 0.01497 ± 0.00000 میلی‌متر مکعب (Schmidt & Starck, 2004) در گونه Pagrus pagrus با میانگین 0.03178 ± 0.0085 میلی‌متر مکعب (Mihelakakis et al., 2001) (Acanthopagrus latus) 0.01856 ± 0.00000 میلی‌متر مکعب (سروی غیاث‌آبادی، ۱۳۸۶) و در گونه Dentex dentex با میانگین ($\pm SD$) 0.0102 ± 0.02476 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 نمو جنینی ماهی سفید (Rutilus frisi kutum). مرکز تحقیقات استان گیلان، صفحات ۱، ۲ و ۲۱.

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

بنابر نظر Arezo و همکاران (۲۰۰۵)، گاسترولاسیون در ماهیان استخوانی بطور مورفو‌لوزیکی، با حضور حلقه زاینده که شامل دو لایه سلول با نامهای اپی‌پلاست (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 ۱۳ ساعت وارد این مرحله شد. تخم ماهی حمری (B.luteus) در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی گراد پس از ۱۳ ساعت و ماهی Dentex dentex در همین میانگین دمای ۱۵ Firat et al., 2003) ساعت پس از لقاح وارد این مرحله می‌شود.

در مرحله ارگانوژنر پس از بسته شدن بلاستوپور، بدن جنین شکل گرفته و جوانه دم در ناحیه پشتی توده زرده پدیدار می‌شود. 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). نوتوكورد، سر و چشم نیز مشاهده می‌شود.

در ماهی بنی، ۳۷ ساعت پس از لقاح، قلب شروع به طیش 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 رفت و به دو سیاهرگ اصلی پشتی و سیاهرگ زیر روده‌ای تفکیک شده، وارد شد (Kovac, 2005). ظهور رنگدانه‌ها در ماهی با متاپولیسم، هورمون‌های ویژه و Christensen and Korsgaard, 1999؛ Solbakken et al., 1999 (Solbakken et al., 1999)، مواد مغذی و فاکتورهای غذایی (Bolker & Hill, 2000; Diler & Dilek, 2002) 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,

- 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.
- پرندآور، ح.، ۱۳۷۸. مراحل رشد و نمو جنینی ماهی ازون برون (*Acipencer stellatus*). انتیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان -رشت، ۱۱ صفحه.
- شفیع‌زاده، س. ش.، ۱۳۷۲. مطالعه مراحل رشد و نمو جنینی ماهی قره برون (*Acipencer persicus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، صفحات ۲-۱۱.
- سروی غیاث‌آبادی، ا.، ۱۳۸۶. مطالعه مراحل تکامل جنینی ماهی شانک زردباله (*Acanthopterus latus*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات خوزستان، صفحات ۴-۱۴.
- مرتضوی‌زاده، ع.؛ معاضدی، ج.؛ یونس زاده فشالی، م. و جرفی، ا.، ۱۳۸۹. بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی گطان (*Barbus xanthopterus*) نوزدهم، شماره چهارم، صفحات ۱۳۷-۱۴۲.
- نجف پور، ن.، ۱۳۷۵. گزارش نهایی پژوهه شناسایی برخی از ماهیان آب شیرین خوزستان. موسسه تحقیقات شیلات ایران، صفحات ۱-۹۶.
- نیک‌پی، م.، ۱۳۷۵. گزارش نهایی پژوهه بررسی بیولوژیک ماهی شیربت (*Barbus grypus*) و ماهی بنی (*Barbus sharpei*). موسسه تحقیقات شیلات ایران، صفحات ۱۰-۱۵ و ۵۲-۶۴.
- یزدی‌پور، ع. ا.، ۱۳۷۰. گزارش بیوتکنیک تکثیر مصنوعی ماهی بنی. مرکز تحقیقات شیلات استان خوزستان، صفحات ۱-۲۸.
- Al Hazza, R. and Hussein, A., 2005.** Larval development of Himri, *Barbus luteus* (Cyprinidae: Cypriniformes) reared 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

- 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

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, Khuzestan, 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 ± 0.061 mm (Mean \pm 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 ± 0.121 mm (Mean \pm SD).