شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۲۱

ص۶۲۵-۶۳۹

بافت‌شناسی تکامل دستگاه گوارش لاروماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*) دریای خزر

❖ **مرتضی یعقوبی:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران،کرج، ایران
❖ **باقر مجازی امیری*:** استاد گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران،کرج، ایران
❖ **محمدعلی نعمت‌اللهی:** دانشیار گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران،کرج، ایران
❖ **سعید یلقی:** دانشیار مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی گرگان، گرگان، ایران

Archive of SID

چکیده

در تحقیق حاضر تکامل بافت‌شناسی دستگاه گوارش ماهی کلمه از مرحلهٔ تفریخ تا بچه‌ماهی انگشت‌قد به مدت ۵۳ روز در شرایط طبیعی زیستگاه مرحلهٔ نوزادگاهی این ماهی بررسی شد. سنین ۱، ۴، ۱۰، ۱۸، ۲۸، ۳۹ و ۵۳روزگی برای مطالعات بافت‌شناسی انتخاب شد. بعد از نمونه‌برداری و تثبیت‌کردن با فرمالین ۱۰ درصد برش‌های بافتی و رنگ‌آمیزی انجام شد. لاروهای تازه‌تفریخ‌شده لولهٔ گوارش ساده را نشان دادند. دهان بسته، کبد لوله‌ای و کیسهٔ شنای اولیه از سایر ویژگی‌های این مرحله بودند. در لارو چهارروزه دهان باز شد و یک مری کوتاه با بافت پوششی از نوع سنگ‌فرشی مطبق با سلول‌های جامی‌شکل اندک مشاهده شد. در لارو ده‌روزه مهم‌ترین واقعهٔ تکاملی شروع تغذیهٔ فعال بود. جذب کامل کیسهٔ زرده و تکامل نهایی مری تا سن ۲۸روزگی و تکامل نهایی دندان‌های حلقی، محو میکروسکوپی کیسهٔ زرده و شروع پیچ‌خوردگی روده از سایر وقایع تکاملی تا مراحل نهایی نمونه‌برداری‌ها بودند. روده اولین و دندان‌های حلقی آخرین ناحیه بودند که تکامل یافتند. حفظ تغذیهٔ درونی به مدت طولانی بعد از شروع تغذیهٔ فعال از راهکارهای افزایش بقا در محدودیت‌های غذایی در این ماهی است. ویژگی‌های تکاملی مشاهده‌شده بر شبیه‌بودن تکامل دستگاه گوارش ماهی کلمه با سایر ماهیان استخوانی تأکید می‌کند و البته تفاوت‌های خاص گونه‌ای به‌خصوص در بخش دندان حلقی دیده می‌شود.

واژگان کلیدی: بافت‌شناسی، تکامل دستگاه گوارش، تغذیهٔ فعال، ماهی کلمهٔ دریای خزر، مرحلهٔ لاروی.

* نویسندهٔ مسئول : ۰۲۶۳۲۲۴۵۹۰۹
Email: bmamiri@ut.ac.ir

www.SID.ir

۱.مقدمه

دستگاه گوارش ماهیان شامل دهان و حفرهٔ دهانی- حلقی، معده، روده به همراه زوائد پیلوریک و ارگان‌های مرتبط (کبد، کیسهٔ شنا و پانکراس)، رکتوم و مخرج است. عملکرد اصلی دستگاه گوارش تأمین مواد مغذی جیره در بافت‌های بدن است. کارایی این عامل فاکتور کلیدی به منظور تأمین منبعی برای رشد بافت‌های بدن است (Jobling, 1995). فعالیت موفق سیستم گوارشی برای رشد و بقای لاروماهی ضروری است، زیرا سیستم گوارشی کارامد ماهی را قادر به صید، بلع، هضم و جذب غذا می‌کند (Cahu *et al.*, 1998). لاروماهیان بعد از تفریخ به طور کامل وابسته به ذخایر کیسهٔ زرده‌اند و به محض اتمام کیسهٔ زرده تغذیهٔ خارجی را شروع می‌کنند تا انرژی مورد نیاز را تأمین کند. در زمان شروع تغذیه، این لاروها لولهٔ گوارشی فعال از لحاظ کالبدشناسی همراه با تغییرات شدید ریخت‌شناسی دارند (Gisbert *et al.*, 1998). به طور کلی، اطلاع از نحوهٔ تکامل سیستم گوارشی می‌تواند در تشخیص عوامل محدودکنندهٔ رشد در پرورش لارو، کاهش تلفات در زمان تغذیهٔ فعال و حتی طراحی جیرهٔ غذایی متناسب با سیستم گوارشی مؤثر باشد و علاوه بر آن، شاخصی قابل اطمینان از فعالیت‌های گوارشی و شرایط تغذیه‌ای لاروماهیان است (Bolasina *et al.*, 2006; Gisbert *et al.*, 2004). تا به حال توسعه و تکامل دستگاه گوارش از جنبه‌های متفاوت از جمله مطالعات بافت‌شناسی و بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی بررسی شده است (Jobling, 1995). بخش گسترده‌ای از این مطالعات دربارهٔ توسعهٔ بافت‌شناسی دستگاه گوارش در ماهیان غضروفی- استخوانی و استخوانی بوده است، اما دربارهٔ خانوادهٔ کپورماهیان این تحقیقات بسیار اندک است که به چند گونه مانند کپور معمولی (Smallwood and Smallwood, 1931) و ماهی گورخری (*Danio rerio*) (Wallace *et al.*, 2005) محدود می‌شود که بعضاً بخشی از ساختار دستگاه گوارش را مانند روده بررسی کرده‌اند. به‌علاوه در مورد اندام‌زایی در حین تکامل لاروی در گونه‌های این خانواده دانسته‌ها بسیار اندک است. در این پژوهش دستگاه گوارش بچه‌ماهیان کلمه از نظر بافت‌شناسی از مرحلهٔ تفریخ تا رهاسازی به دریا (تقریباً دوماهگی) با هدف تهیهٔ اطلاعات پایه از ساختار آن همچنین بررسی رفتار و عملکرد فیزیولوژیکی آن در مراحل ابتدایی رشد لارو مطالعه شد. دلیل انتخاب دستگاه گوارش به واسطهٔ اهمیت آن در هضم و جذب مواد غذایی است که از عوامل اصلی رشد و نمو در نتیجهٔ افزایش بازدهی تکثیر مصنوعی و نیمه‌مصنوعی این ماهی است (شیبانی، ۱۳۸۰). از آن‌جا که در علوم پایه بررسی ساختمان میکروسکوپی اندام‌ها اهمیت ویژه‌ای در تحقیقات کاربردی دارد بنابراین، سعی شد تا ساختمان میکروسکوپی و ماکروسکوپی لولهٔ گوارش این ماهی در مراحل ابتدایی زندگی به طور دقیق بررسی شود، زیرا این امر نه تنها در شناخت فیزیولوژی، آسیب‌شناسی، بررسی‌های بالینی و حتی شناخت ناهنجاری‌های دستگاه گوارش مفید واقع می‌شود، بلکه در تعیین زمان دقیق شروع تغذیهٔ فعال که بحرانی‌ترین مرحلهٔ زندگی لاروی است، با توجه ویژه به دما نیز دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای است (Boglione *et al.*, 1999).

Archive of SID

www.SID.ir

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. ماهی و شرایط نمونه‌برداری‌ها

در مرکز تکثیر و پرورش ماهی کلمه (سیجوال) بندر ترکمن، تکثیر ماهی کلمه به صورت نیمه‌طبیعی انجام شد. در این شیوه از لانه‌گذاری در استخرهای خاکی استفاده شد و هیچ‌گونه القای هورمونی صورت نگرفت. مولدین کلمهٔ مورد نیاز این مرکز با تور پره همچنین با استفاده از دام گوشگیر ثابت از دهانهٔ مصب رودخانهٔ گرگان‌رود و دریا از اواسط اسفند تا اواخر فروردین صید شدند که در این تحقیق از اولین مولدین صیدشده در تاریخ ۵ اسفند استفاده شد. سپس مولدین مورد آزمایش با کامیونت‌های مجهز به کپسول اکسیژن به کارگاه منتقل و به استخرهای خاکی ۲ هکتاری معرفی شدند که قبلاً با کودهای حیوانی و شیمیایی به نسبت معیّن غنی شده بودند. به منظور تکثیر مولدین در داخل استخر کاکابان‌هایی (بسترهای مصنوعی) از سرشاخه‌های کاج و سرو به‌منزلهٔ محل‌های تخم‌ریزی در نظر گرفته شد. در این تحقیق در شرایط طبیعی دمایی هیچ تغییری ایجاد نشد و ماهیان کاملاً به صورت طبیعی بررسی شدند. لاروها در ابتدای دورهٔ لاروی از روتیفرهای استخر و در مراحل بالاتر از دافنی همچنین، از روز ۸ بعد از تفریخ علاوه بر غذاهای زنده در استخر، با غذای کنسانترهٔ لارو کپور معمولی در دو وعدهٔ صبح و عصر تغذیه شدند. در ابتدا، نمونه‌برداری به صورت کاملاً تصادفی از روز اول تفریخ تخم‌ها (لارو یک‌روزه) تا زمان تقریباً دوماهگی به صورت روزانه سپس، چند روز یک‌بار تا رهاسازی با استفاده از ساچوک انجام پذیرفت (تا چهارروزگی به صورت روزانه، از چهار تا ده‌روزگی به صورت دو روز یک‌بار سپس، سه یا چهار روز یک‌بار تا انتهای مطالعه). پس از نمونه‌برداری‌ها، لاروها و بچه‌ماهیان در مادهٔ نگهدارندهٔ فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند (پوستی، ۱۳۷۸).

۲. ۲. اندازه‌گیری رشد ماهی و فرایندهای بافت‌شناسی

در هر مرحله به تعداد ۱۰–۱۵ نمونه برداشت و در مادهٔ نگهدارندهٔ فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. طول استاندارد (SL) لاروهای نمونه‌برداری‌شده با کولیس و وزن تر (WW) لاروها با ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم ثبت شد همچنین، دمای روزانه طی نمونه‌برداری‌ها در ساعت ۹ صبح هر روز ثبت شد (Treviño *et al.*, 2011).

به منظور بافت‌شناسی، ده لارو از هر نمونه‌گیری بعد از تثبیت‌شدن و انتقال به آزمایشگاه در سری‌های مختلف و متفاوت الکل آب‌زدایی و در بلوک‌های پارافینی قرار داده شد سپس، برش‌های بافتی (۳–۵ میکرون) از آن‌ها تهیه شد. مقاطع با رنگ‌آمیزی‌های Hematoxylin and Eosin (H&E) به منظور مشاهدات عمومی بافت‌شناسی و Periodic Acid Schiff (PAS) و سودان بلک برای بررسی شیمی بافتی به ترتیب برای شناسایی ساختارهای هیدروکربنی و چربی رنگ‌آمیزی شدند (Pearse, 1985).

به منظور شناخت تغییرات بافت‌شناسی دستگاه گوارش پس از بررسی لام‌های حاصل از تمامی مراحل نمونه‌برداری، هفت مرحلهٔ اصلی و کلیدی به منظور بیان نتایج در روزهای ۱، ۴، ۱۰، ۱۸، ۲۸، ۳۹

Archive of SID

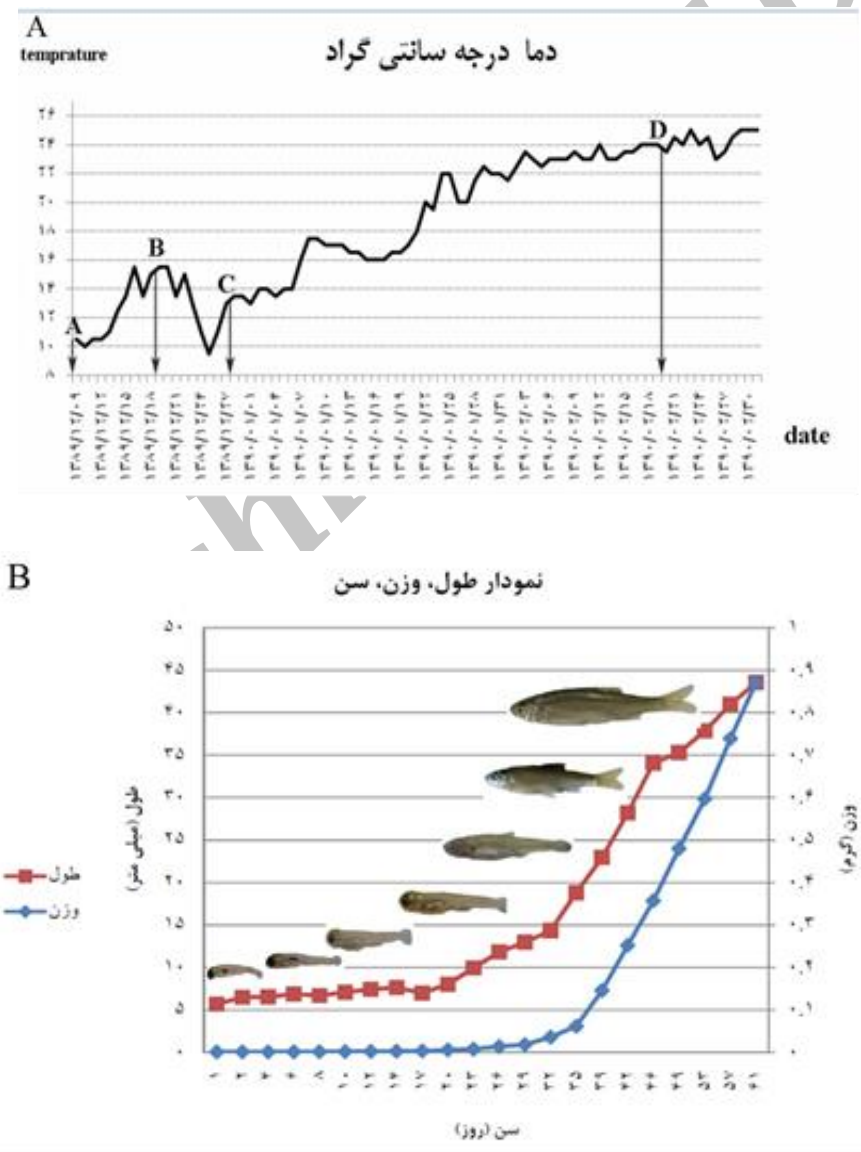
www.SID.ir

و ۵۳ انتخاب شدند. همچنین، در این تحقیق از نرم‌افزار excel برای رسم نمودارهای طول و وزن و دما همچنین، نرم‌افزار Photoshop CS4 به منظور اصلاح و تنظیم عکس‌های بافتی استفاده شده است.

۳. نتایج

۳. ۱. دما

در مطالعهٔ حاضر لاروها خارج از محیط آزمایشگاهی تکثیر و پرورش یافتند و همهٔ شرایط محیطی از جمله دما، نور و کیفیت آب مصرفی منطبق بر شرایط زادگاهی این ماهی در فصل و محل طبیعی تکثیر آن‌ها بود. در شکل ۱ A میانگین تغییرات دمایی روزانه، از زمان شروع تخم‌ریزی تا تفریخ، همچنین طی نمونه‌برداری‌ها تا زمان رهاسازی بچه‌ماهیان اندازه‌گیری‌شده، بیان شده است.



شکل ۱. A: نمودار تغییرات دمایی طی دوران تخم‌ریزی (a)، تفریخ (b)، تغذیهٔ فعال (c) و رهاسازی (d)، B: نمودار طول، وزن، سن

www.SID.ir

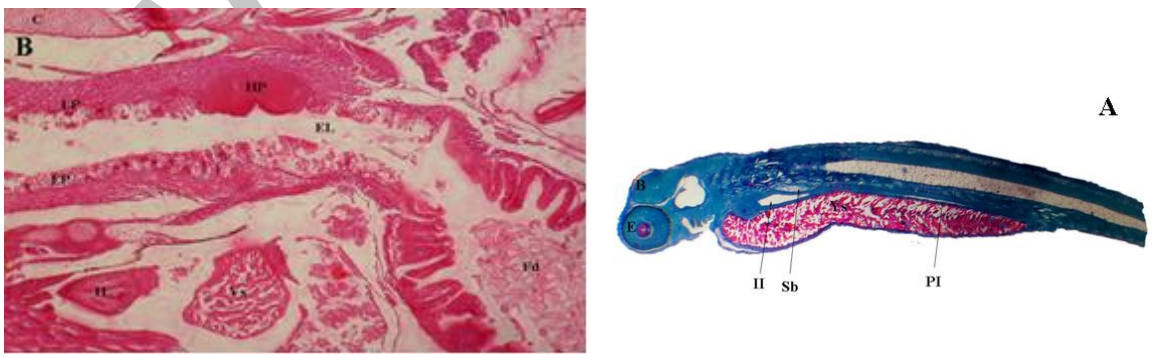
۳. ۲. رشد (Growth)

طی نمونه‌برداری‌ها که در ابتدا به صورت هر روزه سپس دو، سه و چهار روز یک‌بار تا انتهای دورهٔ مطالعه انجام شد، رشد به صورت طول استاندارد (Standard length (SL)[1]) و وزن تر (Wet weight (WW)) با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم از ده لارو در هر مرحله اندازه‌گیری شد. در مرحلهٔ تفریخ، لاروها دارای طول استاندارد (۵/۶۹mm) و وزن تر (mg ۱/۱۴) همچنین در انتهای مطالعه (بچه‌ماهی ۵۳ روزه) بچه‌ماهیان به طول استاندارد (۳۷/۸۴ mm) و وزن تر (۵۹۷ mg) رسیدند. طی بررسی توسعهٔ لاروی، رشد با طول و وزن دارای همبستگی بود که با رابطهٔ رگرسیونی بین طول و وزن به صورت زیر بیان شد: $\left(R^2=0/902 \text{ و } n=220\right)$. (شکل ۱ B) (Treviño *et al.*, 2011).

۳. ۳. بافت‌شناسی دستگاه گوارش

۳. ۳. ۱. کیسهٔ زرده (Yolk sac)

در مرحلهٔ تفریخ کیسهٔ زرده بخش اعظم ناحیهٔ شکمی را به خود اختصاص می‌دهد (شکل ۲ A) و طی تکامل لاروی به دلیل پایین‌بودن دما به صورت کاملاً آهسته اندازهٔ آن کاهش یافت (شکل۲ B). تا در ۱۸ روز بعد از تفریخ (SL=۸/۰۲ ± ۰/۹۳ n=mm۱۰) کیسهٔ زرده دیگر از نظر ماکروسکوپی قابل مشاهده نبود و بعد از این مرحله به صورت حجمی گرد و کوچک در کنار قلب و در قسمت جلویی حفرهٔ شکمی با مشاهدهٔ میکروسکوپی دیده شد. مشاهدات بافت‌شناسی و میکروسکوپی کیسهٔ زردهٔ تحلیل‌رفته را تا ۳۹ روز بعد از تفریخ (SL=۲۲/۹۵ ± ۱/۰۵ n=mm۱۰) در کنار کبد و قلب نشان داد (شکل۲ B)، اما عملاً شاخص حذف‌شدن کیسهٔ زرده با مشاهدهٔ ماکروسکوپی بیان می‌شود (Treviño *et al.*, 2011). تعداد زیادی واکوئل که در طول زرده پراکنده شده‌اند مربوط به لیپیدهای حل‌شده در فرایند قراردادن لارو در پارافین است. بر اساس این مشاهدات می‌توان نتیجه گرفت از ترکیبات زرده، علاوه بر پلی‌ساکاریدها، چربی‌ها نیز نقش عمده‌ای دارند (شکل ۲ A).

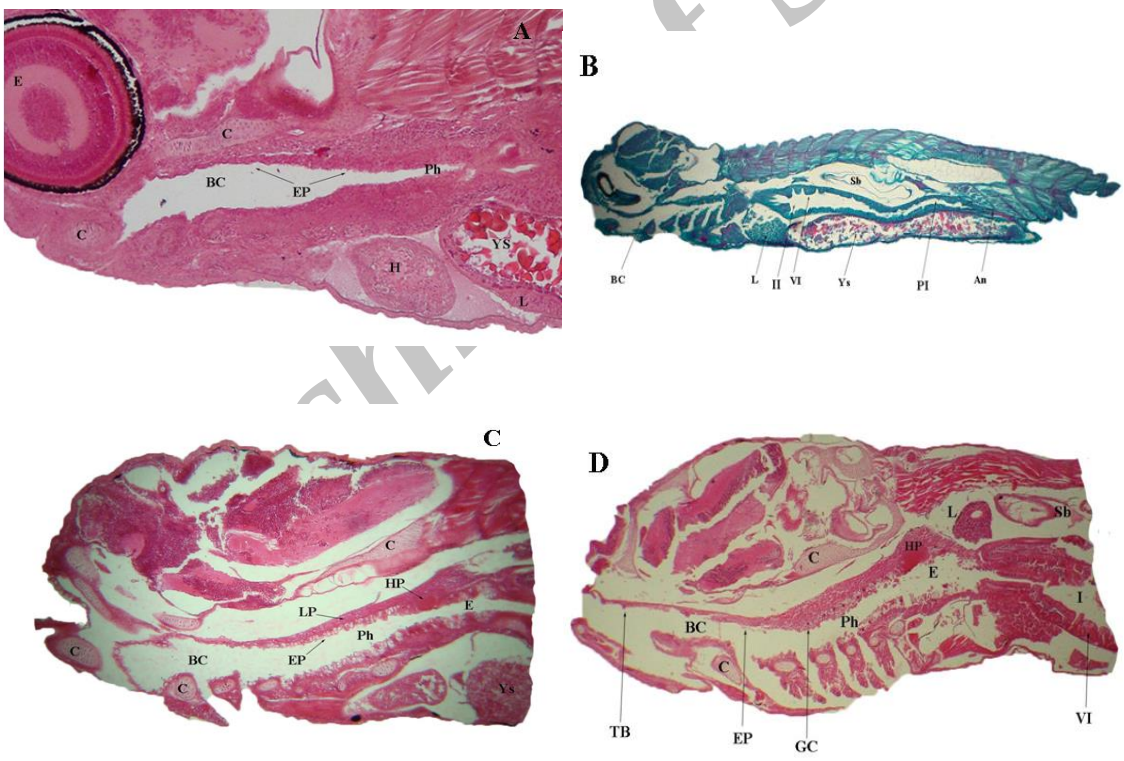


شکل ۲. A: برش طولی از دستگاه گوارش لارو یک‌روزه (PAS X40) B: برش طولی از بخش حلقی تا ابتدای روده در بچه‌ماهی ۲۸روزه (H&E X100). B: مغز، C: غضروف، E: چشم، EL: فضای مری، EP: اپیتلیوم، Fd: غذا، H: قلب، HP: بخش شاخی اپیتلیوم، II: رودهٔ قدامی، LP: پارین، PI: رودهٔ خلفی، Sb: کیسهٔ شنا، Ys: کیسهٔ زرده.

Archive of SID
www.SID.ir

۳. ۳. ۲. دهان و حفرهٔ دهانی- حلقی

در مرحلهٔ تفریخ (لارو یک‌روزه) دهان بسته بود و تا چهار روز بعد از تفریخ (۱۰mm n= ۰/۶۲ ± SL=۶/۵۳) باز نشد. در این سن حلق بسیار کوتاه و نامشخص بود و در انتهای رشته‌های آبششی قرار داشت. حفرهٔ دهانی و آبششی با یک لایه اپیتلیوم سنگ‌فرشی پوشیده شده بود و غضروف‌های اولیه به صورت قطعات کوچک مشخص شده بودند. (شکل ۳ A). در چهار روز بعد از تفریخ دهان باز شده است (شکل ۳ B). در لارو ده‌روزه (۱۰mm n= ۰/۵۶ ± SL=۷/۰۸) آثاری از اندام‌های چشایی اولیه در اپیتلیوم دهانی دیده می‌شوند (شکل ۳ C). در بچه‌ماهی ۱۸روزه قطر اپیتلیوم سنگ‌فرشی دهان افزایش یافته است و اندام‌های چشایی به صورت برآمدگی‌هایی در مخاط سقف و کف حفرهٔ دهانی و چین‌های دهانی نیز در این مرحله دیده می‌شوند. به سمت حلق به تعداد سلول‌های جامی‌شکل، ضخامت اپیتلیوم و ضخامت عضلات مخطط افزوده می‌شود (شکل ۳ D).



شکل ۳. A: برش طولی از ناحیهٔ دهانی و حلقی لارو یک‌روزه (H&E X200)، B: طولی از دستگاه گوارش در لارو چهارروزه (PAS X40)، C: برش طولی از ناحیهٔ حلقی- دهانی در لارو ده‌روزه (H&E X100)، D: برش طولی از ناحیهٔ دهانی- حلقی در لارو ۱۸روزه (H&E X40). An: مخرج، BC: فضای دهانی، C: غضروف، E: مری، EP: اپیتلیوم، GC: سلول‌های جامی‌شکل، H: قلب، HP: بخش شاخی اپیتلیوم، I: روده، II: رودهٔ قدامی، L: کبد، LP: پارین، Ph: حلق، PI: رودهٔ خلفی، Sb: کیسهٔ شنا، TB: جوانهٔ چشایی، VI: کرک روده‌ای، Ys: کیسهٔ زرده.

www.SID.ir

۳. ۳. ۳. دندان‌های حلقی

در لاروماهی کلمه در ابتدای تفریخ و حتی در شروع تغذیهٔ فعال هیچ آثاری از شکل‌گیری یا حتی تمایز دندان‌های حلقی در این بخش از ناحیهٔ حلق مشاهده نشد. فقط در مرحلهٔ تغذیهٔ فعال در لارو ده‌روزه آثار اندکی از تجمع سلول‌های به‌هم‌فشرده در ناحیهٔ اپیتلیومی انتهایی حلق و ابتدایی مری مشاهده شد (شکل ۳ C). این بخش با رشد لارو تمایز یافت و کم‌کم در لارو ۱۸روزه به ناحیه‌ای کاملاً مجزا و قابل تشخیص و شاخی‌شکل از دستگاه گوارش تبدیل شد (شکل ۲ A). در لارو ۲۸روزه در دیوارهٔ روبه‌روی این بخش شاخی‌شکل جوانه‌های دندان‌های حلقی در داخل اپیتلیوم مشاهده شدند و خود بخش شاخی اپیتلیوم در دیوارهٔ بالایی دستگاه گوارش با سلول‌های پایه‌ای منظم و به‌هم‌فشرده و پاسخ مثبت به رنگ‌آمیزی PAS دیده شد. در مراحل بعدی با رشد لارو این دو بخش تکامل‌یافته‌تر و بزرگ‌تر و همچنان با پاسخ مثبت به رنگ‌آمیزی PAS مشاهده شدند. تکامل دندان‌های حلقی در ۳۹روزگی مشاهده شد (شکل ۴ A).

۳. ۳. ۴. مری

در لارو تازه‌تفریخ‌شده مری به صورت تمایزنیافته است (شکل ۲ A). در چهار روز بعد از تفریخ، مری کوتاه و باریک مشاهده می‌شود (شکل ۳ B). در لارو ده‌روزه، مصادف با شروع تغذیهٔ فعال، مشاهده می‌شود که چین‌خوردگی‌های مری به‌خصوص در بخش انتهایی افزایش یافته است. بافت پوششی در ابتدای مری، چسبیده به حلق سنگ‌فرشی مطبق و بعد از آن طی مری تا پیاز روده به صورت استوانه‌ای است (شکل ۴ B). در لارو ۱۸روزه می‌توان مری را با طول بیشتر و سلول‌های جامی‌شکل بیشتر همچنین چین‌خوردگی‌های بیشتر مشاهده کرد (شکل ۴ C).

۳. ۳. ۵. کیسهٔ شنا

کیسهٔ شنای اولیه از دیوارهٔ پشتی دستگاه گوارش تمایز می‌یابد. در مرحلهٔ تفریخ و لارو یک‌روزه به صورت کاملاً تمایزنیافته است و در بالای رودهٔ اولیه قرار دارد که با مجرای پنئوماتوفور به لولهٔ گوارش متصل است (شکل ۴ D). و در لارو چهارروزه هم‌زمان با بازشدن دهان به صورت اتاقک کوچک هوا مشاهده می‌شود. در ناحیهٔ پشتی کیسهٔ شنا نیز توده‌ای از سلول‌های مکعبی تمایزنیافته مشاهده می‌شود که شبکهٔ میرابیل (rete mirabile) را تشکیل می‌دهند (شکل ۳ B). در مرحلهٔ لارو ۱۸روزه به بعد کیسهٔ شنا شروع به افزایش اندازه همراه با افزایش اندازهٔ لارو تا انتهای مطالعه می‌کند.

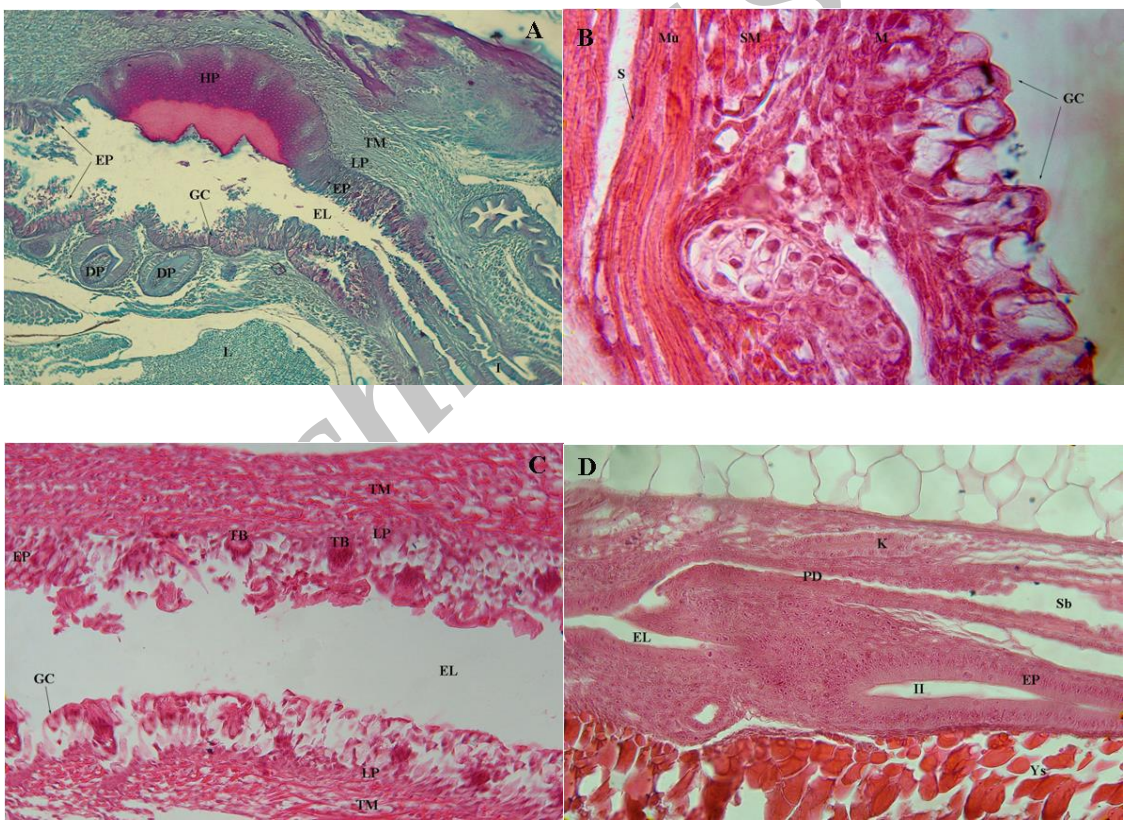
۶.۳.۳. روده

در لارو یک‌روزه روده به صورت اولیه و تمایزنیافته مشاهده می‌شود و مخرج و حتی بخش خلفی تشکیل نشده‌اند؛ در این مرحله ساختار بخش پوششی روده به شکل استوانه‌ای مطبق تا استوانه‌ای شبه‌مطبق است (شکل‌های ۲ A و ۵ A). در لارو چهارروزه در بخش قدامی روده که در خانوادهٔ کپورماهیان به دلیل نداشتن معده به صورت حجیم‌تر درآمده است، در این مرحله چین‌خوردگی‌هایی دیده می‌شود و هیچ سلول ترشحی‌ای مشاهده نمی‌شود (شکل ۳ B). در لارو ده‌روزه بخش‌های مختلف روده تشکیل شده و

Archive of SID

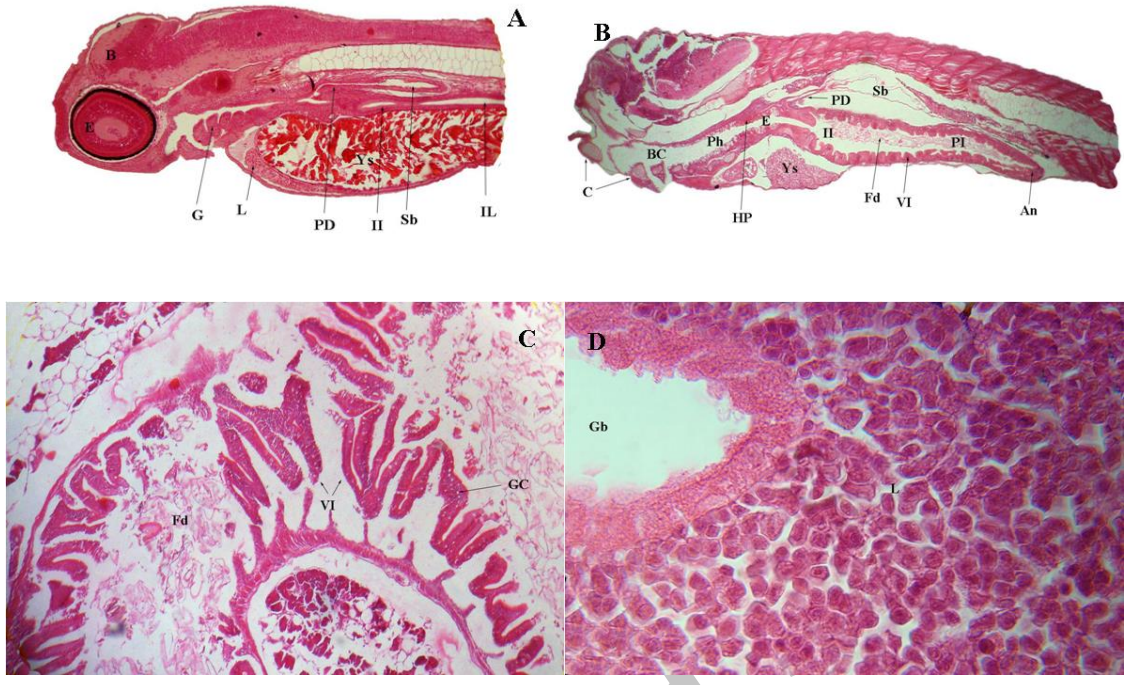
www.SID.ir

مهم‌ترین نکته در این مرحله مشاهدهٔ اجزا و مواد غذایی در طول روده است. چین‌های مخاطی در سرتاسر روده مشاهده می‌شود که در بخش قدامی با تعداد زیادتر و چین‌های بلندتر است. مخرج به صورت کامل شکل گرفته است. بافت پوششی در بخش قدامی به صورت استوانه‌ای مطبق است و در بخش میانی به استوانه‌ای ساده و در بخش انتهایی به سمت کوتاه‌ترشدن بافت پوششی استوانه‌ای پیش می‌رود تا حدی که در نزدیکی‌های مخرج به بافت سنگ‌فرشی مطبق تبدیل می‌شود. سلول‌های جامی‌شکل در بافت پوششی روده مشاهده شدند که فراوانی آن‌ها در بخش قدامی خیلی کم و به سمت بخش خلفی افزایش می‌یافت (شکل ۵ B). در لارو ۱۸روزه روده با طول بیشتر، ویلی (کرک)های بلندتر و میکرو ویلی (میکرو کرک)های فراوان دیده می‌شود. تفاوت آشکار لارو در دو مرحلهٔ آخر نمونه‌برداری با مراحل قبلی افزایش شدید طول روده است که در لارو ۳۹روزه روده به صورت پیچ‌خورده مشاهده می‌شود و در لارو ۵۳روزه این پیچ‌خوردگی شدیدتر می‌شود (شکل ۵ C).



شکل ۴. A: برش طولی از دندان‌های حلقی و ناحیهٔ حلقی و مری بچه‌ماهی ۲۸روزه (PAS X100)، B: نمایش لایه‌های دیوارهٔ تکامل‌یافتهٔ مری در لارو ده‌روزه (H&E X400)، C: برش طولی از مری در لارو ۱۸روزه (H&E X400)، D: برش طولی از روده، مری و کیسهٔ شنای اولیه در لارو یک‌روزه (H&E X400). DP: زوائد دندانی، EL: فضای مری، EP: اپیتلیوم، GC: سلول‌های جامی‌شکل، HP: بخش شاخی اپیتلیوم، I: روده، II: رودهٔ قدامی، K: کلیه، L: کبد، LP: پارین، M: لایهٔ موکوسی، Mu: لایهٔ عضلانی، PD: لولهٔ هوایی، S: سروزا، Sb: کیسهٔ شنا، SM: لایهٔ زیر موکوسی، TB: جوانهٔ چشایی، TM: عضلات صاف، Ys: کیسهٔ زرده.

www.SID.ir



شکل ۵. A: برش طولی از ناحیهٔ سر و ابتدای روده در لارو یک‌روزه (H&E X100)، B: برش طولی از دستگاه گوارش لارو ده‌روزه (H&E X40)، C: برش طولی از بخش میانی روده در لارو ۵۳روزه (H&E X100)، D: برش طولی از ساختار کبد در لارو ۱۸روزه (H&E X400). An: مخرج، B: مغز، BC: فضای دهانی، C: غضروف، E: مری، Fd: غذا، G: آبشش، GC: سلول‌های جامی‌شکل، Gb: کیسهٔ صفرا، HP: بخش شاخی اپیتلیوم، IL: فضای روده، II: رودهٔ قدامی، L: کبد، PD: لولهٔ هوایی، Ph: حلق، PI: رودهٔ خلفی، Sb: کیسهٔ شنا، VI: کرک روده‌ای، Ys: کیسهٔ زرده.

۷.۳.۳. کبد

در مرحلهٔ تفریخ، کبد لوله‌ای از ناحیهٔ قلبی تا کلیهٔ خلفی گسترش یافته بود. از لحاظ بافت‌شناسی، کبد به شکل توده‌ای از بافت‌های به‌هم‌فشرده دیده می‌شود که این بافت‌های فشرده از هپاتوسیت‌های چندوجهی با هستهٔ مرکزی و سیتوپلاسم اندک تشکیل شده‌اند (شکل ۵ A) که مهم‌ترین ویژگی تکاملی کبد در مراحل بعدی، تکثیر و ازدیاد سلول‌های هپاتوسیتی، افزایش واکوئول‌های لیپیدی و افزایش ذخیرهٔ گلیکوژنی بود (شکل ۵ D).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

مکانیسم اصلی توسعهٔ دستگاه‌ها و سیستم‌های بدن در ماهیان استخوانی تقریباً مشابه هم است هر چند تفاوت‌های بین‌گونه‌ای زیادی دربارهٔ زمان تمایز، توسعه و عملکرد طی مراحل اولیه دیده می‌شود. در زمان‌بندی توسعهٔ دستگاه‌ها و نقش‌های فیزیولوژیکی وابسته به آن‌ها، تاریخچهٔ عمومی زندگی و نحوهٔ تولیدمثلی هر گونه مؤثر است (Balon, 1975). تعداد زیادی از عامل‌های زیستی و غیرزیستی نیز در این زمان‌بندی مؤثرند. در بین این عامل‌ها، دما، دردسترس‌بودن غذا، ترکیب غذا و کیفیت آب از مهم‌ترین عوامل‌اند (Zambonino Infante and Cahu, 2007). در تحقیق حاضر عامل‌های غیرزیستی به‌خصوص دما و کیفیت آب و شرایط پرورش لارو دقیقاً منطبق بر شرایط طبیعی زیستگاه این ماهی بود،

Archive of SID

www.SID.ir

چراکه پرورش در فضای باز و در استخرهای خاکی‌ای انجام گرفت که با آب رودخانهٔ گرگان‌رود (رودخانهٔ بومی زیست لاروهای این ماهی) تغذیه می‌شد. به همین منظور طی نمونه‌برداری‌ها دما نیز به صورت روزانه ثبت شد که در شکل ۱ A گزارش شد. بر طبق این نمودار مشاهده می‌شود که در ابتدای تخم‌ریزی و تفریخ و حتی تا شروع تغذیهٔ فعال دمای محیط پایین بود (۹–۱۵ درجهٔ سانتی‌گراد) و این پایین‌بودن دما سبب به‌تأخیرافتادن مراحل شد. به صورتی که قبلاً (نوروزی و همکاران، ۱۳۸۵) در دمای ۱۵–۱۷ درجه تفریخ و جذب کیسهٔ زرده در لاروماهی کلمه را هر یک شش روز بیان کرده‌اند. در مطالعات دربارهٔ بررسی‌های تکاملی لاروی معمولاً از دمای ثابت آزمایشگاهی استفاده می‌شود، اما در این تحقیق از روند افزایش طبیعی دما در اوایل بهار پیروی شد. از این رو می‌توان نتایج تحقیق حاضر را مستقیماً به لاروهای در حال تکامل که در نتیجهٔ تکثیر طبیعی مولدین در این فصل تولید می‌شوند نسبت داد.

۱.۴. کیسهٔ زرده

کیسهٔ زرده در خانوادهٔ کپورماهیان نسبت به ماهیان سردآبی مثل آزادماهیان در تناسب با بدن لارو تازه‌تفریخ‌شده کوچک‌تر است و دورهٔ کمتری برای جذب کامل آن نیاز است. به‌علاوه حضور مقدار زیادی زرده تا شروع تغذیهٔ فعال انتقال مرحلهٔ تغذیه‌ای از داخل به خارج را برای لاروها آسان‌تر می‌کند (Treviño *et al.*, 2011). در مطالعهٔ حاضر ذخیرهٔ زرده در ۱۸ روز بعد از تفریخ به میزان زیادی کاهش می‌یابد که به‌منزلهٔ انتقال از مرحلهٔ تغذیهٔ توأم داخلی و خارجی به مرحلهٔ فقط تغذیهٔ خارجی است؛ باقی‌ماندهٔ زرده که فقط به صورت میکروسکوپی قابل رؤیت است به‌منزلهٔ ذخیرهٔ موقتی از مواد مغذی برای لاروها به منظور افزایش تحمل آن‌ها در زمان‌های کوتاه محدودیت غذایی استفاده می‌شود. این ویژگی در ماهیانی که در محیط زندگی خود دوره‌های بدون غذا را سپری می‌کنند می‌تواند بسیار مفید باشد (ibid). به‌علاوه در فعالیت‌های آبزی‌پروری حضور زرده به مدت طولانی، مانند مشاهدهٔ حاضر، می‌تواند مزیتی برای انتقال موفق به تغذیهٔ خارجی باشد یا این‌که در موارد تأخیر در تغذیهٔ اولیه لارو می‌تواند بدون تحت تأثیر قرارگرفتن عملکرد رشدی به بقای خود ادامه دهد (Gisbert *et al.*, 1998). البته در مطالعهٔ حاضر تأثیر دمای پایین محیط در شروع مراحل اولیهٔ رشدی در طولانی‌شدن جذب کیسهٔ زرده را نمی‌توان نادیده گرفت.

۲.۴. حفرهٔ دهانی- حلقی

ظهور جوانه‌های چشایی در دهان هم‌زمان با شروع تغذیهٔ فعال در ده روز بعد از تفریخ نشان‌دهندهٔ وابستگی لاروماهی کلمه به حس چشایی خود در به‌دست‌آوردن غذا در مراحل اولیهٔ تکامل لاروی است. تکامل دستگاه گوارش در این ناحیه در اکثر مطالعات قبل از شروع تغذیهٔ فعال بیان شده است که در لاروماهی کلمه نیز تقریباً صادق بود و هم‌زمان با شروع تغذیهٔ فعال مشاهده شد که نشان می‌دهد تکامل دستگاه گوارش در همهٔ ماهیان به گونه‌ای است که با ورود غذا امکان استفادهٔ حداکثری از آن در کسب انرژی و افزایش بقا حاصل شود. هر چند در مقایسه با ماهی کاملاً تکامل‌یافته در این مرحله

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت‌های بارزی در توانایی هضم و جذب در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش مشاهده می‌شود.

۳.۴. دندان‌های حلقی

در برخی از کپورماهیان اپیتلیوم سنگ‌فرشی ناحیهٔ حلقی با صفحه‌ای شاخی‌شکل و سفت پوشیده شده است (Franck Genten, 2009) که این گزارش با مشاهدات ما در بچه‌ماهی کلمه در سن ده تا هجده‌روزه همخوانی دارد. ماهیان فاقد معده مثل ماهی گورخری معمولاً دارای چهار جفت دندان (دندان‌های حلقی) بر روی استخوان‌های تحتانی حلقی‌اند که غذا بین این دندان‌ها و اپیتلیوم شاخی این بخش ساییده می‌شود (ibid). در بچه‌ماهی کلمه نیز تکامل این دو بخش در کنار هم مشاهده شد. در لارواهی کلمه در ابتدای تفریخ و حتی در شروع تغذیهٔ فعال هیچ آثاری از تمایز دندان‌های حلقی مشاهده نشد.

۴.۴. مری

در مقایسهٔ لاروماهی کلمه با دو ماهی آزاد (بحر کاظمی، ۱۳۸۲) و تاس‌ماهی ایرانی (پهلوان یلی، ۱۳۸۰) در بخش مری، به‌منزلهٔ دو ماهی استخوانی و غضروفی استخوانی، مشاهده می‌شود که تکامل مری در هر سه گونه بدون درنظرگرفتن زمان ایجاد تغییرات به‌شدت مشابه است و تفاوت‌های ساختاری تا شروع تغذیهٔ فعال مشاهده نمی‌شود. به جز مواردی مانند ساختار بافت پوششی مری که در لاروماهی کلمه همانند ماهی اسنوک قرمز (*Petenia splendida*) به صورت استوانه‌ای در سرتاسر مری است فقط در چهارروزگی، وقتی مری کوچک و تکامل‌نیافته است، بافت سنگ‌فرشی مطبق در این ناحیه دیده می‌شود (Treviño *et al.*, 2011). در حالی که در دو ماهی آزاد از ماهیان استخوانی و قره‌برون از ماهیان غضروفی- استخوانی بخش قدامی با بافت کاملاً استوانه‌ای و بخش خلفی با بافت کاملاً سنگ‌فرشی مطبق گزارش شده است. این تفاوت‌های ساختاری را می‌توان به ویژگی‌های تغذیه‌ای گونه‌های مختلف نسبت داد. تعداد زیاد سلول‌های جامی‌شکل و ترشح زیاد موکوس در مری قدامی نه تنها به‌منزلهٔ تسهیل‌کننده در انتقال ذرات غذایی به دلیل ایجاد لغزندگی است، بلکه به علت این‌که ماهیان غدد بزاقی ندارند، عوامل مزبور نقش بزاق پستانداران را در حفاظت از مخاط گوارشی ماهیان در برابر صدمات فیزیکی ناشی از مصرف ذرات غذایی درشت و سفت بر عهده دارند (Gisbert *et al.*, 1999). همچنین، سلول‌های ترشحی در مری خلفی بیان‌کنندهٔ نقش حفاظتی موکوس در آن است (Baglole *et al.*, 1997). مشخص‌ترین ویژگی بافت‌شناسی مری که بیان‌کنندهٔ تکامل آن است حضور موکوس در مری، شکل‌گیری چین‌های بلند و حضور سلول‌های ترشحی است. عموماً اپیتلیومی که سطح لایهٔ موکوسی مری را در لاروها می‌پوشاند با آنچه در بالغان مشاهده می‌شود شبیه است و به طور کلی می‌توان گفت مری در ماهیان آب شیرین دارای اپیتلیوم سنگ‌فرشی چندلایه با سلول‌های ترشحی فراوان است در حالی که در گونه‌های ماهیان دریایی با اپیتلیوم استوانه‌ای و سلول‌های ترشحی کمتر و چین‌های موکوسی بزرگ‌تر قابل مشاهده است که دلیل این تفاوت به صورت دقیق بیان نشده است، اما می‌تواند به رژیم غذایی این ماهیان مرتبط باشد

Archive of SID

www.SID.ir

(Stevens and Hume 2005). در لاروماهی کلمه حالتی بینابینی‌ای مشاهده شد که به سمت پیاز روده اپیتلیوم مری به سمت تغییر از سنگ‌فرشی به استوانه‌ای پیش می‌رود.

۵.۴. کیسهٔ شنا

در مطالعهٔ تطبیقی تکامل و عملکرد کیسهٔ شنای لارو دو ماهی *Brevoortia tyrannus* از خانوادهٔ (Clupeidae) با کیسهٔ شنای باز (physostom) و *Leiostomus xanthurus* از خانوادهٔ (Sciaenidae) با کیسهٔ شنای بسته (physoclist)، در هر دو لارو کیسهٔ شنا از بخش پیش روده (foregut) تمایز یافتند، اما در لارو با کیسهٔ شنای بسته شروع تمایز و توسعهٔ کیسهٔ شنا نسبت به لارو با کیسهٔ شنای باز زودتر و هم‌زمان با کاهش حجم کیسهٔ زرده در لارو دوروزه انجام گرفت. در حالی که در لارو با کیسهٔ شنای باز شروع توسعه و تکامل کیسهٔ شنا بعد از جذب کیسهٔ زرده در ۱۲روزگی رخ می‌دهد. تحلیل لولهٔ هوایی در لارو با کیسهٔ شنای بسته در ۲۰روزگی گزارش شد (Govoni *et al.*, 2001). در مطالعهٔ حاضر ظهور لولهٔ هوایی در لاروماهی کلمه که از ماهیان با کیسهٔ شنای باز است در یک‌روزگی مشاهده شد و در لارو چهارروزه کیسهٔ شنا شروع به متورم‌شدن و بزرگ‌شدن کرد. یعنی لولهٔ هوایی قبل از افزایش حجم کیسهٔ شنا و بعد از بازشدن دهان و شکل‌گیری اولیهٔ مری به منظور اتصال کیسهٔ شنا به مری و بلعیدن حباب هوای اولیه تشکیل شده است و بعد از بلعیدن حباب هوا کیسهٔ شنا شروع به افزایش حجم با افزایش رشد لارو کرد. می‌توان نتیجه گرفت لارو کلمه در چهارروزگی با بلعیدن حباب هوا و انتقال آن به کیسهٔ شنا شروع تکامل این اندام کنترل شناوری را باعث می‌شود. این روند یعنی تمایز زودهنگام لولهٔ هوایی (یک‌روزگی) با نتایج بالا دربارهٔ ماهی با کیسهٔ شنای باز (*Brevoortia tyrannus*) همخوانی ندارد که دلیل آن را می‌توان تفاوت‌های بین‌گونه‌ای در میان ماهیان دانست.

۶.۴. روده

نکتهٔ قابل تأمل در این مورد نسبت افزایش طول روده به افزایش ارتفاع چین‌های روده‌ای است که معمولاً در ماهیان گوشت‌خوار با طول رودهٔ کوتاه‌تر ارتفاع چین‌های روده‌ای بیشتر است که این موضوع در مطالعهٔ لاروماهی آزاد دریای خزر گزارش شد (بحرکاظمی، ۱۳۸۲). دربارهٔ لاروماهی کلمه از آن‌جا که این ماهی از خانوادهٔ کپورماهیان و فاقد معده است همچنین، دارای رژیم غذایی بنتوزخواری است نیز تا حدودی صادق است که البته در مقایسه با ماهیان گوشت‌خواری چون آزادماهیان دارای طول رودهٔ بزرگ‌تر و چین‌های روده‌ای کوتاه‌تری است. سلول‌های ترشحی فراوان در روده نشان‌دهندهٔ هضم و جذب نهایی و کامل‌تر در روده است و حضور این سلول‌ها در ناحیهٔ خلفی روده با مژه‌های فراوان و بلند در سهولت دفع و هضم و جذب بیشتر مواد در این ناحیه نقش دارد. ارتفاع چین‌های مخاطی در بخش‌های مختلف روده متفاوت است در ماهی کلمه در تمامی مراحل نمونه‌برداری در ناحیهٔ قدامی یا پیاز روده ارتفاع این چین‌ها از سایر قسمت‌ها بلندتر است؛ سپس در ناحیهٔ میانی کمتر و در بخش خلفی به کوتاه‌ترین حد می‌رسد. نتایج مشابه در لاروماهی آزاد گزارش شد با این تفاوت که چندین کرک بلند

Archive of SID

www.SID.ir

در بخش میانی روده در این ماهی دلیلی بر تشکیل دریچهٔ مارپیچی گزارش شد (همان). این ساختار در ماهی کلمه مشاهده نشد. در لاروماهی خاویاری سیبری ارتفاع چین‌های بخش میانی از دو بخش دیگر بلندتر گزارش شد (Gisbert *et al.*, 1998). علت این تفاوت‌ها را می‌توان به نبود معده در ماهی کلمه و وجود ساختاری حجیم در ابتدای روده به نام پیاز روده دانست که این ساختار دارای چین‌های بلندی است که قسمتی از روده به حساب می‌آید.

۴. ۷. کبد

مهم‌ترین عمل کبد در ارتباط با گوارش تولید صفراست که برای گوارش و جذب لیپیدها ضروری است (پوستی، ۱۳۷۸). توسعهٔ اولیهٔ کبد در لاروماهی کلمه با تمایز روده همراه بود که نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم‌های صفرایی در ابتدای تغذیهٔ فعال و همکاری در گوارش مواد غذایی خورده‌شده است.

Archive of SID

References

[۱]. بحرکاظمی، معصومه. ۱۳۸۲. مطالعهٔ بافت‌شناسی و شیمی بافتی لولهٔ گوارش ماهی آزاد دریای خـزر (Salmo trutta caspius) از زمان تفریخ تا مرحلهٔ بچه ماهی یک تابستانه (parr). پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد، دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۱۱٦ ص.

[۲]. پوستی، ایرج و عبدالحمید، صدیق مروستی. ۱۳۷۸. اطلس بافت‌شناسی ماهی. انتشارات دانشگاه تهران، ۳۲۸ ص.

[۳]. پهلوان یلی،م. مجازی امیری، ب. پوستی، ا. و بهمنی، م. ۱۳۸۲. مطالعهٔ بافت‌شناسی تکامل لولهٔ گـوارش تـاس‌مـاهی (Acipenser persicus) ایرانی در مراحل ابتدایی زندگی. مجلهٔ علمی شیلات ایران، شمارهٔ ۲، تابستان۱۳۸۳، ۳۳-۴۹.

[۴]. شیبانی، محمدتقی. ۱۳۸۰. بررسی لولهٔ گوارش تاس‌ماهی ایرانی (A. persicus) . پایان‌نامهٔ دکترای تخصصی دانشـکدهٔ دام‌پزشـکی دانشگاه تهران، ۱۲۲ ص.

[۵]. نوروزی، م. اکرمی،ا.و متین فر،ع. ۱۳۸۵. بررسی تکثیر نیمه‌طبیعی ماهی کلمه (Rutilus rutilus caspicus) و تغذیهٔ بچـه ماهیـان آن تا مرحلهٔ رهاسازی. مجلهٔ علمی شیلات ایران، شمارهٔ ٥٦، پاییز ۱۳۸۵. ١٦٥ ص.

[6]. Baglole, C.J. Murray, H.M. Goff, G.P.Wright, G.M. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. Journal of Fish Biology, 51: 120-134.

[7]. Boglione, C.. Bronzi, P.. Cataldi, E.. Serra, S.. Gagliardi, F..Cataudella, S. 1999. Aspects of early development in the Adriatic sturgeon Acipenser naccarii. Journal of Applied Ichthyology, 15: 207-213.

[8]. Bolasina, S.. Pérez, A..Yamashita, Y. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus. Aquaculture, 252: 503-515.

[9]. Cahu, C.. Zambonino Infante, J.. Escaffre, A.M.. Bergot, P..Kaushik, S. 1998. Preliminary results on sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae rearing with compound diet from first feeding. Comparison with carp (Cyprinus carpio) larvae. Aquaculture, 169: 1-7.

[10]. Franck Genten, E.T., Andri Danguy. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 223 pp.

[11]. Gisbert, E.. Piedrahita, R.H..Conklin, D.E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (Paralichthys californicus) with notes on feeding practices. Aquaculture, 232: 455-470.

[12]. Gisbert, E.. Rodriguez, A.. Castelló-Orvay, F..Williot, P. 1998. A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon (Acipenser baeri) during early ontogeny. Aquaculture, 167: 195-209.

[13]. Govoni, J.J.. Hoss, D.E..Gatten Jr, R.E. 2001. Comparison of the development and function of the swimbladder of Brevoortia tyrannus (Clupeidae) and Leiostomus xanthurus (Sciaenidae). Copeia, 2001: 430-442.

[14]. Jobling, m., 1995. digestion and absorbtion. in: environmental biology of fishes. chapman & hall, london england, 175-210 pp.

[15]. Pearse, A. G. E., 1985: Histochemistry. Theoretical and applied, Vol. 2. Analytic Technology, Churchill Livingston, New York.

Archive of SID

www.SID.ir

[16]. Smallwood, W..Smallwood, M.L. 1931. The development of the carp, Cyprinus carpio. I. The larval life of the carp, with special reference to the development of the intestinal canal. Journal of morphology, 52: 217-231.

[17]. Stevens , C.E..Hume , I.D. 2005. Comparative physiology of the vertebrate digestive system. Cambridge University Press, Cambridge.

[18]. Treviño, L.. Alvarez-González, C.A.. Perales-García, N.. Arévalo-Galán, L.. Uscanga-Martínez, A.. Márquez-Couturier, G.. Fernández, I..Gisbert, E. 2011. A histological study of the organogenesis of the digestive system in bay snook Petenia splendida Günther, 1862 from hatching to the juvenile stage. Journal of Applied Ichthyology, 27: 73-82.

[19]. Wallace, K.N.. Akhter, S.. Smith, E.M.. Lorent, K..Pack, M. 2005. Intestinal growth and differentiation in zebrafish. Mechanisms of Development, 122: 157-173.

[20]. Zambonino Infante, J.L..Cahu, C.L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. Aquaculture, 268: 98-105.

Archive of SID

www.SID.ir